



# THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

École Doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris Centre

Présentée par  
**Donatien RAMIANDRISOA**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

## **Adsorption de protéines sur des colloïdes et agrégation induite**

Soutenue publiquement le 26 mars 2014 devant le jury composé de :

Mme Valérie CABUIL	Présidente
M. Fernando LEAL-CALDERON	Rapporteur
M. Jean-Philippe RENAULT	Rapporteur
M. Philippe NERIN	Examineur
M. Jean BAUDRY	Directeur de thèse
M. Jérôme BIBETTE	Co-Directeur de thèse

---

# Remerciements

*Je souhaite tout d'abord à remercier Jérôme de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Toujours disponible pour faire avancer la recherche grâce à ton expertise scientifique, tu permets également de se remotiver quand les explications semblent inatteignables.*

*Je tiens également à remercier Jean pour m'avoir si bien accompagné durant toutes ces années. Tu as toujours été très présent professionnellement et personnellement, toujours à l'écoute, et sans toi ce manuscrit n'aurait jamais pu voir le jour !*

*J'adresse également mes remerciements aux membres de mon jury pour avoir accepté de s'intéresser à ces travaux : Valérie Cabuil qui m'a fait l'honneur de présider le jury, Fernando Léal-Calderon et Jean-Philippe Renault pour avoir accepté la lourde tâche de rapporteurs ainsi que Philippe Nérin d'avoir accepté d'être examinateur.*

*J'ai également une pensée toute particulière à toi, Elodie. C'est en effet grâce à toi que je me suis lancé dans les particules magnétiques au LCMD, avant d'avoir la chance de t'avoir comme encadrante à Bertin. Travailler avec toi fut un réel plaisir, j'ai donc été ravi de te voir venir à PC !*

*Merci également à Julie, ma première mentor, pour m'avoir la première initié aux particules magnétiques. Découvrir ce monde fabuleux avec quelqu'un toujours de bonne humeur fut très agréable.*

*Depuis mon premier stage au laboratoire il y a maintenant 4 ans, beaucoup de choses ont changé. Je pense surtout à l'organisation qui s'est grandement améliorée grâce à Florence, un des principaux piliers du LCMD et notre maman à tous... Je te remercie également pour tous les gâteaux que tu nous as faits en récompense du rangement du laboratoire.*

*Je tiens ensuite à remercier mes collègues. Je pense à Damien, ainsi que mes conscrits Denis et Leslie ; merci pour tous les bons moments passés ensemble, aussi bien sur les cours de tennis qu'au mariage... merci aussi à Damien pour ton expertise sur les billes magnétiques, en montages avec LabVIEW ou pour m'avoir fait faire le marathon (prépare-toi tôt ou tard je battraï ton score).*

---

*J'ai également une pensée spéciale pour toi Rory, merci pour la fabrication des particules, pour tes conseils linguistiques, pour tes talents de Cupidon (même si tu as encore une marge de progression).*

*Une pensée également pour les générations qui sont arrivées ensuite et qui ont permis de perpétuer la bonne ambiance du laboratoire : Fanny, Hugo et Perrine et, à l'occasion de cette agréable semaine à Dinard, Julie, Kévin, Léopold.*

*Merci également à tous les membres du LCMD, anciens comme nouveaux : NiKo pour ton éternelle bonne humeur, Gwen pour tes conseils en bébé, Laurent, Gabrielle, Céline, Annette, Shima, Jairo... Merci aussi à Jean-Yves pour ton expertise de bricoleur et à Lise pour tes incroyables talents de gestionnaire.*

*Je remercie également tous les membres du réseau BioMax pour toutes activités, scientifiques ou non, réalisées un peu partout.*

*Impossible également de ne pas parler de la troupe du CEA : super Céline qui es toujours là quand on a besoin de toi, Jessica, Lucille, Loïc, Jérôme... je n'oublierai pas de sitôt ce fameux réveillon 2013 où les cotillons ont tant volé !*

*Mes plus grandes pensées vont naturellement à toi Liana, que je remercie du fond coeur pour ta présence et pour tout ce que tu fais pour moi depuis si longtemps. Merci de m'avoir soutenu (ou plutôt supporté) durant ces difficiles derniers mois, merci pour ton amour, merci d'être toujours là.*

# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>9</b>
<b>1 Les surfaces homogènes en milieu biologique</b>	<b>11</b>
1.1 Les milieux biologiques . . . . .	12
1.1.1 Exemple du sang . . . . .	12
1.1.2 Applications médicales . . . . .	13
1.1.3 Les protéines . . . . .	15
1.2 Interactions protéine surface . . . . .	20
1.3 Cinétique d'adsorption . . . . .	23
1.3.1 Ordres de grandeur temporels . . . . .	23
1.3.2 Mesure de cinétique d'adsorption . . . . .	24
1.4 Adsorption à l'équilibre . . . . .	25
1.4.1 Identification des protéines adsorbées . . . . .	25
1.4.2 Méthodes expérimentales . . . . .	25
1.4.3 Isotherme de Langmuir . . . . .	27
1.4.4 Influence des paramètres externes . . . . .	31
1.4.5 Conclusion . . . . .	32
1.5 Les modèles d'adsorption . . . . .	33
1.5.1 Absence d'interactions . . . . .	33
1.5.2 Effets individuels . . . . .	33
1.5.3 Interactions latérales . . . . .	34
1.5.4 Adsorption multicouches . . . . .	35

## TABLE DES MATIÈRES

---

1.5.5	La réversibilité . . . . .	36
1.6	Conclusion . . . . .	38
<b>2</b>	<b>Mesure d'agrégation par orientation magnétique</b>	<b>41</b>
2.1	Introduction . . . . .	41
2.2	Orientation d'agrégats . . . . .	42
2.2.1	Le magnétisme des particules . . . . .	42
2.2.2	Montage expérimental . . . . .	45
2.2.3	Orientation vs chaînage . . . . .	46
2.2.4	Principe de la méthode . . . . .	47
2.2.5	Théorie - cas des doublets . . . . .	49
2.2.6	Validation de la méthode . . . . .	51
2.2.7	Comparaison aux autres méthodes . . . . .	52
2.2.8	Conclusion . . . . .	55
2.3	Application à la détection de protéine cible . . . . .	56
2.3.1	L'immuno-agglutination sur colloïdes magnétiques . . . . .	56
2.3.2	Les évolutions du test . . . . .	58
2.3.3	Les paramètres optiques . . . . .	59
2.3.4	Système modèle : dosage de la BSA-biotine . . . . .	60
2.3.5	Système réel : dosage de la CRP . . . . .	62
2.3.6	Les méthodes similaires . . . . .	64
2.4	Conclusion . . . . .	64
<b>3</b>	<b>Mesures d'adsorption de protéines</b>	<b>67</b>
3.1	Le choix des protéines et surfaces . . . . .	67
3.1.1	Les protéines . . . . .	67
3.1.2	Les surfaces . . . . .	68
3.2	Protocole et validation . . . . .	69
3.2.1	Le choix des colloïdes . . . . .	69
3.2.2	Les adsorptions parasites . . . . .	70

---

## TABLE DES MATIÈRES

3.2.3	Protocole d'adsorption . . . . .	71
3.2.4	Validation du protocole . . . . .	72
3.2.5	Conclusion . . . . .	79
3.3	Mesures d'adsorption de protéines . . . . .	80
3.3.1	Courbe d'adsorption . . . . .	80
3.3.2	Effet de l'électrostatique . . . . .	81
3.4	Réversibilité et adsorption multi-sites . . . . .	86
3.4.1	Réversibilité par compétition . . . . .	87
3.5	Simulation : modèle multi-sites . . . . .	89
3.5.1	Application aux anticorps . . . . .	89
3.5.2	Application aux protéines . . . . .	90
3.5.3	Variation de la quantité de BSA . . . . .	93
3.5.4	Adsorption de myoglobine et hémoglobine . . . . .	94
3.6	Conclusion . . . . .	95
<b>4</b>	<b>Protéines et stabilité colloïdale</b>	<b>97</b>
4.1	Compréhension du phénomène . . . . .	98
4.1.1	Mise en évidence du phénomène . . . . .	98
4.1.2	Étude du lien générant l'agrégation . . . . .	102
4.2	Application à la stabilisation . . . . .	105
4.2.1	En milieu salin . . . . .	106
4.2.2	En milieu plasmatique . . . . .	108
4.3	Conclusion . . . . .	110
	<b>Conclusion</b>	<b>111</b>
	<b>Appendices</b>	<b>113</b>
	<b>A Energie d'interaction protéine - surface</b>	<b>115</b>

<b>B Mesures d'adsorption de protéines</b>	<b>117</b>
B.1 Adsorption sur surface plane . . . . .	117
B.2 Adsorption sur colloïdes . . . . .	118
<b>C Détection de protéines</b>	<b>121</b>
<b>D Protocole d'adsorption</b>	<b>123</b>

# Introduction

Dans des applications aussi variées que les agents de contraste en IRM ou l'immuno-agglutination magnétique dans le domaine du diagnostic, les latex dans la fabrication des pneus ou les additifs dans l'agroalimentaire, les colloïdes sont fréquemment mis au contact de milieux biologiques.

De part leur omniprésence, l'interaction des protéines avec des surfaces - aussi bien gazeuses que liquides ou solides - a été étudiée depuis plus de 150 ans. Cependant, malgré toutes les études réalisées sur le sujet, le phénomène d'adsorption de protéines n'est toujours pas décrit correctement. Plusieurs paradoxes existent, notamment à cause de l'irréversibilité par dilution du phénomène. Comprendre ce phénomène pourrait pourtant permettre d'améliorer la formulation des particules, et les rendre ainsi plus performantes dans leurs applications.

La détection de protéines par immuno-agglutination magnétique est une application qui a été étudiée durant cette thèse. Basée sur l'orientation d'agrégats magnétiques anisotropes, une nouvelle méthode a été développée, permettant de mesurer un signal d'agrégation uniquement proportionnel aux agrégats formés. Le bruit de la mesure est ainsi diminué, et la limite de détection abaissée. L'intérêt de cette technique, qui permet plus largement d'avoir accès à l'état d'agrégation de solutions de particules magnétiques, a pu être validé sur un système modèle - streptavidine et BSA-biotine - ainsi que sur un système réel : la détection de la protéine C-réactive.

Cette application illustre la nécessité de bien connaître l'adsorption sur les surfaces, sous peine notamment de déstabiliser les particules ; l'adsorption des protéines sur les colloïdes fait l'objet de la seconde partie de cette thèse. Le premier objectif a été la mise au point d'un protocole de mesure capable de fournir des données fiables. Ceci a alors permis d'analyser l'adsorption pour un système protéine - surface modèle : l'albumine de sérum bovin et la silice. Les mesures obtenues ont ainsi permis une meilleure caractérisation et de proposer un nouveau modèle de l'adsorption des protéines.

Enfin, les connaissances acquises sur l'adsorption ont permis de comprendre comment des

## **Introduction**

---

agrégats non spécifiques se formaient du fait de la présence des protéines. Il a également été observé que les protéines étaient capables de protéger les particules de l'agrégation. La protection des particules par la BSA a finalement été testée dans du plasma, pour tenter d'améliorer la détection de protéines cibles en plasma.

# Chapitre 1

## Les surfaces homogènes en milieu biologique

Dans ce chapitre nous nous intéressons aux interactions qui ont lieu quand une surface homogène entre en contact avec un milieu biologique.

Il s'agira tout d'abord de définir le milieu biologique, avec un intérêt marqué pour les protéines. Ce sont en effet elles qui sont le coeur de cette étude, pour plusieurs raisons : elles représentent une composante importante du sang, elles illustrent parfaitement l'extrême diversité des composantes sanguines, et pour finir elles sont présentes dans de nombreuses applications du quotidien.

Le domaine médical est le plus démonstratif - il sera ainsi développé dans cette partie -, mais les protéines sont aussi très présentes dans l'agroalimentaire. Outre le fait que les aliments en sont composés, elles y sont parfois rajoutés, aussi bien pour leurs propriétés nutritives que pour leurs propriétés physico-chimiques - les protéines laitières sont particulièrement utilisées, par exemple dans les fromages pour pizzas.

L'adsorption des protéines sur les surfaces sera ensuite abordée ; tout d'abord aux temps courts, puis en régime stationnaire. Cette thématique a depuis 50 ans fait l'objet de très nombreuses recherches, les protéines et les surfaces qu'il est possible d'étudier étant extrêmement diverses. Cette partie consiste en l'état de l'art sur ce sujet ; les expériences réalisées durant la thèse seront présentées dans les chapitres suivants

### 1.1 Les milieux biologiques

Sang, salive, larmes, sperme, liquides intra et extra-cellulaires... les fluides biologiques ont une place très importante pour tous les organismes vivants. Ils permettent la mobilité des différents objets nécessaires à la communication entre les différents organes, le transport de nutriments ou l'évacuation de déchets.

Afin de mieux se rendre compte de l'importance et de la complexité de ces fluides, le rôle et la composition du sang seront détaillés ; puis les applications qui y sont reliées, dans le diagnostic médical.

#### 1.1.1 Exemple du sang

Suivant la morphologie, de 5 à 7 litre de sang circulent dans le corps humain, à un débit typique de 5L/min. Se chargeant en oxygène dans les poumons et propulsé par le coeur, il irrigue tous les organismes grâce à un gigantesque réseau d'artères, veines, capillaires, artérioles dont la longueur est estimée à 100,000km [Loe and Edwards, 2004]. Etant le fluide circulant communiquant avec le plus grand nombre d'organismes, il est celui qui a la composition et les utilités les plus diverses.

#### Les fonctions

Il a tout d'abord de nombreuses fonctions de transport, comme celui de l'oxygène, des poumons aux organismes. Ces derniers sont également approvisionnés en nutriments, récupérés entre autre des intestins.

Le sang sert aussi à assurer la sécurité de l'organisme. Il sert ainsi au système immunitaire : dans le cas d'une infection, il draine les cellules de la réponse immunitaire (globules blancs, macrophages...); mais également à l'hémostase en drainant les plaquettes qui permettront, avec les fibrinogènes, de réaliser la coagulation.

Le sang évacue enfin les catabolites, substances issus du catabolisme dans les organismes, tel l'acide lactique et le CO<sub>2</sub> produits par les muscles.

#### La composition

Afin de remplir ces diverses fonctions, le sang est composé de très nombreux éléments.

**Les éléments figurés** 45% du volume sanguin est constitué de cellules, qui baignent dans un liquide appelé plasma. Les différentes cellules sont les globules blancs - chargés de la réponse immunitaire -, les plaquettes et en grande majorité les globules rouges. Ces derniers, qui donnent au sang sa couleur rouge via l'hémoglobine qu'ils contiennent, sont chargés d'amener l'oxygène des poumons aux muscles.

**Gaz et ions** Notamment grâce aux globules rouges, le sang contient des gaz dissous : principalement l'oxygène (50mM) amené des poumons aux organes, et le dioxyde de carbone (25mM) amené des organes vers les poumons pour élimination. Enfin les bicarbonates (20mM) servent en tant que tampon à maintenir le pH du sang à une valeur de 7.4.

Divers ions permettent quant à eux de maintenir l'équilibre osmotique, les plus importants étant  $Na^+$  (140mM) et  $Cl^-$  (105mM). Mais de nombreux autres sont présents tels  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$ .

**Solutés organiques** La dernière partie est constituée de divers solutés organiques, dont seuls les principaux sont cités ici.

Tout d'abord les protéines, de 60 à 80g/L dans le plasma, on en compte près de 3,000 différentes [Zhang et al., 2008]. On citera en particulier l'albumine, qui représente 60% de la masse de protéines. De part son aptitude à se lier à de nombreuses fonctions, elle sert au transport de nombreuses plus petites molécules (hormones, acides gras, etc).

Les lipides sont également présents sous diverses formes tels les acides gras ou le cholestérol. Les acides gras sont utilisés comme source d'énergie quand transportés vers le foie et les muscles, leur concentration va de 35 à 125mg/l ([www.sante.public.lu](http://www.sante.public.lu)). Le cholestérol est un des principaux lipides de l'organisme, il est fabriqué par le foie. Sa concentration varie typiquement de 1.6 à 2.4g/l.

A raison de 1g/L de sang, le glucose est une réserve d'énergie disponible pour les organismes. Et pour finir les hormones, sécrétés par des glandes, qui sont les messagers chimiques de l'organisme.

D'un point de vue physico-chimiste, le sang est donc un milieu extrêmement complexe. Il contient de très nombreux constituants, de tailles très variées, chargés ou non, avec des parties hydrophiles, hydrophobes ou encore des surfactants.

### 1.1.2 Applications médicales

Le sang contient un très grand nombre de composants dont la concentration est très finement régulé, il est donc révélateur de nombreuses pathologies. Il irrigue également la quasi-totalité des régions de l'organisme : avec un tel réseau il est possible d'atteindre de très nombreux endroits, ce qui est utilisé dans de nombreuses techniques de soins [Arvizo et al., 2012].

#### **Diagnostic *in vitro***

De nombreux dysfonctionnements de l'organisme sont détectables par la quantification d'un élément du sang, en particulier de protéines. Parmi les protéines détectées en grandes quantités se trouve la protéine C-réactive - CRP, un marqueur de l'inflammation - : plus de 16 millions de dosages ont été réalisés en France en 2012 (<http://www.ameli.fr>). Avec 10 millions de tests réalisés en 2012, la TSH est autre protéine majeure : elle régule la thyroïde elle est donc révélatrice de troubles de la thyroïde dont souffre 2-4% de la population.

#### **Diagnostic *in vivo***

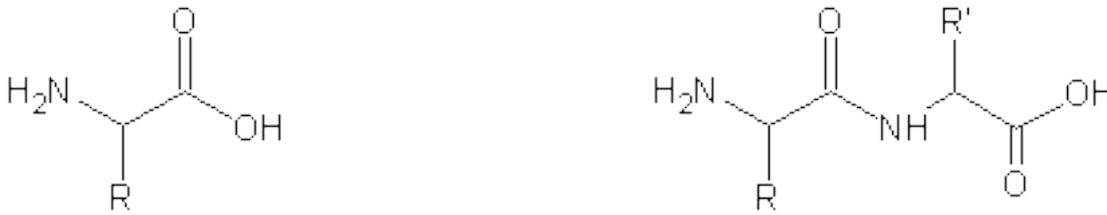
L'IRM est de loin l'application *in vivo* la plus développée, elle est devenue au fil des ans un outil incontournable pour visualiser diverses zones de l'organisme tel un genou fissuré ou une tumeur cérébrale. Afin d'améliorer la résolution, un agent de contraste peut être prescrit au patient, agent qui là encore sera véhiculé par le sang [Laurent et al., 2008]. Les agents de contraste sont soit des molécules - contenant souvent du gadolinium - soit des colloïdes magnétiques.

#### **Thérapie *in vivo***

Pour l'hyperthermie magnétique, des nanoparticules injectées dans le sang sont localisées magnétiquement dans une zone cancéreuse, puis excitées grâce à un champ magnétique alternatif. La chaleur dégagée permet de brûler la tumeur.

A titre encore expérimental, le relargage de médicament dans le sang. Certains nano-objets sont conçus pour encapsuler des principes actifs, et ne les libérer que lentement dans le sang. Eviter l'élimination rapide par l'organisme représente un véritable défi, c'est pourquoi la chimie de surface de ces objets est particulièrement travaillée [Couvreur and Vauthier, 2006].

Pour toutes ces applications, il est primordial que les objets qui seront mis au contact du sang ne soient pas détériorés par les composés précédemment cités. Parmi les composantes du



**FIGURE 1.1** – Gauche : structure générale d'un acide aminé. Droite : deux acides aminés reliés par une liaison peptidique. R et R' représentent les chaînes latérales qui font la spécificité des acides aminés.

sang responsables des limites de ces applications, les protéines occupent une place importante à cause de leur abondance et de leur diversité : c'est pourquoi elles sont étudiées. Cependant, avant de s'intéresser à leurs propriétés adhésives, il est important de bien se rendre compte de ce qu'est une protéine : cette description fait l'objet de la partie suivante.

### 1.1.3 Les protéines

Parmi les différents composants du sang précédemment cités, les cellules, de part leur taille importante, peuvent facilement être séparées du sang avant une analyse *in vitro*, elles ne sont d'ailleurs pas dans tous les milieux biologiques. Les petites molécules telles les hormones ou les gaz ont quant à eux des comportements bien connus, leurs interactions sont bien caractérisées.

Reste les objets de taille intermédiaire : les protéines. Possédant des régions chargées positivement, négativement, hydrophiles, hydrophobes, adoptant des structures spatiales précises, elles ont des comportements spécifiques qui seront détaillés, comme la possibilité de changer de conformation.

Avant de s'intéresser à leur comportement en présence d'une surface homogène et pour mieux se rendre compte de la complexité du phénomène, il faut donc tout d'abord regarder de quoi elles sont constituées et comment elles sont structurées.

### Les acides aminés

Les acides aminés sont les molécules constitutives des protéines. Ils possèdent une extrémité C-terminal (groupe carboxyle), une extrémité N-terminal (groupe amide), ainsi qu'une chaîne latérale qui leur est propre. Les deux extrémités peuvent réagir et former une liaison peptidique - permettant la polymérisation des acides aminés. La structure générale d'un acide aminé seul et de deux acides aminés reliés entre eux par une liaison peptidique est représentée sur la figure 1.1.

Les acides aminés ont différentes caractéristiques portées par leur chaîne latérale :

Acides aminés polaires	Acides aminés apolaires
D - Acide aspartique (acide)	A - Alanine
E - Acide glutamique (acide)	F - Phénylalanine
H - Histidine (basique)	I - Isoleucine
K - Lysine (basique)	L - Leucine
R - Arginine (basique)	M - Méthionine
N - Asparagine	V - Valine
Q - Glutamine	W - Tryptophane
S - Sérine	
T - Thréonine	
Y - Tyrosine	

Acides aminés spéciaux
G - Glycine : chaîne secondaire = H seul, acide aminé hydrophile ou hydrophobe
C - Cystéine : forme les ponts disulfures
P - Proline : déstabilise la structure secondaire à cause de son amine secondaire

TABLE 1.1 – Liste des 20 principaux acides aminés [Karp, 2004].

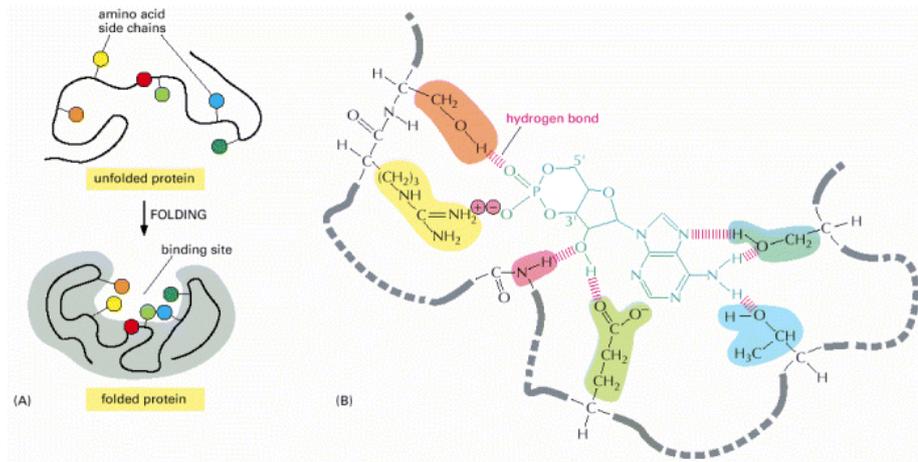
- polaire ou apolaire, certains peuvent donc être hydrophobes.
- acido-basique : ils peuvent être chargés positivement, négativement ou non chargés.
- leur aptitude à former des liaisons hydrogène ou des ponts disulfures

La liste des acides aminés ainsi que leurs caractéristiques principales est reportée dans la table 1.1.

**Structure primaire d'une protéine** Une protéine est un assemblage linéaire de quelques dizaines - voire centaines - d'acides aminés, la nature des acides aminés qui sont constitutifs de la protéine définit la structure primaire. A titre d'exemple, la structure de la myoglobine est [Eich et al., 1996] :

MVLSEGEWQLVLHVWAKVEADVAGHGQDILIRLFKSHPETLEKFDRFKHL  
 KTEAEMKASEDLKKHGVTVLTALGAILKKKGHHEAELKPLAQSHATKHKIP  
 IKYLEFISEAIIHVLHSRHPGNFGADAQGAMNKALELFRKDIAAKYKELGYQG

La structure est invariante en fonction de la force ionique, du pH, de la température. Une protéine ne peut cependant pas se réduire à la structure primaire : une protéine a une fonction, qu'elle ne peut remplir que grâce à sa structure. Cette importance de la structure est illustrée dans la figure 1.2. Pour une protéine à la structure plutôt rigide, le nombre maximum de liaisons qu'elle établira dépend entièrement de la structure de la molécule avec laquelle elles entre en interaction. La structure s'obtient par le repliement de la chaîne d'acides aminés, repliement déterminé par les forces présentées ci-dessous.



**FIGURE 1.2** – Illustration du lien entre structure et fonction d’une protéine. La reconnaissance a lieu grâce aux multiples interactions qui s’établissent entre les protéines [Alberts, 2002]. La création des liens nécessite également une complémentarité de formes.

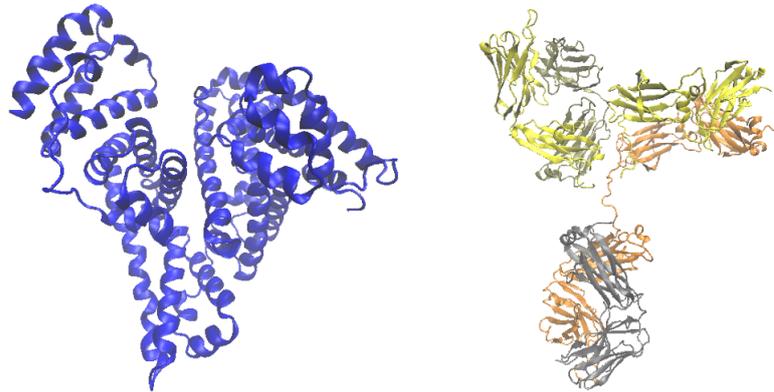
## Structures

La structure primaire consiste pour rappel en la nature des acides aminés constitutifs de la protéine. La structure ne s’arrête pas là, les acides aminés interagissant entre eux via différentes interactions :

- les interactions hydrophobes. Certains acides aminés sont apolaires, et donc hydrophobes. Alors que les parties hydrophiles des protéines tendent à maximiser leurs interactions avec le solvant aqueux - via des liaisons hydrogènes - les parties hydrophobes sont regroupées dans le cœur de la protéine, où l’eau ne pénètre pas.
- les liaisons hydrogène. Dix fois plus faibles qu’une liaison covalente, elles ont lieu entre un atome d’hydrogène lié à un hétéroatome et un hétéroatome porteur d’un doublet non liant, tel l’hydrogène.
- les ponts disulfures. Les cystéines sont les seuls acides aminés à posséder des atomes de soufre. Quand une protéine se replie, ces atomes de soufre peuvent se lier par une liaison covalente : on parle de pont disulfure. Ces ponts contribuent à la stabilisation de la protéine.

Ces interactions entraînent des repliements des protéines, et ce à diverses échelles.

**Structure secondaire** Elle correspond au repliement local de la chaîne. Du fait principalement des liaisons hydrogène entre les groupements carbonyle et amide de la chaîne peptidique, seules certaines configurations sont accessibles à la protéine.



**FIGURE 1.3** – Repliement de la chaîne d'acides aminés pour deux protéines. Gauche : albumine [Majorek et al., 2012], droite : IgG [Saphire et al., 2001]. Les hélices représentent les hélices  $\alpha$ , les flèches les feuillets.

Les structure secondaires les plus importantes sont :

- les feuillets : plusieurs brins étirés stabilisés entre eux par les liaisons hydrogènes distantes
- les hélices : enroulement de la structure avec les liaisons hydrogène entre acides aminés proches
- les coudes : repliement local a périodique permettant de relier deux fragments de structure périodique, tels deux brins dans un feuillet

Ces types de structure sont visibles sur la figure 1.3.

**Structure tertiaire** Il s'agit de la structure tridimensionnelle de la protéine. Elle est notamment contrôlée par la présence de régions hydrophobes dans la protéine, qui auront tendance à se regrouper au centre de la protéine afin de limiter leurs interactions avec l'eau environnante. La structure est également maintenue en place par les ponts disulfures.

**Structure quaternaire** Cette dernière concerne les protéines multimériques, c'est-à-dire constituées de plusieurs sous-unités reliées entre elles principalement par des liaisons non covalentes. L'exemple le plus connu est l'hémoglobine, qui est constituée de 4 sous-unités - 2  $\alpha$  et 2  $\beta$ .

### Quelques protéines

Afin d'illustrer leur diversité, les caractéristiques de quelques protéines importantes seront illustrées. Ci-dessous quelques protéines dont certaines seront utilisées dans ce manuscrit :

Protéine	pI	MW - kDa	R <sub>H</sub> - nm
Fibrinogène	8.7	340	13
Lysozyme	11	14.3	1.9
Myoglobine	6.5	18	2.4
Albumine	4.9	66	3.7
Hémoglobine	6.9	68	3.2
Igg	~7	170	5.5

**TABLE 1.2** – Point isoélectrique pI, masse molaire MW et rayon hydrodynamique R<sub>H</sub> de quelques protéines.

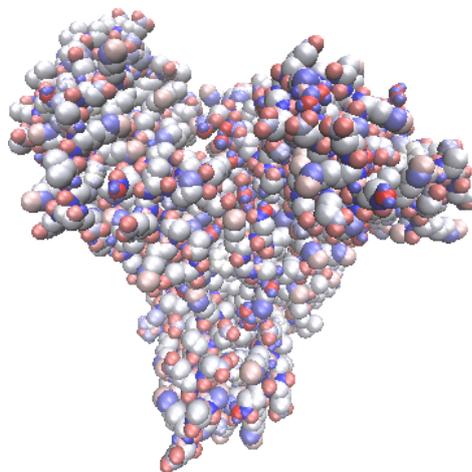
- l’albumine est la protéine principale chez l’homme, puisqu’elle constitue près de 60% des protéines plasmatiques. Elle a un rôle de maintien du pH et de transport des petites molécules.
- les fibrinogènes représentent entre 2 et 3 % des protéines plasmatiques. C’est un facteur intervenant dans la coagulation.
- les lysozymes sont présents chez l’homme dans des sécrétions comme la salive ou les larmes car ils ont un pouvoir antibactérien.
- la myoglobine est une molécule de stockage du dioxygène dans les muscles.
- l’hémoglobine est une protéine qui fixe les molécules de dioxygène. Constituée de quatre sous-unités, elle est située dans les globules rouges.
- les immunoglobulines/anticorps sont les protéines du système immunitaire. Elles contiennent toute la spécificité via l’extrémité de leurs chaînes.

La notion de spécificité des anticorps mérite de s’y attarder. De façon plus précise, l’extrémité des chaînes des anticorps est constituée de parties variables, i.e. les acides aminés ne sont pas les mêmes. Chaque chaîne se liera donc uniquement aux objets avec qui elle pourra créer suffisamment de liens, elle ne se liera pas avec les autres. La spécificité permet ainsi aux anticorps de se lier aux protéines cibles, même dans un milieu complexe, permettant leur capture ultérieure par les cellules du système immunitaire pour leur destruction ultérieure. Cette reconnaissance spécifique sera utilisée dans la partie 2 pour la détection de protéines cibles.

**Caractéristiques** Outre la structure, plusieurs paramètres macroscopiques sont caractéristiques de ces protéines :

- la taille, reliée à la masse ou encore au nombre d’acides aminés
- le point isoélectrique pI : il s’agit du pH auquel la somme des charges portées par la protéine est nulle. Au pH physiologique, la plupart des protéines sont chargées négativement.

Ces caractéristiques sont rapportées dans la table 1.2.



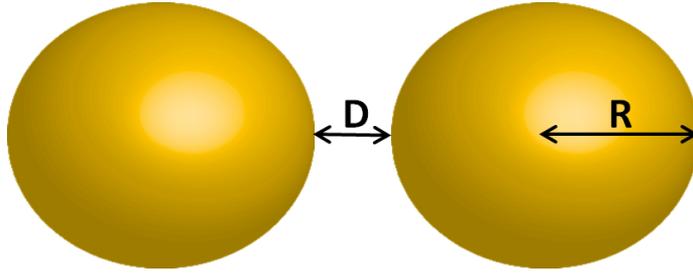
**FIGURE 1.4** – Charges positives (bleu) et négatives (rouges) de la BSA, à pH 5.5. Chaque sphère représente un atome de la protéine. La structure de la protéine provient de Majorek et al. [2012], la répartition des charges a été obtenue grâce au logiciel développé par Dolinsky et al. [2004].

Il ne faut pas oublier que beaucoup des acides aminés sont chargés, les protéines arborent donc le plus souvent une répartition de charge complexe. La figure 1.4 montre ainsi la répartition des charges de l’albumine de sérum bovin - BSA -, avec un enchevêtrement complexe de sites positifs et négatifs.

La distribution des charges, ainsi que leur arrangement dans l’espace, illustre la différence avec les surfaces solides homogènes ; la modélisation de l’adsorption d’une telle protéine sur une surface solide sera donc plus complexe à prédire que l’interaction des surfaces entre elles. L’étude de l’interaction entre petits objets -  $\sim 1\mu\text{m}$  - n’est pourtant pas un domaine nouveau, la théorie DLVO datant des années 1940. Cette théorie est donc appliquée dans la partie suivante pour l’adsorption de protéines sur une surface solide.

### 1.2 Interactions protéine surface

La théorie DLVO repose sur une approche de champ moyen. Pour l’illustrer, considérons deux particules de silice de rayon  $R = 75\text{nm}$  séparées par une distance  $D$ , comme représenté sur la figure 1.5. A pH 7.4, elles sont chargées avec un potentiel de surface  $\psi = -50\text{mV}$ . En milieu liquide, un nuage de contre-ions positifs se forme à la surface de ces particules négatives. Comme il est entropiquement défavorable que ces nuages se pénétrant, ces derniers se repoussent et les particules restent éloignées : la dispersion est stable [Cabane and Hénon, 2003]. Dans le cas de particules grandes devant la longueur de Debye, l’expression de l’énergie électrostatique entre les deux particules est [Israelachvili, 2011] :



**FIGURE 1.5** – Représentation du système : deux particules de rayon  $R$  sont séparées par une distance  $D$ .

$$W_{elec} = \frac{R}{2} Z e^{-\kappa D} \quad (1.1)$$

Dans cette expression  $Z$  est une "constante d'interaction" définie par

$$Z = 64\pi\epsilon_0\epsilon(kT/e)^2 \tanh^2(e\psi_0/4kT) \quad (1.2)$$

avec  $\psi_0$  la charge de surface - en mV - et  $\kappa$  est l'inverse de la longueur de Debye :

$$1/\kappa = 0.304/\sqrt{[NaCl]}nm \quad (1.3)$$

Numériquement, pour une solution de NaCl à 10mM,  $1/\kappa = 3.0nm$  ; à 100mM  $1/\kappa = 1.0nm$

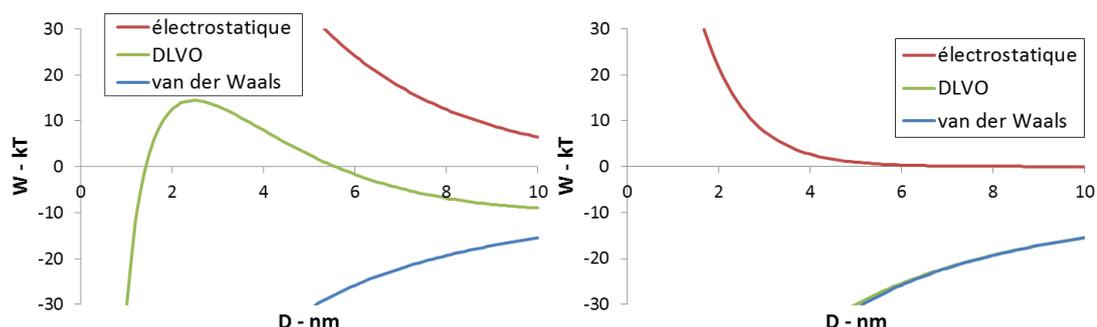
En solution, certains atomes sont impliqués dans la formation de dipôles - permanents ou induits ; ces interactions correspondent aux forces de van der Waals. Dans notre cas de deux sphères séparées par une distance  $D$ , l'expression de l'énergie de Van der Waals est :

$$W_{vdw} = -\frac{AR}{12D} \quad (1.4)$$

où  $A$  est la constante de Hamaker du système, constante qui peut être prise en première approximation égale à  $10^{-19}J$ .

La théorie DLVO correspond à la somme de ces deux composantes - leur additivité est supposée. Cette somme est représentée sur la figure 1.6, pour des concentrations en NaCl de 10 et 100mM.

On y voit que pour une très faible distance le potentiel attractif est très élevé par rapport à  $kT$ , les billes sont donc agrégées. Mais pour atteindre cet état à 10mM elles doivent passer par un maximum de  $14kT$  ; cette importante barrière empêche l'agrégation de se produire. Par



**FIGURE 1.6** – Estimation des énergies électrostatique et de van der Waals dans le cas de deux sphères de rayon  $R=75\text{nm}$  avec une charge de surface  $\psi = -50\text{mV}$ . Gauche :  $[\text{NaCl}]=10\text{mM}$ , une barrière d'énergie à  $14kT$  permet de stabiliser le système. Droite :  $[\text{NaCl}]=100\text{mM}$ , la barrière disparaît.

contre, si la concentration en NaCl passe à 100mM, la barrière d'énergie disparaît : les particules (comme des particules de silice) s'agrègent dès la première rencontre.

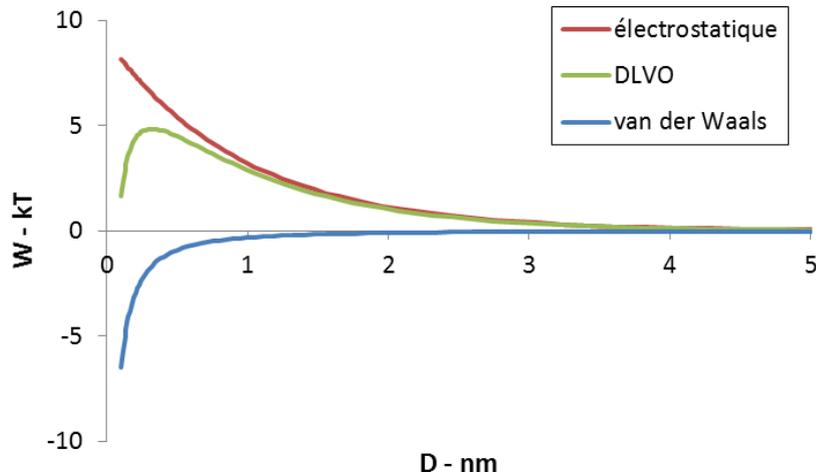
Pour travailler dans des conditions physiologiques -  $\text{pH} \sim 7.4$ , NaCl 150mM -, il est donc important d'adapter les surfaces des colloïdes. Greffer des polymères à la surface est une solution, il est également possible d'utiliser des surfactants pour bloquer le phénomène d'agrégation et ainsi de stabiliser le système.

**Cas des protéines** A pH 4 où une protéine serait chargée positivement et une surface négativement, un fort collage dû à l'attraction électrostatique est attendu. La question se pose aux pH supérieurs au point isoélectrique, où protéines et surfaces sont négatives.

Il est délicat d'étendre le modèle précédent à l'interaction entre un colloïde et une protéine à cause de leur taille de quelques nanomètres, car nous ne sommes plus dans le cas  $R \gg 1/\kappa$ . Cependant d'autres théories, qui confère une charge moyenne à la protéine et sont valides dans de telles conditions, ont néanmoins été proposées [Roth and Lenhoff, 1993; Oberholzer et al., 1997]. Les expressions se trouvent en annexe A, le tracé correspondant de l'énergie totale en fonction de la distance  $d$  se trouve sur la figure 1.7.

Le résultat indique une barrière d'énergie de  $5kT$ , et surtout l'absence de puits de potentiel proche de la surface. Pour une protéine adsorbée, il serait donc aisé de retourner en solution. En première approximation ces modèles sont intéressants, ils montrent malgré tout rapidement leurs limites car les protéines ne sont pas des sphères homogènes mais ont des distributions précises et complexes de charges, distributions qui peuvent d'ailleurs changer au cours de l'adsorption.

A très faible distance, l'effet du solvant doit également être ajouté, ce pourquoi les courbes ne vont pas jusque  $D = 0$ . A de telles distances les interactions hydrophobes doivent également



**FIGURE 1.7** – Energie d'interaction entre une protéine et une surface. L'énergie passe par un maximum qu'il est possible de franchir pour la protéine, mais le rapprochement jusqu'à la surface n'est pas une position particulièrement stable. Pour cette simulation une protéine de diamètre 4nm possédant une charge de -10mV s'adsorbe sur une surface chargée à -100mV, dans 100mM de NaCl. Ce qui correspondrait à l'adsorption de la BSA sur une surface en silice à pH 5.5.

être prises en compte.

Du fait de leur hétérogénéité, toutes les orientations des protéines ne vont pas donner la même énergie d'interaction. Elles vont donc sonder la surface de façon réversible avant de s'adsorber sur un site et dans une configuration suffisamment stable.

Après ce passage sur la simulation, les différentes mesures expérimentales obtenues par le passé sont examinées. Les mesures seront traitées en deux parties : celles traitant du comportement des protéines au cours de l'adsorption, puis celles à l'équilibre.

### 1.3 Cinétique d'adsorption

Les parties précédentes ont mis en évidence la complexité du phénomène. Il s'agit donc à présent de caractériser le processus d'adsorption, en commençant par les phénomènes qui ont lieu aux temps courts - phénomènes qui détermineront l'état final du système. Les cinétiques d'adsorption ainsi que les suivis de conformation des protéines font donc l'objet de ce chapitre.

#### 1.3.1 Ordres de grandeur temporels

Dans le cas général de l'agrégation de deux objets, deux cas de figure sont possibles. Dans le premier, l'agrégation se produit dès que les objets sont au contact : la réaction est dite "limitée par la diffusion". Dans le deuxième cas, le collage ne se produit pas forcément dès le premier

contact, un certain nombre de contacts peuvent être nécessaires pour que l'agrégation ait lieu : on parle d'agrégation "limitée par la réaction" ; le temps caractéristique dépend du système étudié.

### Collage limité par la diffusion

Intéressons-nous au premier cas : l'agrégation limitée par la diffusion. Considérons l'adsorption de protéines de 4nm de diamètre sur une surface qui serait un ensemble de microparticules de 150nm. La constante d'association de la réaction d'agrégation est donnée par [Von Smoluchowski, 1917] :

$$k_{smolu} = 4\pi DR$$

où  $R = R_A + R_B$  est la somme des rayons de chaque objet et  $D = D_A + D_B$  est la somme des coefficients des diffusions :

$$D_A = \frac{kT}{6\pi\eta R_A}$$

Numériquement on obtient une valeur  $k_{on} = 6.7 * 10^9 M^{-1} s^{-1}$ . Pour une concentration en protéines de 1.5µM et 500pM de particules dans une solution aqueuse à 25°C, le temps caractéristique d'adsorption des protéines serait de 10µs. En pratique il est extrêmement difficile de faire des mesures sur des temps aussi courts, même en chambre à flux. Pour comparaison, dans le cas d'une reconnaissance spécifique (comme le couple biotine - streptavidine),  $k_{on} = 10^6 M^{-1} s^{-1}$  : une telle réaction, de l'ordre de la ms, reste extrêmement rapide. Les cinétiques d'adsorption ne permettent donc que de mesurer les collages limités par la réaction.

### 1.3.2 Mesure de cinétique d'adsorption

Les mesures de cinétique d'adsorption peuvent se faire grâce à diverses techniques. Tout d'abord en chambre à flux : c'est ainsi que Docoslis et al. [1999] ont mesuré l'adsorption et la désorption de HSA - Human Serum Albumin - sur une surface de silice, les temps caractéristiques sont de l'ordre de la dizaine de secondes.

Récemment, des cinétiques plus précises ont pu être obtenues grâce au suivi de BSA marquée par un fluorophore. Le suivi microscopique en TIRF de molécule unique permet de suivre les trajectoires des protéines à la surface et leur temps de résidence à la surface. Avec cette technique les mêmes temps caractéristiques d'adsorption ont été obtenus, à savoir de l'ordre de la dizaine de secondes. Mais d'autres découvertes ont été réalisées.

Tout d'abord Kwok et al. [2007] ont déduit l'existence de deux populations différentes de BSA : une première minoritaire qui s'adsorbe fortement et une deuxième - majoritaire - qui

s'adsorbe plus faiblement. Ultérieurement Yeung et al. [2009] ont montré l'importance de la pré-agrégation de la BSA avant son adsorption sur la surface. Alors qu'aux faibles concentrations la BSA existe à l'état de monomère, elle se trouve sous forme de paquets à partir de  $\sim 100$ nM. Ces observations tendraient donc à valider le phénomène d'adsorption sous forme de multi-couches (détaillé ci-après).

Cependant des effets plus longs apparaissent, nécessitant une adsorption beaucoup plus longue - de plusieurs heures, voire plusieurs jours - afin de réaliser des mesures en stationnaire [Kurrat et al., 1994; Han et al., 2009].

Les temps caractéristiques obtenus sont trop longs pour que l'adsorption soit limitée par la diffusion. Outre le premier temps caractéristique rapide, des phénomènes plus longs apparaissent, l'adsorption à l'équilibre est donc impossible à prédire à partir des résultats précédents : des mesures à l'équilibre sont donc indispensables.

## 1.4 Adsorption à l'équilibre

Après s'être intéressé à l'évolution des protéines après leur contact avec une surface, il convient d'examiner le phénomène une fois l'état stationnaire atteint. Mais avant de s'intéresser aux caractéristiques d'adsorption connues, les méthodes utilisées seront examinées afin de connaître les paramètres exacts qui sont mesurés et les difficultés expérimentales.

### 1.4.1 Identification des protéines adsorbées

De par leur quantité et leur importance dans le domaine médicale, certaines molécules, telles la CRP ou la TSH, constituent l'essentiel des recherches. Ce ne sont cependant pas les seules protéines capables de s'adsorber, certaines études cherchent donc à déterminer, en partant d'un plasma entier, quelles sont les protéines qui s'adsorbent spécifiquement sur des nanoparticules données.

Les protéines adsorbées sont déterminées par une chromatographie haute résolution couplée à de la spectroscopie de masse, permettant l'identification d'une centaine de protéines adsorbées [Capriotti et al., 2011; Tenzer et al., 2011; Ruh et al., 2012]. Il a également pu être montré que l'identité des protéines adsorbées varie avec la surface et le diamètre des particules [Lundqvist et al., 2008]. Les protéines adsorbées peuvent aussi être identifiées par électrophorèse sur gel.

Connaître les protéines du plasma qui s'adsorbent peut être utile d'un point de vue expérimental : si dans un système quelconque des difficultés apparaissent et sont dues à une

seule protéine, il sera aisée de la neutraliser. Mais ces données ne permettent pas de caractériser l'adsorption d'une protéine seule et donc de comprendre les paramètres qui gouvernent le phénomène.

### 1.4.2 Méthodes expérimentales

#### Adsorption sur les surfaces liquides et gazeuses

L'interaction protéines-surfaces est également intéressante avec des surfaces liquides puisque cette configuration se produit dans de très nombreux cas - tel la formation de mousse par agitation de blanc d'oeufs. C'est d'ailleurs cette étude qui a tout d'abord été réalisée, et ce depuis très longtemps [Melsens, 1851].

Les surfaces liquides ou gazeuses permettent l'utilisation d'une technique très efficace : la mesure de tension de surface. La forme d'une goutte est due à un équilibre entre la force gravitationnelle - qui tend à l'étirer - et la tension de surface - qui tend à la rendre sphérique - il est donc possible de remonter à la tension de surface en analysant la forme de la bulle/goutte. Des protéines injectées dans la solution vont alors diffuser à l'interface ; si elles s'y adsorbent elles entraînent une modification de la tension de surface. Cet effet est quantifiable, et permet donc de remonter à l'affinité des protéines pour l'interface.

#### Adsorption sur surfaces solides

La mesure de tension de surface n'est naturellement pas applicable aux surfaces solides, de nouvelles méthodes doivent donc être utilisées.

Les principales méthodes utilisées pour quantifier l'adsorption sont répertoriées en annexe B. Ces mesures se classent en deux catégories : celles qui s'utilisent sur des surfaces planes, et celles qui s'utilisent sur des surfaces colloïdales. Remplacer les surfaces planes a en effet plusieurs avantages, comme il sera développé dans la partie 3. Cela permet d'accélérer le contact entre surfaces et protéines, d'augmenter la surface d'adsorption, et donc de minimiser l'effet de l'adsorption parasite sur les autres surfaces du montage. Dans ce cas la quantification des protéines adsorbées nécessite en revanche une séparation entre les protéines non adsorbées et les billes ; les mesures sont alors valides uniquement si l'adsorption est irréversible durant cette séparation - point discuté dans Noh and Vogler [2006].

Toutes les méthodes de l'annexe permettent d'obtenir des mesures d'adsorption, qui consistent à mesurer la quantité de protéine adsorbée sur une certaine quantité de particules. Une isotherme est obtenue en faisant varier la quantité de protéines en solution à concentration en

particules constante. On obtient ainsi une courbe  $[Protéine]_{adsorbée} = f([Protéine]_{solution}^{initiale})$ . Il est naturellement possible de travailler à quantité de protéines constante et de faire varier la quantité de surface d'adsorption.

Ces mesures peuvent être réalisées d'un point de vue cinétique, afin d'observer la cinétique d'adsorption, ou à l'équilibre : c'est ce deuxième point qui est examiné ici. Avant de s'intéresser aux résultats obtenus dans la littérature, le modèle le plus utilisé est présenté - le modèle de Langmuir -, permettant de bien comprendre les processus en jeu.

### 1.4.3 Isotherme de Langmuir

#### Langmuir - adsorption de gaz

En 1917 Irving Langmuir introduit un modèle d'adsorption de molécules d'un gaz monoatomique sur une surface solide [Langmuir, 1917]. S'agissant d'un modèle très fréquemment utilisé pour l'adsorption de protéines, ce modèle est développé ici. La description réalisée ci-dessous s'appuie sur [Hill, 1960]. Cela permettra de déterminer à quel point ce modèle est transposable ou non au système protéine-surface.

Dans ce modèle, on considère l'adsorption de  $N$  molécules de gaz sur  $M$  sites d'adsorption. Pour un atome donné, notons  $q$  sa fonction de partition - on suppose qu'elle est la même si la molécule est adsorbée ou non. Dans le cas où les  $N$  atomes ont  $N$  sites d'adsorption à disposition, la fonction de partition du système est :

$$Q(N, T) = (q.e^{U_0/kT})^N \quad (1.5)$$

où  $U_0$  est l'énergie d'adsorption. Dans le cas où le nombre de sites d'adsorption est supérieur au nombre d'atomes adsorbés ( $M > N$ ), chacun des  $N$  atomes a  $M$  possibilités de fixation, la fonction de partition s'écrit :

$$Q(N, M, T) = C_M^N q(T)^N = \frac{M!q(T)^N}{N!(M-N)!} \quad (1.6)$$

et donc :

$$\ln Q = M \ln M + N \ln q - N \ln N - (M - N) \ln(M - N) \quad (1.7)$$

Les degrés de liberté du système étant  $N$ ,  $M$  et  $T$ , le potentiel chimique de la phase adsorbée s'obtient en dérivant la fonction de partition par rapport à  $N$ , à  $M$  et  $T$  constants :

$$\frac{\mu_{ads}}{kT} = -\left(\frac{\partial \ln Q}{\partial N}\right)_{M,T} = \ln \frac{\theta}{(1-\theta)q} \quad (1.8)$$

où  $\theta = N/M$  est la fraction de sites occupés. Le système étant à l'équilibre, le potentiel chimique du gaz adsorbé est égal au potentiel chimique du gaz en solution. En notant  $p$  la pression du gaz :

$$\frac{\mu_{ads}}{kT} = \ln \frac{\theta}{(1-\theta)q} = \frac{\mu_{gaz}}{kT} = \frac{\mu^0}{kT} + \ln p \quad (1.9)$$

En notant  $\chi(T) = q(T)e^{(U_0+\mu^0)/kT}$ , on obtient finalement

$$\theta = \frac{\chi(T)p}{1 + \chi(T)p} \quad (1.10)$$

Il est important de garder à l'esprit les hypothèses utilisées pour ce modèle :

- la mesure est faite à l'équilibre
- l'objet qui s'adsorbe est dans le même état qu'il soit adsorbé ou en solution
- les sites d'adsorption ainsi que les molécules qui s'adsorbent sont tous identiques
- les particules adsorbées n'interagissent pas entre elles, ni latéralement ni sous forme de multicouches

Pour que ce modèle soit valide, il nécessite donc des hypothèses exigeantes. Cependant, pour tout phénomène d'adsorption, il peut consister un base de travail avant qu'il ne soit amélioré en fonction des résultats expérimentaux découverts.

## Langmuir - adsorption de protéines

Il peut donc en première approximation être utilisé pour l'adsorption de protéines sur les surface, d'autant plus que les fits obtenus sont souvent en bonne adéquation avec les résultats expérimentaux [Norde and Favier, 1992; Kim and Somorjai, 2003; Rocker et al., 2009]. Il peut cependant tout de suite être noté que la validation des hypothèses ci-dessus n'est absolument pas triviale.

Le modèle de Langmuir appliqué à l'adsorption des protéines correspond à la réaction :



La constante d'équilibre associée à cette réaction, notée  $K_L$ , est définie par :

$$K_L = e^{\frac{-\Delta_{ads}G}{RT}} \quad (1.12)$$

La constante d'équilibre permet de relier entre elles les différentes concentrations à l'équilibre via :

$$K_L = \frac{[protéine]_{s,ads}}{[protéine]_{solution} \cdot [site]_{s,libres}} \quad (1.13)$$

l'indice  $s$  indique qu'il s'agit d'une concentration surfacique.  $[site]_{s,libres}$  est donc la concentration surfacique en sites libres,  $[protéine]_{s,ads}$  est la concentration surfacique de protéines adsorbées, et  $[protéine]_{solution}$  la concentration volumique en BSA non adsorbée.

Etant donné que  $[protéine]_{s,ads} = [site]_{s,occupés}$ ,

$$K_L = \frac{[site]_{s,occupés}}{[protéine]_{solution} \cdot [site]_{s,libres}} \quad (1.14)$$

En divisant le numérateur et le dénominateur par le nombre total de sites  $[site]_{s,totale}$ , et en introduisant  $\theta = \frac{[site]_{s,occupés}}{[site]_{s,totale}}$  l'équation devient :

$$K_L = \frac{\theta}{[protéine]_{solution} \cdot (1 - \theta)} \quad (1.15)$$

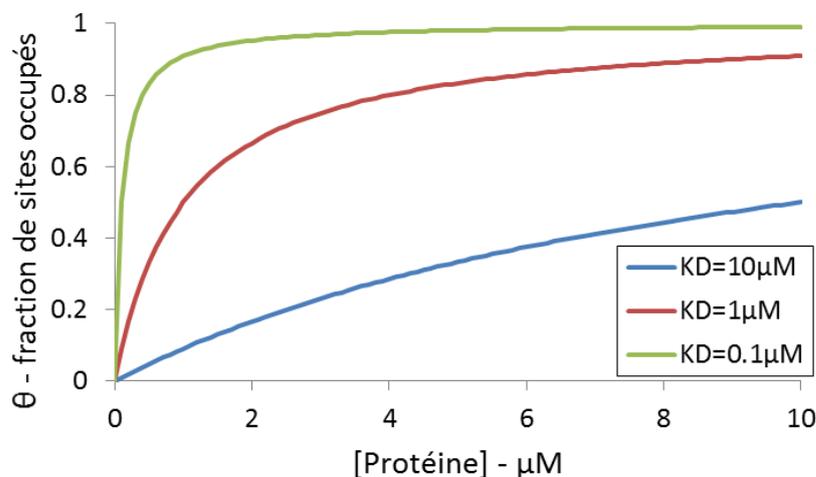
Il est alors possible d'expliciter la fraction de sites occupés :

$$\theta = \frac{K_L [protéine]_{solution}}{1 + K_L [protéine]_{solution}} \quad (1.16)$$

Cette dernière expression est analogue à l'équation 1.10 dans le cas de l'adsorption d'atomes. La constante d'équilibre  $K_L$  inclut donc à la fois la différence de potentiel chimique entre les états en solution et adsorbés - terme en  $e^{\mu^0(T)/kT}$  -, ainsi que l'énergie de changement d'état de la protéine - terme en  $q(T)$ .

**En concentrations volumiques** Les équations précédentes ont été obtenues en raisonnant en concentrations surfaciques pour les concentrations en sites ainsi qu'en protéines adsorbées. Il est aussi possible de mener à bien ce calcul en raisonnant en concentration volumique.

Pour ce faire, considérons que les sites d'adsorption se situent sur des particules sphériques de rayon  $r$  et de concentration  $C_{part}$  - en  $mol.L^{-1}$ . En notant  $[sites]_s$  la concentration surfacique en sites - par exemple en  $mol.dm^{-2}$  -, la concentration volumique en sites s'écrit :



**FIGURE 1.8** – Isotherme de Langmuir pour 3 valeurs de  $K_D$ . Le taux de remplissage des sites  $\theta$  y est représenté en fonction de la concentration en protéines.

$$[sites] = (4\pi r^2)[sites]_s Na C_{part} \quad (1.17)$$

où  $Na$  est le nombre d'avogadro. En appliquant ce passage de concentration surfacique à volumique, l'équation 1.14 devient :

$$K_L = \frac{[site]_{occupés}}{[protéine]_{solution} \cdot [site]_{libres}} \quad (1.18)$$

menant ainsi à la même expression de  $\theta$  :

$$\theta = \frac{K_L [protéine]_{solution}}{1 + K_L [protéine]_{solution}} \quad (1.19)$$

L'application du modèle de Langmuir peut donc aussi bien se faire en raisonnant avec des concentrations surfaciques qu'avec des concentrations volumiques.

Une représentation de l'évolution de  $\theta$  en fonction de  $[protéine]$  se trouve en figure 1.8. Pour une concentration élevée en protéines,  $\theta \rightarrow 1$  alors que pour les faibles concentrations  $\theta \rightarrow K_L [protéine]_{solution}$  : la fraction adsorbée augmente linéairement avec la concentration.

Le paramètre le plus souvent utilisé est plutôt la constante de dissociation  $K_D = 1/K_L$ , son unité étant le  $mol.L^{-1}$ . Pour une quantité initiale en protéine  $[protéine]_0$  et une concentration initiale en site  $[site]_0$ , la concentration finale en protéines adsorbées est :

$$[protéine]_{ads} = \frac{([protéine]_0 + [site]_0 + K_D) - \sqrt{([protéine]_0 + [site]_0 + K_D)^2 - 4[protéine]_0[site]_0}}{2} \quad (1.20)$$

Bien qu'il n'ait pas été développé pour l'adsorption de protéines, ce modèle permet néanmoins d'ajuster parfaitement de nombreuses courbes d'adsorption, comme pour les systèmes suivants :

- nombreuses protéines (dont BSA, HSA, myoglobine) sur une surface de titane [Imamura et al., 2008]
- Transferrines et HSA sur des nanoparticules de FePt [Jiang et al., 2010]
- BSA sur des surfaces rendues hydrophiles ou hydrophobes [Pandey and Pattanayek, 2011]

### Cas $K_D$ petit

Le cas particulier où  $K_D$  est petit mérite de s'y arrêter. Dans le cas où  $K_D \ll [protéine]_0$  et/ou  $K_D \ll [site]_0$ , on obtient soit  $[protéine]_{solution} \ll [protéine]_{ads}$ , soit  $[site] \ll [protéine]_{ads}$  suivant le réactif limitant. La réaction se poursuit tant que les deux réactifs sont en solution : on se trouve dans le cas de la réaction totale :



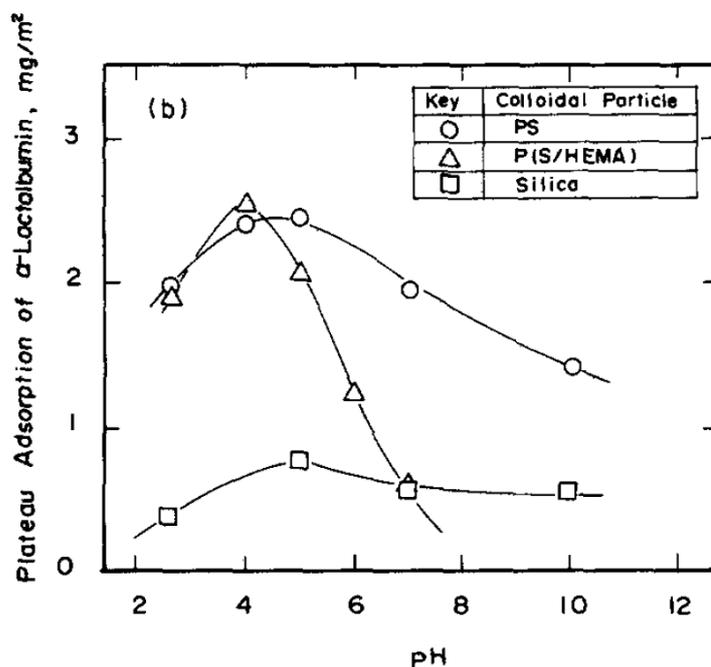
#### 1.4.4 Influence des paramètres externes

D'après cette description, deux paramètres suffisent à décrire l'adsorption des protéines : le nombre de protéines qui peuvent s'adsorber dans une monocouche, et la constante de dissociation  $K_D$ . Outre de la nature de la protéine ainsi que de celle de la surface, ces grandeurs dépendent également de certains paramètres externes, comme expliqué ci-dessous.

#### Effets électrostatiques

Les protéines ainsi que les surfaces étant chargées dans l'eau, les interactions électrostatiques apparaissent à deux niveaux dans le phénomène d'adsorption : entre la surface et la protéine, mais également entre les protéines adsorbées à la surface.

Deux paramètres externes permettent de modifier les interactions électrostatiques. Le premier est la force ionique - via la quantité de sel dans le tampon -, qui modifie la longueur de Debye et donc la distance à laquelle l'interaction sera efficace [Ramsden and Prenosil, 1994; Pasche et al., 2005]. L'autre paramètre est le pH, qui modifie la charge de la surface ainsi que



**FIGURE 1.9** – Adsorption d’ $\alpha$ -lactalbumine sur du polystyrène, de la silice, et sur un copolymère poly-styrène/2-hydroxyethyl methacrylate [Kondo and Higashitani, 1992]. L’adsorption est maximale quand le pH se rapproche du point isoélectrique, à savoir 4.8.

celle de la protéine. De nombreuses études ont été réalisées sur l’effet du pH, conduisant à la conclusion que l’adsorption est maximale au point isoélectrique de la protéine, comme montré sur la figure 1.9.

En effet, au point isoélectrique, la protéine possède autant de charges positives que de charges négatives, elle est donc globalement neutre [MacRitchie, 1972; Kondo et al., 1991; Kondo and Higashitani, 1992; Norde and Favier, 1992; Norde, 1996]. Et il s’agit surtout de la configuration dans laquelle les interactions répulsives entre les protéines sont les plus faibles, permettant une compacité maximale une fois adsorbées. La nature de la surface a également un léger effet, ce pourquoi tous les maxima sur la figure 1.9 ne sont pas exactement à la même position.

Il faut malgré tout garder à l’esprit qu’en étudiant le pH l’électrostatique seul n’est pas toujours sondé. Les protéines pouvant changer de structure avec le pH, il faut s’assurer qu’elles restent dans la même configuration.

### Hydrophobicité

L'hydrophobicité est testée via la nature de la surface. La surface hydrophile la plus utilisée est la silice [Noh and Vogler, 2006] alors que la surface hydrophobe modèle est le polystyrène. Ces deux surfaces ont été utilisées par Kim and Somorjai [2003], alors que dans Martin and Malmsten [1995] la surface hydrophobe a été remplacée par de la silice méthylée, ce qui permet d'obtenir des surfaces plus comparables.

Il en résulte que les protéines s'adsorbent préférentiellement sur les surfaces hydrophobes : les parties hydrophobes situées dans la protéine peuvent créer des liens avec la surface, le reste hydrophile de la protéine étant solvato par l'eau environnante.

#### 1.4.5 Conclusion

L'adsorption de protéines dépend des paramètres thermodynamiques tels le pH et la force ionique. De plus les mesures d'adsorption s'ajustent souvent par un modèle de Langmuir : tout cela indique que le phénomène d'adsorption est un processus régi par la thermodynamique, avec un  $K_D$  dépendant des paramètres physico-chimiques. Les différents résultats ont donc amené différents modèles pour l'adsorption des protéines.

## 1.5 Les modèles d'adsorption

Plusieurs observations ont montré les limites du modèle de Langmuir, menant à différentes améliorations. Ces évolutions sont présentées dans cette partie, en partant du cas sans interactions entre protéines, jusqu'au cas de l'adsorption en multi-couches.

### 1.5.1 Absence d'interactions

Tout d'abord, proche du modèle de Langmuir, le modèle de *random Sequential Adsorption* a parfois été utilisé [Jin et al., 1993]. Dans ce modèle les protéines s'adsorbent irréversiblement à des endroits aléatoires sur la surface ; la seule contrainte est qu'il n'y ait pas de chevauchement avec les autres protéines adsorbées. Elles ne peuvent ni se déplacer ni changer de conformation, les seules différences avec un modèle irréversible de type Langmuir - avec  $K_D$  petit - sont la quantité de sites d'adsorption ainsi que la cinétique d'adsorption. De par ces limitations il n'a été que peu utilisé.

### 1.5.2 Effets individuels

Une des hypothèses du modèle de Langmuir est que l'objet qui s'adsorbe est dans le même état qu'il soit adsorbé ou en solution. Cette hypothèse a été infirmée par plusieurs mesures qui montrent un changement de conformation des protéines au cours de l'adsorption.

Ces effets de changement de conformation sont particulièrement pertinents quand il est important que la protéine adsorbée conserve sa même activité. Ce ne serait pas le cas si un changement de structure important se produisait.

### Le dichroïsme circulaire

La méthode phare pour l'étude de la structure secondaire des protéines est le dichroïsme circulaire. Il repose sur le principe que les hélices  $\alpha$ , les coudes ou les feuillets  $\beta$  absorbent différemment la lumière suivant si elle est polarisée droite ou gauche. Les différences de spectre obtenus dans l'UV permettent alors de connaître la nature de la structure secondaire.

Grâce à cette technique il a pu être montré que la BSA, une fois adsorbée sur des particules de silice, voit une partie de ses hélices  $\alpha$  et de ses feuillets  $\beta$  remplacés par une structure désordonnée [Giacomelli and Norde, 2001]. Il a aussi été montré que la BSA désorbée d'une surface hydrophobe garde en mémoire sa dénaturation partielle et ne recouvre pas totalement sa conformation d'avant adsorption [Norde and Giacomelli, 2000].

### Influence sur la désorption

Dans certains cas de la désorption est observée, et le changement de conformation y a un rôle important. Ceci a été mis en évidence par Docoslis et al. [2001] : de la HSA a été adsorbée sur des particules de silice, pendant une durée de 1h ou 24h. Il apparaît que la désorption se fait dans des proportions plus importantes pour les faibles temps d'adsorption : en 24h les protéines ont plus le temps d'explorer les configurations les plus stables à la surface, la désorption n'en est donc que plus difficile.

### Adsorption de protéines déformées

Une façon d'observer l'importance de la conformation sur l'adsorption est de modifier au préalable la conformation des protéines avant de les adsorber. C'est ce qu'ont réalisé Norde and Anusiem [1992] avec de la morpholine et des ions calcium, deux agents connus pour leur capacité de dénaturation.

Dans les deux cas la protéine s'adsorbe en plus grande quantité une fois dénaturée : dépliée, la protéine peut explorer un plus grand nombre de conformations à la surface et peut donc plus aisément atteindre une conformation stable.

### 1.5.3 Interactions latérales

Outre ce changement de la protéine isolée, il a été montré que les protéines interagissent également entre elles, et ce en fonction des conditions extérieures.

#### Variation de la quantité adsorbée

Les quantités de protéines adsorbées dépendent fortement du pH, il est donc probable que les interactions entre protéines jouent un rôle important. En effet plus les protéines sont chargées, plus elles ont tendance à inhiber toute adsorption dans un certain rayon autour de leur position. Ces interactions pourront aussi induire une réorientation des protéines adsorbées.

***Side-on ou end-on*** Une protéine géométriquement anisotrope (tel un cigare) a deux possibilités principales pour s'adsorber sur une surface. La première est de s'adsorber via son extrémité (on parle d'adsorption *end-on*) ou elle s'adsorbe sur le côté (*side-on*). Si la protéine s'adsorbe immédiatement dans la configuration favorisée, les modèles sont difficiles à séparer. Dans le cas d'une première adsorption aléatoire (ou au moins différente de l'état d'équilibre), il est possible de déterminer l'état favorisé.

Si l'adsorption se fait tout d'abord *side-on*, mais que dans un deuxième temps les protéines se reconfigurent lentement et irréversiblement en *end-on*, la quantité totale adsorbée augmentera tout d'abord rapidement, puis plus lentement jusqu'à atteindre le cas où elles sont toutes en *end-on*. Ce profil a été observé pour l'adsorption de BSA sur des surfaces hydrophobes [Yoon et al., 1998].

Dans le cas inverse, le passage progressif de *end-on* (compacité maximale) à *side-on* entraîne un passage par un maximum d'adsorption (*overshoot*) avant que celle-ci ne décroisse jusqu'à atteindre l'équilibre [Rabe et al., 2007]. Ce phénomène a été observé dans le cas de lysozymes sur des surfaces hydrophobes [Wertz and Santore, 2001].

Ces deux processus sont représentés dans la figure 1.10. La figure 1.11 illustre la nécessité pour les protéines d'effectuer un réarrangement à la surface, cette fois-ci en fonction de la quantité de protéines adsorbées. Cette nécessité est liée à la répartition anisotrope des charges à la surface, le minimum d'énergie n'est donc pas atteint pour la même configuration suivant la densité surfacique de protéines.

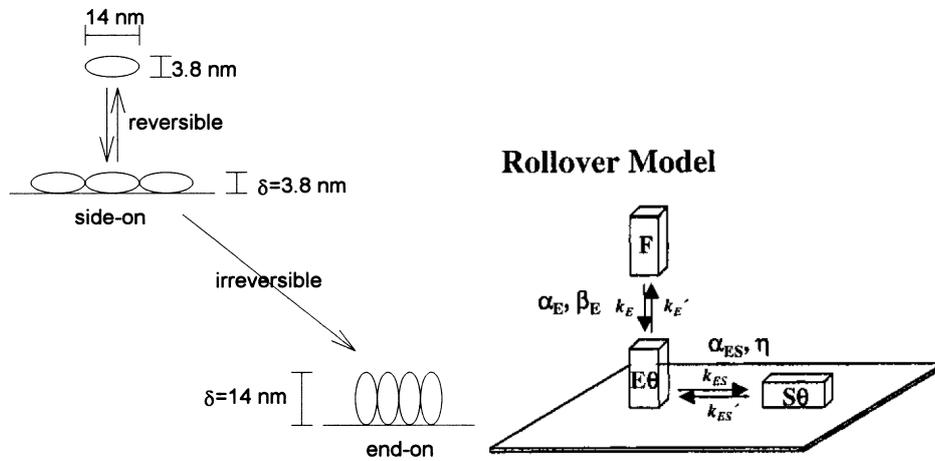


FIGURE 1.10 – Gauche : l'adsorption *end-on* est favorisée pour le système BSA - surface hydrophobe (figure provenant de Yoon et al. [1998]). Dans le cas de l'adsorption de lysozymes sur des surfaces hydrophobes, l'adsorption *side-on* est favorisée (figure issue de Wertz and Santore [2002]).

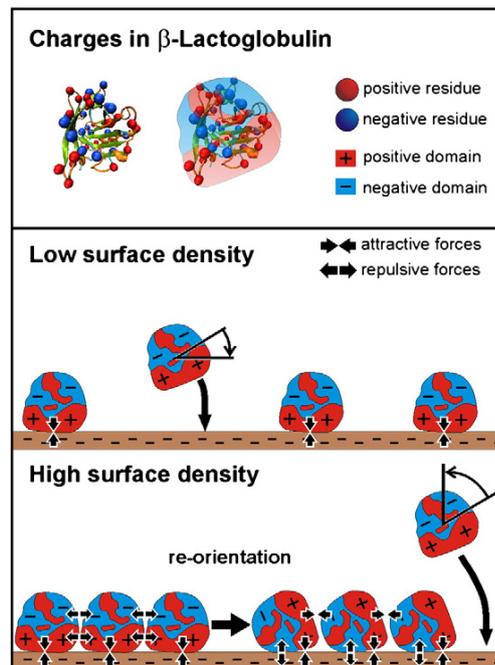


FIGURE 1.11 – Adsorption d' $\alpha$ -lactoglobuline [Rabe et al., 2007].

Ce changement d'orientation des protéines a également pu être observé en réflexion de neutrons ; lors de l'adsorption de lysozymes sur une surface en silice [Su et al., 1998] ou lors de l'adsorption de la BSA à l'interface eau/air [Lu et al., 1999].

### 1.5.4 Adsorption multicouches

Pour finir, si l'affinité entre les protéines est suffisamment forte, elles peuvent coller entre elles ; cela donne naissance à des multicouches. Cette adsorption multi-couches a par exemple été observée en AFM lors de l'adsorption de BSA sur des particules de polystyrène [Kowalczyńska et al., 2011].

Ce modèle a également été utilisé pour l'adsorption de la transferrine sur des particules de polystyrène [Milani et al., 2012]. Deux comportements ont été observés : une partie des protéines adsorbées l'est de façon irréversible, alors que l'autre partie est capable de se désorber facilement. La couche irréversible correspondrait à la première couche adsorbée alors que la deuxième - voire la troisième - s'adsorbe de façon réversible.

Cependant, l'utilisation de tous ces modèles nécessite des données suffisamment précise pour justifier leur usage. Il arrive que ce ne soit pas le cas, les auteurs préfèrent alors généralement utiliser le modèle initial de Langmuir [Yeung et al., 2009].

### 1.5.5 La réversibilité

D'après le modèle de Langmuir, à l'équilibre les concentrations des différentes espèces sont reliées par la relation :

$$K_D = \frac{[protéine]_{solution} \cdot [site]}{[protéine]_{ads}}$$

Si un rinçage est effectué ( $[protéine]_{solution} \sim 0$ ), les protéines adsorbées doivent alors se désorber afin de rejoindre l'équilibre.

Mais ceci n'est généralement pas observé. Ainsi, dans le cas de la BSA ou des lysozymes adsorbés sur des particules de silice, aucune désorption n'est observée, et ce quelque soit le pH [Norde and Anusiem, 1992; Sander et al., 2010]. Il en va de même pour la transferrine sur les nanoparticules de polystyrène, au moins la première monocouche [Milani et al., 2012].

Il est cependant à noter que dans certains systèmes une réversibilité partielle est observée [Kurrat et al., 1994; Ramsden, 1995], mais cette réversibilité est trop faible pour valider le modèle de Langmuir.

### En changeant le pH

L'adsorption de protéines est donc un phénomène le plus souvent irréversible par dilution dans le milieu. Cependant, la quantité adsorbée dépendant fortement du pH et de la force ionique, elles ont deux possibilités : ne pas être sensible aux nouvelles conditions et ainsi rester figées dans l'état adsorbé ; ou être encore sensible à l'environnement. Dans le dernier cas un changement de pH pourrait permettre une plus grande adsorption ou entraîner la désorption de particules.

Les mesures donnent un résultat intermédiaire. Après 12h d'adsorption de HSA à pH 7.4 sur des particules de silice, Docoslis et al. [2001] ont laissé la désorption dans des solutions dont le pH allait de 3 à 10.5. La quantité désorbée dépend du pH, plus ce dernier est élevé et plus la quantité désorbée est grande. Néanmoins même à pH 10.5 seuls 40% de la HSA adsorbée s'est désorbée. Or à un tel pH l'adsorption de la HSA est quasiment inexistante.

### Par ajout d'agents dénaturants

Les agents dénaturants modifient la structure secondaire des protéines, qui voient leurs propriétés modifiées. Outre les agents physiques comme la température, on trouve également des dénaturants chimiques. Certains, les ions chaotropes [Baldwin, 1996] comme l'urée, dénaturent via l'abaissement de l'énergie des liaisons hydrogènes. D'autres, comme les thiols, détruisent les ponts disulfures.

L'urée et la morpholine ont été étudiées par Docoslis et al. [2001]. Ces agents ont été ajoutés à des solutions de silice préalablement saturées de protéine. Il s'avère que ces agents améliorent la désorption, probablement en dénaturant les protéines à la surface et donc en détruisant les interactions entre les protéines et la surface.

### Surfaces liquides et gazeuses

La mesure de la tension de surface a permis de montrer que l'albumine s'adsorbe aussi irréversiblement à une interface eau/air [Hansen and Myrvold, 1995; Fainerman et al., 2003].

Plus récemment Miller et al. [2005] ont montré que l'adsorption de protéines aux interfaces liquides n'est pas un phénomène irréversible, mais que les temps caractéristiques de désorption sont  $10^4$ - $10^8$  fois plus importants que ceux obtenus pour les surfactants habituels, ce qui explique la difficulté de la mesure de la désorption. Cette importante différence n'est cependant toujours pas expliquée.

## 1.6 Conclusion

Dans de nombreuses applications, en particulier médicales, des surfaces homogènes sont mises au contact de protéines. Afin d'améliorer les produits concernés, il est donc important de bien connaître le phénomène d'adsorption de protéines sur les surfaces.

L'étude de l'adsorption de protéines est extrêmement complexe, principalement de par l'extrême variabilité des protéines. Il a cependant été observé depuis plusieurs dizaines d'années que les protéines en solution s'adsorbent sur les surfaces, qu'elles soient gazeuses, liquides ou solides. Cette adsorption est le plus souvent irréversible, ce qui serait dû à une dénaturation partielle de la protéine à l'interface. Enfin, de manière apparemment contradictoire, la quantité de protéines adsorbées dépend des conditions physico-chimiques, tel pH et force ionique.

Cette dépendance avec les paramètres physico-chimiques rappelle une adsorption selon le modèle de Langmuir, la constante d'équilibre  $K_D$  dépendant du pH et de la force ionique. Ce modèle étant basé sur un équilibre entre les fractions adsorbées et désorbées, il implique qu'une désorption doit se produire par dilution ; dans les cas majoritaires où l'adsorption est irréversible, ce modèle n'est donc pas valable. Malgré cela, il demeure encore utilisé dans plusieurs études, le  $K_D$  rendant compte de l'évolution de la quantité de protéines adsorbées [Luey et al., 1991].

On observe ici une des contradictions bien connues sur l'adsorption des protéines [Czeslik, 2004; Rabe et al., 2011], notamment mises en évidence par le titre évocateur de Ramsden [1995] : *Puzzles and paradoxes in protein adsorption*. L'interprétation des résultats obtenus est donc plus complexe, ce qui était prévisible : une protéine de 60kDa ne se compare pas si facilement à un atome.

La littérature contient donc de très nombreuses études, dans lesquelles le plus souvent la nature de la surface et de la protéine varient. Or l'adsorption n'étant toujours pas expliqué pour un unique couple surface - protéine, des résultats sur différents modèles ne permettent pas de mieux comprendre le phénomène. C'est pourquoi, dans la partie suivante, nous nous attacherons à caractériser au mieux un unique couple surface - protéine modèle : connaître l'influence de l'ensemble des paramètres pour ce couple peut permettre de correctement expliquer le phénomène.

Avant de s'intéresser aux mesures effectuées à ce sujet, une application développée durant la thèse où l'adsorption a un effet particulièrement limitant est présentée : l'immuno-agglutination sur particules magnétiques.



## Chapitre 2

# Mesure d'agrégation par orientation magnétique

### 2.1 Introduction

Les mesures d'agrégation de colloïdes sont utilisées dans de nombreux cas. Tout d'abord à des fins fondamentales, où elles permettent d'estimer l'intensité des interactions entre des particules. Etant donné qu'une mesure directe des énergies d'interaction entre colloïdes est délicate à réaliser, une observation indirecte est souvent préférée, comme la mesure de l'agrégation de ces colloïdes. Ceci peut donc permettre d'étudier l'effet de la nature du sel sur l'agrégation de particules hydrophiles ou hydrophobes, mettant ainsi en lumière les séries de Hofmeister [Peula-Garcia et al., 2010]. Dans certains cas des particules peuvent également s'agréger à cause de protéines en solution, les mesures d'agrégation permettent donc de quantifier ce phénomène - ceci sera réalisé dans la partie 4.

D'un point de vue plus appliqué, certaines utilisations nécessitent une bonne dispersion des particules, comme les encres. D'autres en revanche nécessitent une floculation, comme pour les boues d'épuration dans le cadre du traitement de l'eau. Dans ces deux cas il est essentiel d'avoir des outils performants qui permettent de correctement caractériser la dispersion des objets.

Enfin, la mesure de l'agrégation de particules est utilisée dans le cadre du diagnostic médical. La présence de protéines cibles est révélée en faisant agréger les colloïdes : la mesure d'agrégation de gros objets est en effet beaucoup plus facile à réaliser que la recherche directe de petites protéines.

Pour toutes ces applications, il est fondamental d'avoir des outils qui permettent de quantifier au mieux l'agrégation, même pour les régimes où l'agrégation est très faible. C'est l'objet



**FIGURE 2.1** – Mallette commercialisée par Bertin utilisant la technique MOA.

de la méthode présentée dans ce chapitre, méthode qui a été développée sur des particules magnétiques de typiquement 200nm : la Méthode d'Orientation des Agrégats (MOA).

Il s'agira tout d'abord de présenter et caractériser cette méthode, qui permet de quantifier la présence d'un très faible quantité de doublets dans une solution de singulets. Cette méthode sera ensuite appliquée au diagnostic médicale, tout d'abord pour la détection d'une cible modèle - la BSA-biotine - puis pour la détection d'une protéine détectée cliniquement - la protéine C-réactive. Cette méthode servira également dans la partie 4, où elle permettra l'étude de l'agrégation non spécifique induite par les protéines.

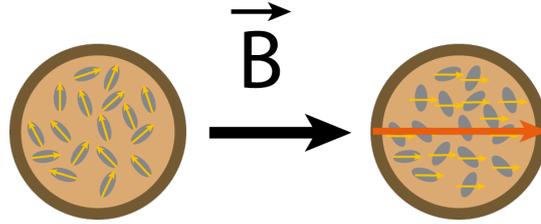
Le travail de ce chapitre est le fruit d'une collaboration avec Elodie Brient-Litzler et Eric Compain (Bertin Technologies) pour la mise au point de la la méthode, puis avec Aurélien Daynès (Horiba Medical) pour les essais sur la protéine C-réactive. Après validation cette méthode a finalement été implémentée dans les détecteurs d'agents pathogènes de Bertin dans le cadre de la biodéfense, dont un exemplaire est montré en figure 2.1.

## 2.2 Orientation d'agrégats

### 2.2.1 Le magnétisme des particules

Les colloïdes utilisés dans ce chapitre possèdent des propriétés magnétiques provenant de la maghémite  $\gamma Fe_2O_3$  situés dans leur coeur.

La maghémite est constituée de deux sous-réseaux de Fe[II] et Fe[III]. Ces ions ont des moments magnétiques opposés mais d'amplitude différente, le matériau est donc ferrimagnétique et possède une aimantation permanente.



**FIGURE 2.2** – Apparition du moment de la bille en présence d'un champ magnétique externe. La particule possède une aimantation nulle au repos du fait de la décorrélation des moments des grains. En présence d'un champ, ces derniers s'alignent et entraînent l'apparition d'un moment non nul.

### Le magnétisme des grains

Les grains de maghémite étant de petite taille ( $< 20\text{nm}$ ), ils ont la particularité d'être monodomaine. En l'absence de champ ils ont un moment magnétique propre, dont l'orientation varie aléatoirement à cause de l'agitation thermique. Cette orientation n'est pas reliée à son orientation géométrique.

En raison de sa composition le matériau superparamagnétique est souvent décrit par analogie au diamagnétisme de Langevin. Au début du  $\text{XX}^{\text{ème}}$  s. ce dernier explique le paramagnétisme par l'orientation progressive en présence d'un champ extérieur des moments permanents portés par les atomes du matériau [Pérez et al., 2002].

Il en va de même ici, où c'est l'alignement des moments des grains - et non des atomes - qui entraîne l'apparition d'un moment induit en présence de champ (figure 2.2). En notant  $m$  le moment d'un grain, et en introduisant  $\xi = \frac{mB}{k_B T}$  - où  $B$  est le champ magnétique externe -, l'aimantation totale d'un échantillon est alors décrit par :

$$M = NmL(\xi)$$

où  $L(\xi) = \coth(\xi) - 1/\xi$  est la fonction de Langevin - cf figure 2.3.

En l'absence d'un champ externe, l'aimantation totale de la particule est donc nulle. En présence d'un champ magnétique de faible intensité (typiquement  $< 20\text{mT}$ ), l'aimantation de la particule - de volume noté  $V$  - augmente linéairement avec le champ magnétique :  $\vec{m} = \chi V \vec{H}$  où  $\chi$  est la susceptibilité magnétique.

Pour les assemblages de grains de maghémite cette valeur  $\chi$  est élevée - proche de 1. Pour comparaison les susceptibilités des métaux paramagnétiques comme l'aluminium ou le lithium sont de l'ordre de  $10^{-5}$ ; cette valeur élevée confère au matériau le qualificatif de superparamagnétique.

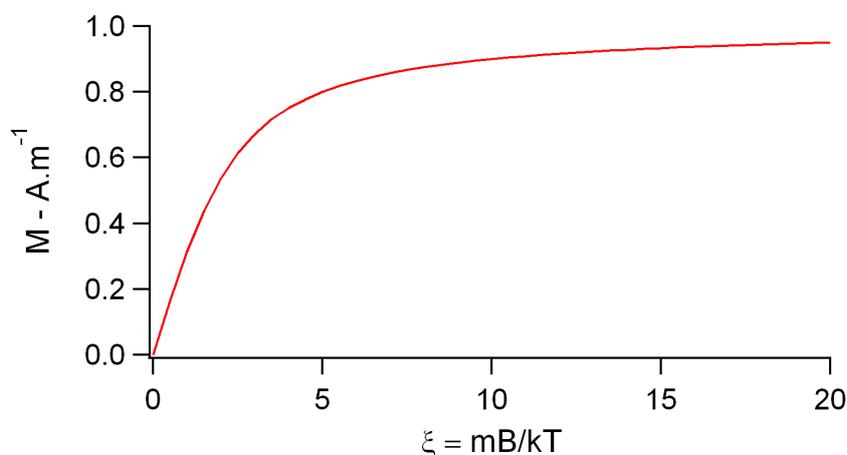


FIGURE 2.3 – Fonction de Langevin décrivant l'évolution de l'aimantation d'un échantillon avec  $\xi$ .

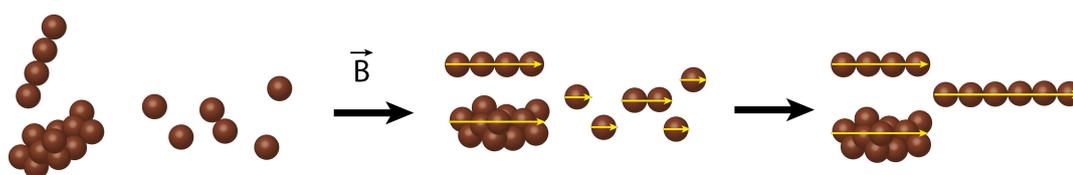


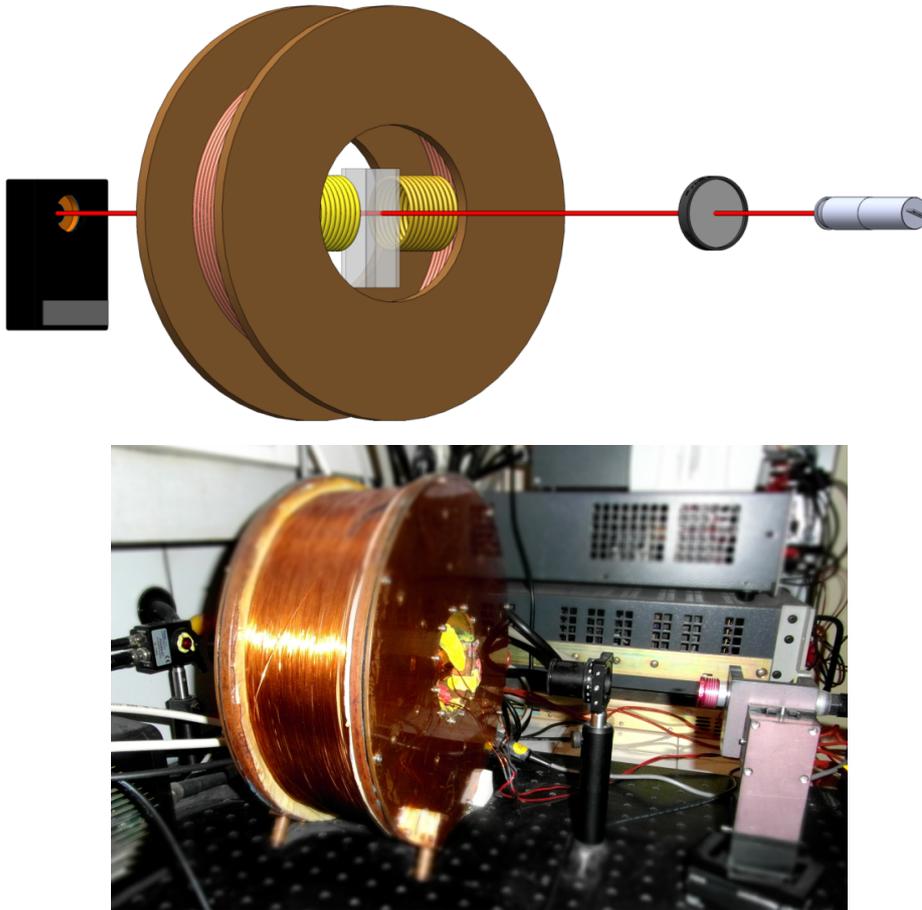
FIGURE 2.4 – L'application d'un champ magnétique entraîne l'alignement des agrégats avec le champ. Si le champ est suffisamment intense et appliqué pendant une durée suffisante, le chaînage apparaît.

### Les comportements collectifs

Sous aimantation les billes sont soumises à l'interaction dipôle-dipôle. Les dipôles tendent à s'aligner, ce qui se traduit par deux phénomènes (figure 2.4) :

- les agrégats anisotropes s'orientent avec le champ
- deux billes subissent une force répulsive perpendiculaire au champ mais attractive parallèle au champ, elles s'assemblent sous forme de chaîne

Le phénomène d'orientation apparaissant avant le chaînage, il est possible d'observer la rotation de clusters sans former de chaîne : c'est l'essence même de la Méthode d'Orientation des Agrégats (MOA). Si des agrégats sont présents dans la solution, leur orientation permet de révéler leur présence par une simple mesure de densité optique. Une analyse détaillée dans le cas de la présence de doublets est réalisée ci-après.



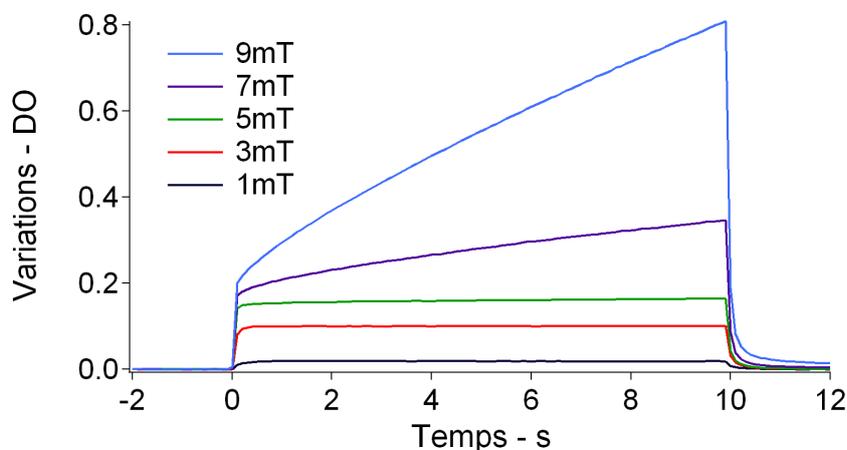
**FIGURE 2.5** – Montage expérimental de la MOA. Le signal issu d'une diode laser polarisée est passé au travers de la cuve avant d'être recueilli par une photodiode. Une grosse bobine ainsi que deux plus petites permettent l'application des champs de chaînage (20mT) et de mesure MOA (5mT).

### 2.2.2 Montage expérimental

Il convient tout d'abord de présenter le montage expérimental réalisé pour cette étude. Ce montage doit permettre une acquisition en continue de la densité optique et l'application de deux champs magnétiques distincts : un parallèle et un perpendiculaire au faisceau laser.

Le montage est visible dans la figure 2.5.

La source lumineuse est une diode laser très stable ULN-Series de Coherent, émettant de la lumière polarisée rectiligne à 635nm. Cette longueur d'onde a été retenue car l'oxyde de fer n'y absorbe que faiblement la lumière comparativement à une plus faible longueur d'onde ; et le signal de diffusion de la lumière est néanmoins satisfaisant. Derrière la cuve, le faisceau est analysé par une photodiode - Thorlabs, PDA36A-EC - et la tension est mesurée par un multimètre Agilent 34410A. Une première bobine - diamètre intérieur 10cm - génère un fort



**FIGURE 2.6** – Variations de DO de billes non greffées (0,04% w/v) sous différentes valeurs de champ magnétique axial. Le champ est appliqué pendant 10s. A partir de 7mT le chaînage apparaît, alors que seule l'orientation d'agrégats initialement présents est observée pour les champs plus faibles.

champ magnétique axial  $B_A$  selon l'axe du laser. Un champ transverse  $B_T$ , perpendiculaire au laser, est généré par deux petites bobines situées dans la bobine précédente. L'échantillon est placé dans une cuvette de spectromètre ; le trajet optique est de 10mm. Aucun analyseur n'est placé après la cuve.

Afin d'automatiser l'acquisition, tous les appareils sont pilotés par le logiciel LabVIEW.

### 2.2.3 Orientation vs chaînage

La figure 2.6 montre l'évolution de la densité optique avec le temps d'application d'un champ magnétique pour des billes magnétiques non greffées. Les deux phénomènes précédemment décrits y sont visibles : l'orientation rapide des agrégats suivie du phénomène plus lent du chaînage.

#### Temps caractéristique d'orientation

Pour la MOA le champ magnétique doit être appliqué sur une durée suffisamment longue pour permettre aux doublets de s'orienter. Si le champ magnétique est faible, le temps caractéristique de rotation  $\tau_R$  est donné par la diffusion rotationnelle :

$$\tau_R \sim \frac{1}{D_R}$$

où  $D_R$  est le coefficient de diffusion rotationnel pour un doublet [Carrasco and de la Torre, 1999] :

$$D_R = \frac{kT}{3.76 \times \pi \eta R^3}$$

où  $\eta$  est la viscosité du milieu ( $\eta=0.001$  Pa.s),  $\tau_R \sim 20$ ms. A noter que pour des champs plus forts, la rotation est plus rapide, et comme détaillée dans Ranzoni & Al [Ranzoni et al., 2010] :

$$\tau_R \sim \frac{1}{B^2}$$

Ces valeurs peuvent être comparées aux temps caractéristiques de relaxation expérimentaux (cf figure 2.6). Les variations de DO sont exponentielles quand le champ est mis en route, avec  $\tau_{on} \sim 12$ ms à 5mT, en bon accord avec nos estimations précédentes.

Afin d'avoir le temps d'effectuer une mesure fiable de DO, une durée d'aimantation de 250ms a été retenue.

La valeur de DO atteinte après  $\sim 12$ ms est fonction de l'intensité du champ magnétique. Ceci illustre le phénomène de compétition entre l'alignement des particules avec le champ magnétique et la désorientation due à l'agitation thermique (cf 2.2.1).

### Limite orientation - chaînage

Pour  $B < 6$ mT, la densité optique atteint rapidement un plateau, alors qu'elle augmente continuellement avec le temps si  $B > 6$ mT. Ce seuil correspond au processus de chaînage ; ce dernier apparaît quand l'énergie d'interaction entre deux billes au contact est plus grande que l'agitation thermique  $k_B T$  [de Gennes and Pincus, 1970] :

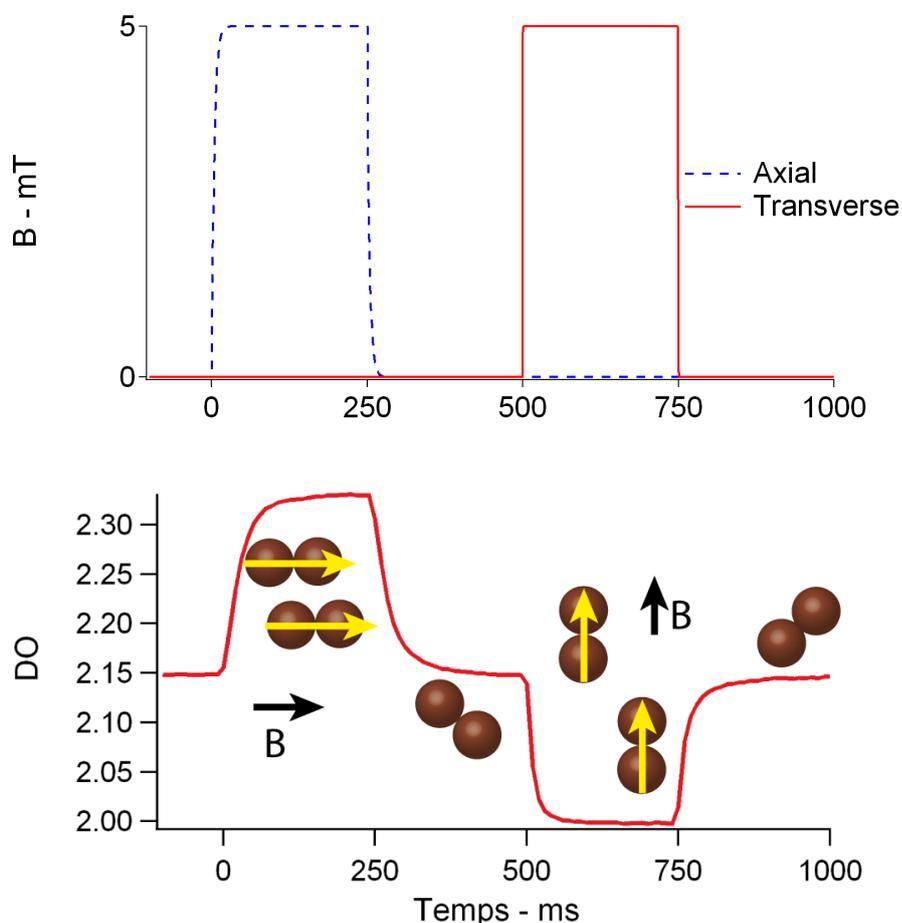
$$U_m = \frac{\pi R^3 B^2}{18 \mu_0} \sim k_B T$$

où  $\mu_0$  est la perméabilité magnétique,  $R$  le rayon de la bille,  $k_B$  la constante de Boltzman et  $T$  la température (la susceptibilité magnétique de la particule est proche de 1 [Dreyfus et al., 2009]). Une application numérique dans nos conditions donne  $B \sim 5$ mT, en bon accord avec les mesures précédentes.

Cette valeur de 5mT a donc été retenue, durant 250ms, pour obtenir le meilleur signal sans observer de chaînage. De plus, il est remarquable que même sur l'échantillon non agrégé de particules il y a du signal lié à l'agrégation. Ceci signifie que des petits agrégats sont présents, même dans les billes simplement diluées en tampon.

#### 2.2.4 Principe de la méthode

La MOA consiste à appliquer 250ms de champ magnétique axial et 250ms de champ transverse séparés par une relaxation de 250ms. Expérimentalement un champ magnétique de 5mT



**FIGURE 2.7** – Haut : application des champs axial puis transverse. Bas : variations de densité optique associées sur un échantillon de billes à 0.04% w/v.

a été retenu afin de n'observer que l'orientation. A cette valeur une durée d'aimantation de 250ms est suffisante pour atteindre l'état stationnaire. Ces paramètres permettent d'orienter les agrégats sans former de chaînes qui contribueraient de façon non désirée à la densité optique. L'amplitude MOA est la différence entre le maximum et le minimum de la densité optique durant cette séquence, un exemple se trouve en figure 2.7 (le sens des variations est expliqué ci-après). L'intérêt de cette méthode est que cette amplitude est uniquement liée aux agrégats : les billes isolées n'apportent aucune contribution.

Cette mesure pourrait bien sûr être réalisée avec une seule orientation des agrégats au lieu de deux ; l'application de deux champs a été retenue car elle fournit un signal deux fois plus important.

Dans un premier temps, les variations de densité optique théoriques vont être présentées. Elles seront ensuite confrontées aux variations expérimentales obtenues sur des Bio-Adembeads

Streptavidin de 200nm.

### 2.2.5 Théorie - cas des doublets

Quand un faisceau lumineux traverse une solution colloïdale, l'intensité lumineuse qui arrive est plus faible que l'intensité incidente : c'est le phénomène d'extinction. L'extinction peut être due à deux phénomènes : l'absorption et la diffusion.

Considérons une particule illuminée par le faisceau. Prenons la fraction lumineuse non transmise égale à l'énergie lumineuse incidente sur une surface  $C_{ext}$ . On obtient ainsi la section efficace d'extinction, somme des sections efficaces d'absorption et diffusion :

$$C_{ext} = C_{abs} + C_{scat}$$

Dans notre cas où les particules sont grandes, l'absorption est négligeable devant la diffusion à la longueur d'onde de travail - 635nm. On considère donc que  $C_{ext} = C_{scat}$ .

La densité optique est définie par  $DO = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$ , où  $I_0$  est l'intensité du laser mesurée à la photodiode en l'absence d'échantillon et  $I$  est l'intensité mesurée en présence de l'échantillon. Pour une solution de  $N_{sing}$  particules sphériques isolées de diamètre  $R$  et de surface efficace de diffusion  $C_{scat,sing}$ , elle vaut, d'après la loi de Beer-Lambert :

$$DO = hC_{scat,sing} \frac{N_{sing}}{\ln(10)}$$

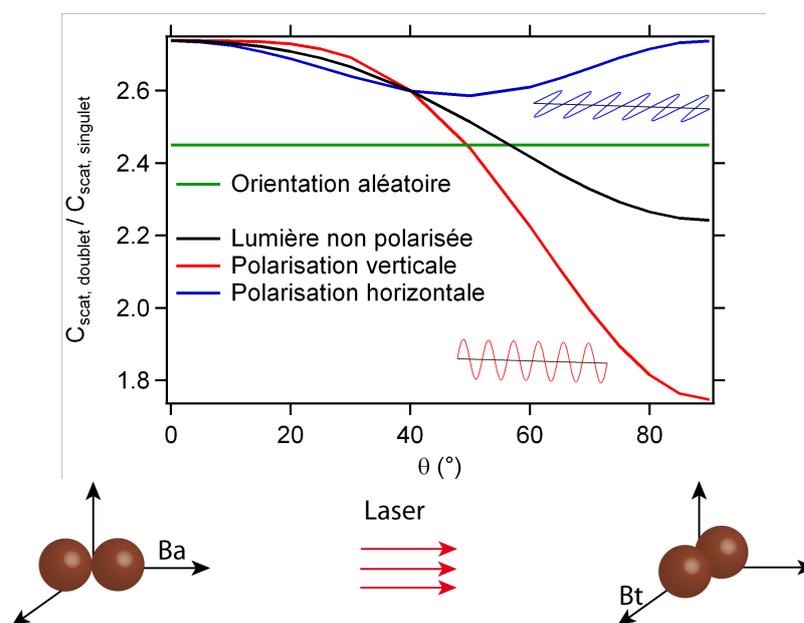
où  $h$  est la longueur du trajet optique. Si des doublets de surface efficace  $C_{scat,doub}$  sont présents en solution, la densité optique devient :

$$DO = \frac{h}{\ln(10)} (C_{scat,sing} N_{sing} + C_{scat,doub} N_{doub})$$

$$\text{ou encore } DO = hC_{scat} \frac{N_{sing} + \alpha N_{doub}}{\ln(10)}$$

en introduisant  $\alpha = \frac{C_{scat,doub}}{C_{scat,sing}}$  le ratio entre les intensités diffusées par un doublet orienté aléatoirement et une bille seule, et en notant plus simplement  $C_{scat}$  au lieu de  $C_{scat,sing}$ .

Dans le cas d'un objet allongé - comme un doublet - l'intensité diffusée diffère selon son orientation : c'est l'essence de notre méthode. Cette valeur  $\alpha$  peut être estimée en utilisant la méthode "T-matrix" [Van De Hulst, 1981], réalisable avec un logiciel gratuit (<ftp://ftp.eng.auburn.edu/pub/dmckwski/scatcodes/index.html>). Les paramètres utilisés sont l'indice de réfraction - 1.78 + 0.02i - et le rayon des particules - 100nm.



**FIGURE 2.8** – Ratio des sections efficaces de diffusion entre un doublet et une bille seule. Dans le cas d'une orientation aléatoire ce ratio est noté  $\alpha$ , pour  $\theta = 0$  il s'agit de  $\beta_A$  et pour  $\theta = 90$  il s'agit de  $\beta_T$ . L'orientation aléatoire correspond à l'absence de champ magnétique.

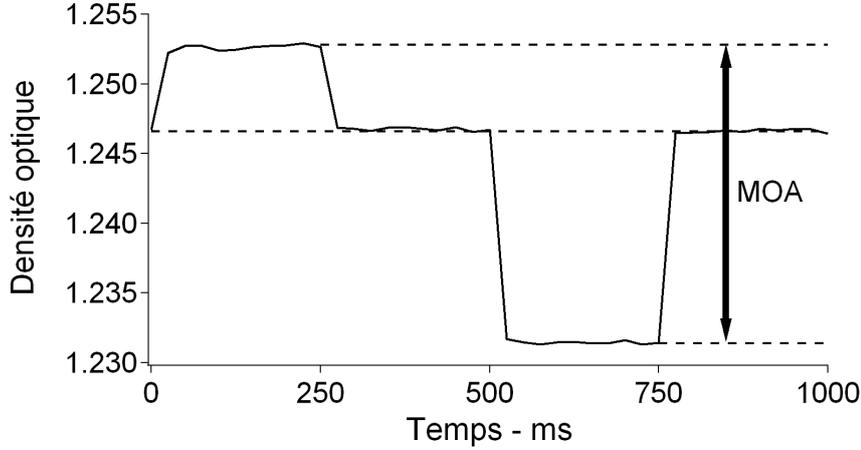
### Effet de l'orientation des doublets

La MOA utilise la propriété qu'un doublet diffuse la lumière différemment s'il est parallèle au faisceau laser - aligné avec  $B_A$  - ou s'il lui est perpendiculaire - aligné avec  $B_T$ . Dans le premier cas le ratio entre lumière diffusée par un doublet et par deux billes séparées est noté  $\beta_A$ , il est noté  $\beta_T$  dans le second. La simulation numérique en figure 2.8 montre l'évolution de ces paramètres pour différentes polarisations du laser en fonction de  $\theta$ .  $\theta$  est l'angle entre le faisceau et le doublet,  $\theta = 0$  est obtenu en présence du champ axial alors que  $\theta = 90^\circ$  est obtenu durant le champ transverse.

### Effet de la polarisation

Si l'ensemble des doublets ont une orientation aléatoire, la densité optique mesurée ne dépend pas de la polarisation du laser. Il en va de même pour  $\beta_A$  qui ne dépend pas non plus de la polarisation. Or, comme montré sur la figure 2.8, la valeur de  $\beta_T$ , qui correspond à  $\theta = 90$ , en dépend elle fortement.

La simulation prévoit donc des comportements distincts durant le champ transverse. Afin d'observer les variations de signal les plus importantes possibles, il est donc préférable d'utiliser une polarisation verticale à une polarisation horizontale ou à un laser non polarisé : le paramètre



**FIGURE 2.9** – Variations de densité optique en polarisation verticale pendant une MOA pour un échantillon faiblement agrégé. La densité optique augmente pendant le champ transverse ( $\beta_A > \alpha$ ) puis diminue pendant le champ transverse ( $\beta_T < \alpha$ ).

( $\beta_A - \beta_T$ ) est maximisé.

### 2.2.6 Validation de la méthode

D'après les valeurs de  $\alpha$ ,  $\beta_A$  et  $\beta_T$  dans le cas d'une polarisation verticale, la variation de densité optique durant le champ transverse doit être plus importante que durant le champ axial car  $(\alpha - \beta_T) = 2.6(\beta_A - \alpha)$ . L'amplitude de la MOA est la différence de densité optique alors que les agrégats sont alignés selon les deux champs :

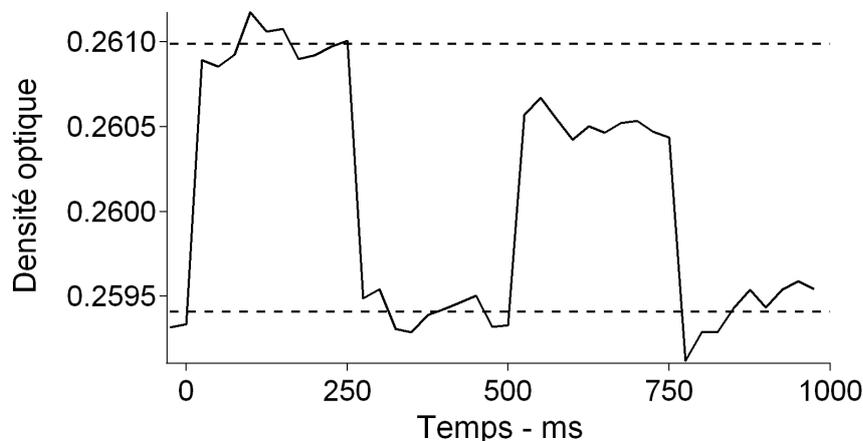
$$MOA = hC_{scat} \frac{(\beta_A - \beta_T)N_{doub}}{\ln(10)}$$

1pM de doublets engendre donc théoriquement un signal de 19mDO. Cette valeur peut être comparée à la densité optique de la solution à 0.02% égale à 1 DO.

Cette théorie peut être vérifiée, avec un échantillon le plus propre possible afin qu'il ne contienne que des singulets et des doublets. Comme indiqué en annexe C, les Adembeads Streptavidin ont pour ce faire été centrifugées 1min. La MOA obtenue est visible sur la figure 2.9.

Le signal y est de 21mDO, environ 1pM de doublets est donc présent. Cette valeur est faible comparée aux 50pM de billes dans la solution, confirmant que notre échantillon était faiblement agrégé : ce signal est seulement dû aux doublets. Le ratio entre les variations durant les champs transverse et axial est de 2.4 (variations respectives de 15 et 5.8mDO), valeur très proche des 2.6 théoriques et qui confirme l'analyse théorique effectuée.

Il est à remarquer qu'en dépit de la centrifugation cet échantillon n'est pas complètement



**FIGURE 2.10** – Variations de densité optique en polarisation horizontale pendant une MOA pour un échantillon propre. La densité optique augmente durant le champ axial et durant la champ transverse ( $\beta_T = \beta_A > \alpha$ ).

propre : un échantillon colloïdal composé exclusivement de singulets est extrêmement difficile à obtenir.

Une mesure d'orientation des doublets a également été réalisée en polarisation horizontale, comme montré sur la figure 2.10. Les signaux sont plus bruités du fait de la faible amplitude du signal, mais une augmentation de la densité optique aussi bien durant le champ axial que durant le champ transverse y est visible, conformément à la simulation.

### 2.2.7 Comparaison aux autres méthodes

La MOA permet donc de quantifier rapidement l'état d'agrégation d'une solution de particules. Elle peut être comparée à différentes méthodes qui existent et qui permettent des mesures d'agrégation. Pour une revue approfondie sur le sujet, le lecteur pourra se référer à la revue de John Gregory [Gregory, 2009].

### L'observation en volume

**La diffusion de la lumière.** Une première possibilité est de quantifier l'agrégation en faisant une mesure de l'échantillon complet, sans aucun pré-traitement : c'est le cas de la diffusion (statique ou dynamique) de la lumière [Lin et al., 1989].

Un objet en solution diffuse la lumière en fonction de sa taille et de son indice de réfraction. A partir de l'intensité diffusée à différents angles, un traitement numérique permet de déterminer une distribution des tailles d'objet dans l'échantillon. Cette méthode, très simple à appliquer, est

également très précise dans le cas de populations monodisperses. Malheureusement le traitement perd en fiabilité dès lors que les populations sont polydisperses car un même signal peut provenir de différentes distributions de taille et d'état d'agrégation.

Plus simplement un suivi de densité optique peut permettre de suivre l'agrégation au cours du temps [Baudry et al., 2006], comme détaillé en 2.3.

### Tri par populations

**La centrifugation sur disque.** Afin d'améliorer la résolution des distributions, les particules peuvent être séparées suivant leur taille. Ceci peut se faire avec une centrifugeuse sur disque. A un moment donné, l'échantillon est injecté au centre d'un disque rempli d'une solution de glucose. La vitesse  $V$  de déplacement de la particule vers l'extrémité du disque est alors :

$$V = \frac{D^2\omega^2 R_d \Delta\rho}{18\eta}$$

où  $D$  est le diamètre de la particule,  $\eta$  la viscosité du fluide,  $R_d$  le rayon du disque et  $\omega$  la pulsation de rotation du disque.

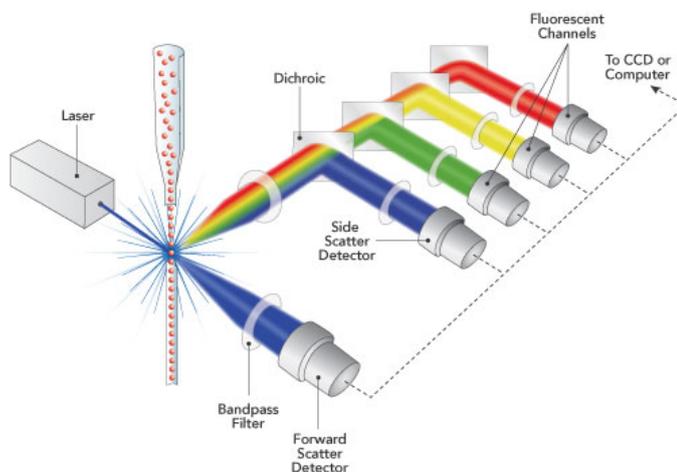
La quantité de particules atteignant l'extrémité au cours du temps est mesurée par un détecteur optique, permettant de remonter à la distribution de taille.

Cette méthode est très performante, elle a permis de mettre en évidence l'apparition de doublets dans une solution de singulets [Koenig, 2004]. Cependant cet équipement reste cher, et là encore la distribution des doublets se superpose à celle des singulets, la polydispersité de l'échantillon est encore une limitation importante de cette méthode.

### L'observation individuelle

Afin d'encore améliorer la résolution des distributions, la dernière possibilité est d'observer les objets individuellement.

**La microscopie.** La méthode la plus directe est l'observation en microscopie - optique ou microscopie électronique en transmission [Martínez-Pedrero et al., 2007]. Celle-ci fonctionne parfaitement tant que les objets observés ont une taille supérieure à la longueur d'onde du visible. Ce n'est pas le cas pour les particules de 200nm, qui sont d'autant plus difficiles à distinguer qu'elles sont soumises à l'agitation brownienne. Il est cependant possible de partiellement s'affranchir de ces difficultés en utilisant des particules fluorescentes, qui en émettant un signal plus important sont plus faciles à distinguer, ou alors en observant uniquement des particules qui ont sédimenté et qui sont donc immobiles.



**FIGURE 2.11** – Fonctionnement du cytomètre ([www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)). A chaque fois qu'une particule passe devant le faisceau lumineux, un signal est détecté sur l'intensité diffusée vers l'avant, à 90° ainsi que la fluorescence de l'objet.

Autre difficulté : pour que la mesure soit fiable, elle doit être effectuée sur un grand nombre d'objets, sans oublier de correctement effectuer la mise au point. Le nombre d'objets observables dans une image étant relativement faible, il faut effectuer de nombreux déplacements dans l'échantillon pour avoir une mesure fiable.

De nouvelles technologies permettent cependant de s'affranchir au moins partiellement de ces limitations grâce à une analyse d'image plus performante. Cette méthode peut être couplée à une mesure de DLS, l'utilisateur ayant alors accès à des informations supplémentaires comme la mesure de taille.

**La cytométrie.** La cytométrie en flux est essentiellement utilisée pour la caractérisation de cellules, permettant de les séparer selon leur taille et leurs propriétés optiques.

L'échantillon à analyser s'écoule dans un canal, comme représenté sur la figure 2.11. L'écoulement du fluide est tel qu'au passage devant le laser - à raison typiquement de 1,000 objets par seconde - les objets passent un par un, permettant de mesurer pour chacun les paramètres suivant :

- la lumière diffusée vers l'avant (FSC - Forward SCattering)
- la lumière diffusée à 90° (SSC - Side SCattering)
- l'intensité de fluorescence à 90° à éventuellement différentes longueurs d'onde

Le tracé par exemple de la SSC en fonction de la FSC permet de mettre les différentes populations présentes dans l'échantillon, avec le nombre d'objets dans chaque population.

Pour l'étude de l'agrégation de particules d'un moins 1 $\mu$ m, les singulets seront parfaitement

séparés des doublets ou triplets [Görge, 2011]. Mais la présence d'agrégats de billes de 200nm est beaucoup plus délicate à mettre en évidence, là encore du fait de la polydispersité des particules et du faible signal généré par chacune.

Très proche du cytomètre dans le principe, on citera également le compteur couler. Celui-ci est lui basé sur le changement de résistivité lorsqu'un objet passe au travers d'un micro-orifice. La variation de résistivité, de même que les mesures de lumière diffusée pour le cytomètre, permet d'obtenir des informations sur la nature des objets.

**Mesure de masse par résonance.** Cette technologie est la plus récente, elle est basée sur l'utilisation d'un cantilever contenant un canal microfluidique[Burg et al., 2007]. Le cantilever résonne à une pulsation  $\omega$ . Quand un objet qui s'écoule dans le canal atteint l'extrémité du cantilever, il en modifie la pulsation. Il est ainsi possible de mesurer la masse de la particule ; les plus faibles masses détectables sont proches du femtogramme, ce qui est 10 fois plus faible que la masse d'une particule d'or de 100nm. Il est donc possible de mettre en évidence la présence d'agrégats, même si des particules de 200nm peuvent être proches de la limite de l'appareil, suivant leur densité.

Mais cet appareil, de même que le cytomètre, représentent un coût important et ne sont pas toujours accessibles.

### 2.2.8 Conclusion

La MOA est une nouvelle méthode de quantification de l'agrégation de colloïdes. Cette méthode a plusieurs avantages intéressants :

- elle est très simple à mettre en place
- son coût est faible
- les particules non agrégées ne générant aucun signal, elle est moins sensible à la polydispersité que les méthodes précédemment citées
- la grandeur observée est directement proportionnelle à l'agrégation, elle ne s'ajoute pas à un bruit de base

Elle possède néanmoins une limitation : elle ne fonctionne que pour des particules magnétiques, même si l'extension aux particules non magnétiques doit être possible en remplaçant les champs magnétiques par des champs électriques.

Cette méthode permet donc de quantifier les agrégats présents dans une solution de particules magnétiques. Elle peut donc également être appliquée au diagnostic médical : il s'agira alors de quantifier les agrégats de particules formés spécifiquement par des protéines cibles. La

détection de deux protéines va ainsi être réalisée : la BSA-biotine (système modèle) ainsi que la protéine C-réactive.

Selon le même principe, cette méthode servira également dans la partie 4, cette fois-ci à quantifier la formation d'agrégats non spécifiques.

### 2.3 Application à la détection de protéine cible

Le diagnostic médical consiste à déterminer les dysfonctionnements physiologique présents chez un patient. Les analyses qui le constituent, une fois menées à bien, permettent de donner le traitement le plus approprié. Il a donc une importance critique, aussi bien en terme d'efficacité des soins prodigués que de rentabilité économique. En effet le diagnostic médical, qui représente moins de 5% du budget de l'assurance maladie, détermine 60 à 70% des décisions médicales [The Lewin Group, 2005].

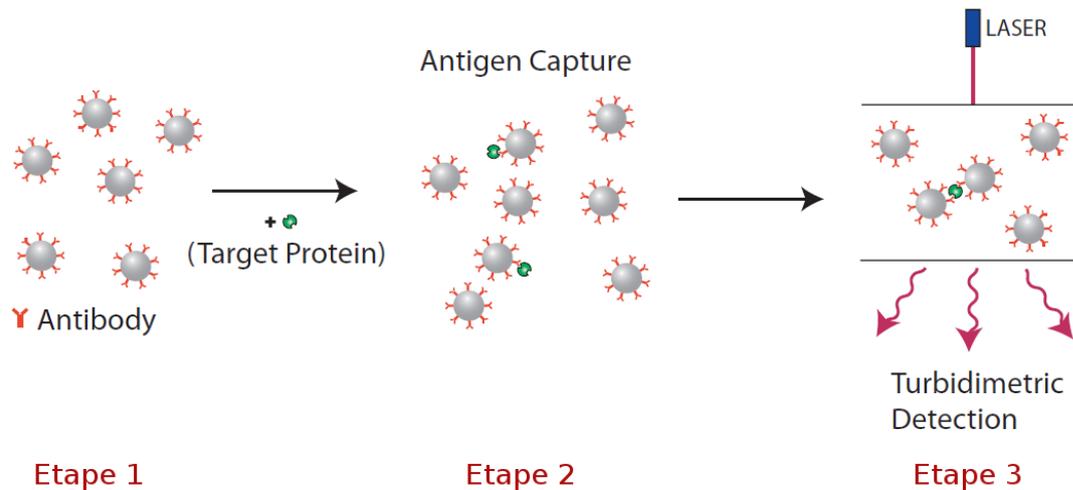
De nombreuses affections peuvent être diagnostiquées par la détection et/ou quantification de protéines cibles. Cependant une molécule seule ne mesurant que quelques nanomètres, il est extrêmement difficile de déterminer directement sa présence, *a fortiori* dans un milieu aussi riche et complexe que le plasma. Par exemple la thyroïdostimuline - TSH, hormone révélatrice de troubles de la thyroïde - a une concentration sanguine de l'ordre de 0.1pM ; négligeable devant les 600μM de l'albumine.

La détection de protéine cible nécessite donc très souvent une excellente spécificité, qui ne peut être obtenue qu'en utilisant des anticorps pour la reconnaissance. Les anticorps, fixés à la surface de travail, permettent ainsi de capturer les antigènes cibles ; une détection par complexation ultérieure (comme ELISA) permettra de révéler la capture.

Les tests de diagnostic médical reposent sur de nombreuses techniques suivant le paramètre recherché. Entre autres existe l'immuno-agglutination, qui permet de détecter et quantifier des protéines.

#### 2.3.1 L'immuno-agglutination sur colloïdes magnétiques

L'immuno-agglutination sur micro-particules a été découverte il y a plus de 50ans [Plotz and Singer, 1956]. Cette méthode est rapide et très simple à mettre en oeuvre, et correspond donc à ce qui est de plus en plus désiré dans la détection moderne : un temps d'analyse plus faible entraîne une augmentation de cadence des automates et donc une baisse des coûts.



**FIGURE 2.12** – Immuno-agglutination sur particule de latex [Baudry et al., 2006]. Etape 1 : les billes sont initialement dans le tampon, puis la protéine cible est ajoutée. Etape 2 : première capture. Les protéines cibles sont capturées par les particules greffées. Durant cette étape a également lieu la deuxième capture, de façon plus lente. Etape 3 : détection turbidimétrique.

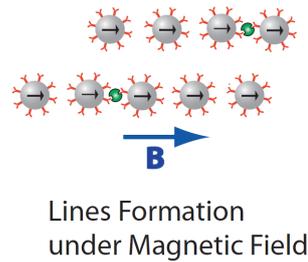
#### Les phases du test

Afin de mettre en évidence la présence de la protéine cible, une possibilité est de s'en servir pour la création d'objets plus gros qui eux seront détectables. Des colloïdes à la surface desquels sont greffés les anticorps spécifiques peuvent servir ce propos : dans ce cas la protéine cible sert à les agréger (cf figure 2.12). On distingue trois phases dans ce test.

- première capture : la protéine cible est capturée par les anticorps
- deuxième capture : une protéine déjà liée à une particule est capturée par une deuxième particule
- détection : une mesure turbidimétrique permet de remonter à la quantité d'agrégats formés

La première capture est rapide puisque les protéines diffusent rapidement dans la solution. L'étape cinétiquement limitante de ce test est la deuxième capture car limitée par la plus lente diffusion des grosses particules (200nm). Afin d'améliorer la rapidité de ce test, les billes doivent venir au contact de façon plus rapide. C'est ainsi qu'est née au LCMD l'idée de remplacer les particules de latex par des particules magnétiques [Baudry et al., 2006].

En effet, comme indiqué précédemment, les particules magnétiques forment des chaînes en présence d'un champ magnétique d'intensité suffisante (figure 2.13). Tant que les chaînes sont formées, une protéine déjà reliée à une première particule explorera plus rapidement la surface des particules voisines. Elle se liera plus rapidement à une deuxième, formant ainsi un doublet



**FIGURE 2.13** – Mise au contact des particules en présence d'un champ magnétique, entre les étapes 2 et 3 afin d'accélérer la deuxième capture.

déTECTABLE en densité optique.

Cette nouvelle étape est à rajouter entre les étapes 2 et 3 de la figure 2.12. Elle permet la formation d'un plus grand nombre d'agrégats spécifiques, rendant ainsi la technique plus sensible.

Outre la lecture turbidimétrique en solution, les billes magnétiques ont également été utilisées pour différentes applications. Après avoir passé en revue les possibilités imaginées, l'utilisation de la méthode MOA sera détaillée.

### 2.3.2 Les évolutions du test

L'immuno-agglutination sur colloïdes magnétique a connu diverses évolutions ces dernières années, tout d'abord grâce à la micro-fluidique. Il est possible de réaliser ce test en gouttes de 100nL. Une méthode de détection est alors de mesurer via une caméra la surface occupée par les particules après redispersion [Teste et al., 2013]. L'avantage de cette technique est la faible quantité de produits utilisés ainsi que la possibilité de réaliser un grand nombre de tests en parallèle.

La micro-fluidique peut être utilisée différemment [Moser et al., 2009], puisque la présence d'un amas de billes magnétiques localisées au centre d'un canal permet de capturer les protéines cibles s'écoulant dans le canal. Il est ensuite possible soit d'observer directement l'agrégation des billes, soit de récupérer les billes contenant la cible pour d'autres analyses.

Un autre système a été imaginé dans le quel des particules de 3 $\mu$ m, après avoir capturé les antigènes, viennent se fixer sur des particules de 1 $\mu$ m fixées à la surface [Tekin et al., 2013]. Des très faibles limites de détection - 60 attomolaire - sont atteintes grâce à la faible quantité d'agrégation non spécifique : la force de frottement visqueux générée par le flux de milieu dans le canal permet en effet d'évacuer les grosses particules liées de façon non spécifique.

Une autre possibilité a été de révéler la présence de protéine cibles via la fixation de particules sur une surface, surface sur laquelle des anticorps spécifiques sont greffés [Bruls et al., 2009]. La détection se fait par méthode optique, dans une configuration de réflexion totale interne. Ainsi, en l'absence de particules à la surface, aucun signal ne parvient au détecteur.

Dans un premier temps l'antigène cible se fixe sur la surface de la cartouche. Puis un champ magnétique permet d'amener les billes au niveau de la zone d'intérêt, avant de les relâcher. Après plusieurs répétitions, seules les particules liées spécifiquement à l'antigène restent adsorbées à la surface. Le système n'est plus en configuration de réflexion totale interne, l'intensité du signal donne accès à la quantité d'antigène présents.

### 2.3.3 Les paramètres optiques

Cette partie détaille les différentes mesures optiques utilisées pour révéler la quantité d'agrégats en solution. Tout d'abord nous nous intéresserons au paramètre historique  $\Delta DO$ , puis il s'agira d'appliquer le principe de la MOA afin d'augmenter la sensibilité du test.

#### La mesure de densité optique

Le contenu de la cuve ainsi que le détail sur l'application des champs magnétiques de réaction se trouvent en annexe C.

Le premier paramètre indicateur pour les tests d'immuno-agglutination magnétique est la densité optique : la variation entre la fin et le début de la mesure indique la quantité de doublets formés durant le champ magnétique. Pour rappel la densité optique d'une solution de singulets est :

$$DO_{initiale} = hC_{scat} \frac{N_{sing}}{\ln(10)}$$

Si pendant l'aimantation  $\Delta N_{doub}$  sont formés, la densité optique finale devient :

$$DO_{finale} = hC_{scat} \frac{(N_{sing} - 2\Delta N_{doub}) + \alpha(N_{doub} + \Delta N_{doub})}{\ln(10)}$$

La variation de densité optique est donc :

$$\Delta DO = hC_{scat} \frac{(\alpha - 2)\Delta N_{doub}}{\ln(10)}$$

Numériquement, 1pM d'antigène qui forme 1pM de doublets augmente la densité optique de 8.5mOD.

### Paramètres $\Delta MOA$ vs $\Delta DO$

Outre la densité optique, une MOA peut être également réalisée en début et fin de mesure. Pour rappel l'amplitude de la MOA est la différence de densité optique alors que les agrégats sont alignés selon les deux champs :

$$MOA = hC_{scat} \frac{(\beta_A - \beta_T)N_{doub}}{\ln(10)}$$

La variation entre les mesures initiale et finale est donc :

$$\Delta MOA = hC_{scat} \frac{(\beta_A - \beta_T)\Delta N_{doub}}{\ln(10)}$$

Comparativement à  $\Delta DO$ , le signal est augmenté puisque

$$\frac{\Delta MOA}{\Delta DO} = \frac{\beta_A - \beta_T}{\alpha - 2} = 2.2$$

La présence de 1pM d'agent entraîne donc une augmentation de signal de 19mDO si chaque cible forme un doublet, au lieu de 8.5mDO pour  $\Delta DO$ .

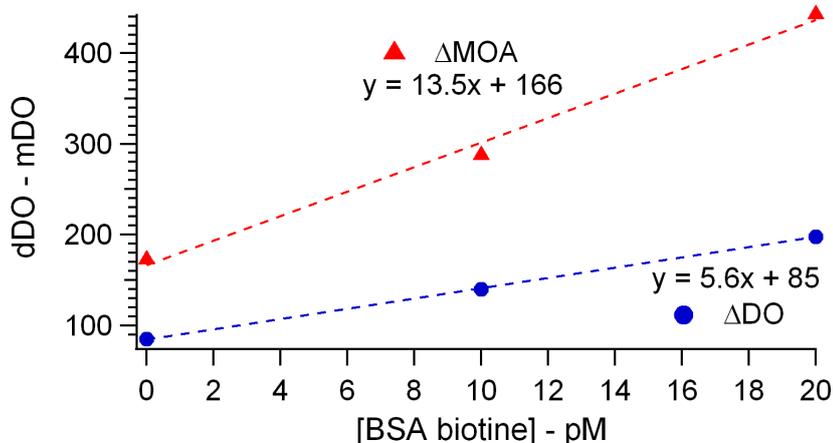
Dans un premier temps la possibilité de doser une protéine cible va être testée sur un système modèle - capture de BSA-biotine par des billes fonctionnalisées avec de la streptavidine - puis elle sera testée sur un système réel : la protéine C-réactive.

#### 2.3.4 Système modèle : dosage de la BSA-biotine

Diverses concentrations en BSA-biotine ont été dosées par les billes streptavidine, le résultat pour des concentrations inférieures à 20pM est en figure 2.14. Pour ces faibles concentrations ( $[Billes] \sim 90pM$ ), l'augmentation de signal est linéaire, aussi bien pour  $\Delta MOA$  que pour  $\Delta DO$ .

La simulation a montré que 1pM d'agent doit augmenter le signal de 19mDO pour  $\Delta MOA$  et 8.5 pour  $\Delta DO$ . La comparaison de ces valeurs aux pentes des régressions linéaires indique un rendement de  $\sim 70\%$ , et ce pour les deux méthodes. 20pM de BSA-biotine formeraient donc près de 14pM de doublets. 30% de protéines ne forment pas de doublets, ceci peut s'expliquer une adsorption sur les parois des BSA-biotine, par un nombre insuffisant de biotines sur certaines BSA, ou par une capture de toutes les biotines d'une BSA par des streptavidines de la même bille. Dans le cas du dernier point, une diminution de la densité de streptavidines à la surface des billes permettrait un meilleur rendement d'agrégation.

La figure 2.15 montre les résultats pour une gamme plus étendue en BSA-biotine. La partie basse de la figure montre qu'aux fortes concentrations - typiquement 100pM et 1nM - 250ms ne suffisent pas pour orienter les gros agrégats formés. Pour atteindre le plateau et ainsi avoir une mesure comparable aux mesures obtenues avec des échantillons faiblement agrégés, il faudrait utiliser un temps d'aimantation plus long, de plusieurs secondes.



**FIGURE 2.14** – Courbes de dosage  $\Delta MOA$  et  $\Delta DO$  de la BSA-biotine. Les pentes indiquent un rendement de formation de liens de 70%.

Pour les fortes concentrations, le signal mesuré est donc inférieur au signal attendu, ce qui se traduit par une baisse du signal dans la partie haute de la courbe : c'est l'effet crochet. Ce phénomène est bien connu car il est une cause de limitation des méthodes de mesure. En effet il est impossible de doser à des concentrations supérieures à celle qui donne le signal maximum, car une valeur de signal peut correspondre à deux concentrations en agent cible.

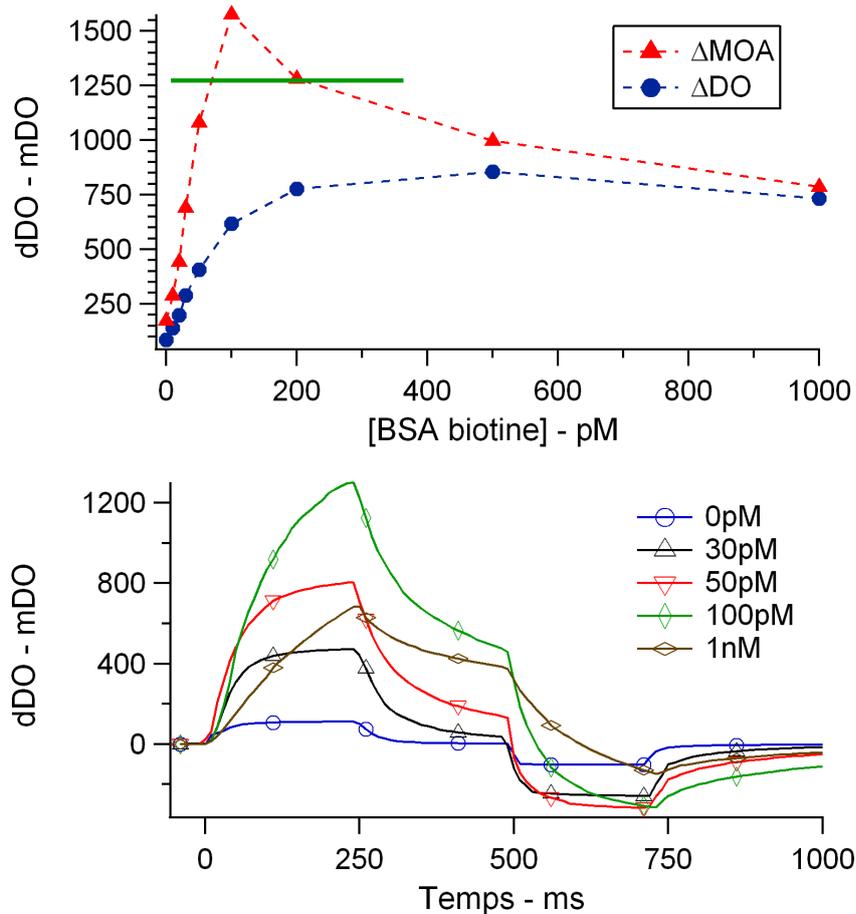
La ligne verte illustre ce propos : un signal de 1,250mDO peut correspondre à 70 ou 200pM d'agent. Dans notre cas il est donc impossible de doser au-delà de  $\sim 90$ pM. Une première possibilité est alors d'utiliser  $\Delta DO$ , mais ce paramètre sature rapidement et ne permet donc pas d'augmenter significativement la gamme de mesure. Un nouveau paramètre pourrait alors être utilisé : le temps caractéristique d'orientation des agrégats, qui est le seul à augmenter significativement entre 100pM et 1nM (figure 2.16).

### 2.3.5 Système réel : dosage de la CRP

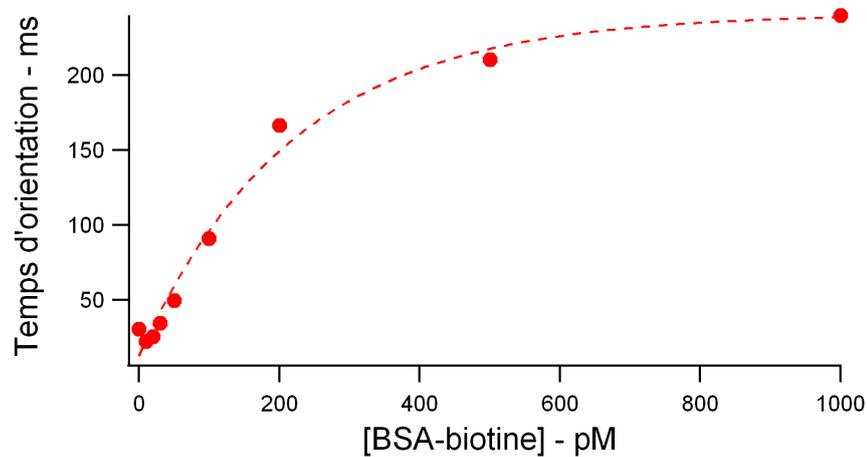
#### La CRP

Quand l'organisme subit une agression, le mécanisme de défense est activé : c'est l'inflammation. Elle permet de lutter efficacement contre le danger, en permettant la réponse immunitaire adaptée à l'agression. La détection de l'état d'inflammation est une donnée importante et souvent mesurée dans les laboratoires d'analyses médicales. Elle se fait par la quantification d'un marqueur de l'inflammation : la protéine C-réactive (cf figure 2.17).

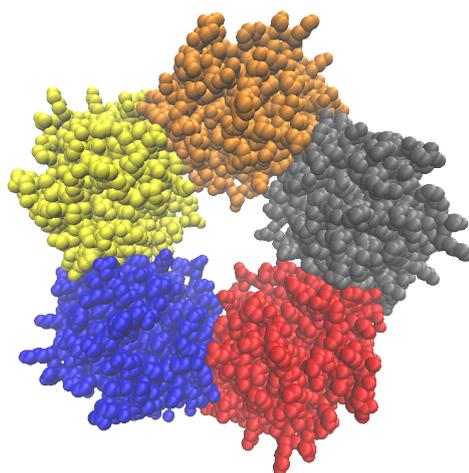
Cette protéine, pentamère de 118kDa, est synthétisée par le foie. Sa concentration plas-



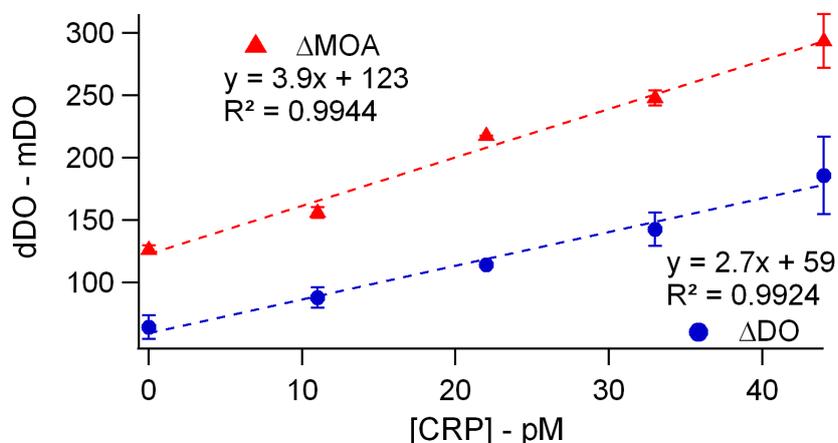
**FIGURE 2.15** – Haut :  $\Delta MOA$  et  $\Delta DO$  pour une gamme plus étendue en BSA-biotine. La ligne verte illustre l'effet crochet : une valeur de  $\Delta MOA$  peut correspondre à plusieurs concentrations en agent. Bas : mesures MOA pour les Bio-Adembeads Streptavidin en fin d'analyse ; pour différentes concentrations en BSA-biotine. Pour les hautes concentrations en agent, le temps caractéristique d'orientation est trop long pour que la mesure de 250ms soit suffisante.



**FIGURE 2.16** – Temps caractéristique d'orientation des agrégats après réaction avec différentes concentrations de BSA-biotine. Les temps sont obtenus en réalisant un fit exponentiel de la DO durant la phase d'orientation avec le champ axial. Ce paramètre a l'avantage de toujours augmenter à 1nM.



**FIGURE 2.17** – Protéine C-réactive. Elle est composée de 5 unités du même monomère.



**FIGURE 2.18** –  $\Delta MOA$  et  $\Delta DO$  pour différentes concentrations en CRP. Les plus faibles pentes indiquent un plus faible rendement de formation de liens.

matique basale est inférieure à 10mg/L [Clyne and Olshaker, 1999]- soit 80nM - mais peut augmenter jusque 400mg/L en cas d'infection. Elle est un marqueur clinique privilégié, puisqu'en 2012 plus de 16 millions de tests ont été réalisés en France (<http://www.ameli.fr/l-assurance-maladie/statistiques-et-publications/donnees-statistiques/biologie/biolam-2010-2012.php>).

## La détection

La MOA a été testée sur la CRP. Comme indiqué en annexe, des anticorps polyclonaux sont greffés sur les billes afin de capturer la CRP. Les résultats expérimentaux - en figure 2.18 - montrent que 1pM d'agent augmente le signal de 2.7mDO/pM pour  $\Delta DO$  et 3.9mDO/pM pour  $\Delta MOA$ . Là encore le rendement de formation des liens n'est pas de 1 : nous pouvons cependant supposer qu'entre 20 et 30% des antigènes forment un lien entre particules ; 44pM de CRP devrait ainsi créer  $\sim 10$ pM de doublets. Ceci reste faible comparé aux 90pM de billes dans la solution.

On peut remarquer que le signal en  $\Delta MOA$  est proche de celui en  $\Delta DO$  alors qu'il devrait y avoir un facteur 2 (19 contre 8.5mDO/pM, ratio vérifié sur la détection de BSA-biotine). Cela peut provenir des paramètres de la simulation. En effet les lots de bille ne sont pas les mêmes, les greffages et les tampons non plus, la taille des billes peut donc en être affectée et par conséquent les propriétés optiques également. Si l'on prend l'exemple de  $\Delta DO$ , celui-ci évolue en  $(\alpha - 2)$ , une légère augmentation de  $\alpha$  entraîne donc une baisse importante du ratio  $\frac{\Delta MOA}{\Delta DO}$ .

La limite de détection à  $3\sigma$  a été calculée : elle correspond à la concentration (en pM)

pour laquelle le signal est égal au signal à 0pM plus trois fois l'écart type du blanc. La MOA gagne à deux niveaux : au niveau de l'écart-type du blanc ( $\sigma_{\Delta DO} = 9.5mDO$  vs  $\sigma_{\Delta MOA} = 3.4mDO$ , pour 11 blancs), mais la pente de la courbe dose-réponse est également plus importante (2.7mDO/pM pour  $\Delta DO$  contre 3.9mDO/pM pour  $\Delta MOA$ ). La limite de détection est ainsi de 10.9pM pour  $\Delta DO$  et 5.6pM pour  $\Delta MOA$  : cette nouvelle méthode permet de diviser la limite de détection par deux, ne nécessitant que très peu de modifications au setup expérimental.

### 2.3.6 Les méthodes similaires

D'autres études ont utilisé la magnéto-rotation pour le diagnostic. Dans Hecht et al. [2011], la cible permet la capture de particules de 1 $\mu$ m par des particules non magnétiques de 7 $\mu$ m. En présence d'un champ, les billes magnétiques permettent la rotation de la bille principale, rotation suivie en microscopie optique. Sur un système modèle (biotine-streptavidine), une limite de détection de 0.5pM est atteinte.

En parallèle, Ranzoni & Al ont utilisé la même technique de rotations d'agrégats, mais ont choisi de mesurer la réponse des agrégats à un champ magnétique tournant [Ranzoni et al., 2011]. Grâce à un important travail sur la chimie de surface des particules, cette méthode leur a permis d'atteindre une limite de détection de 0.4pM en tampon et de 5pM en plasma.

## 2.4 Conclusion

La méthode présentée dans ce chapitre est l'une des rares à pouvoir détecter la présence d'une faible quantité de doublets dans une solution de singulets. Elle est de plus extrêmement rapide - une seconde suffit - et peut également permettre de détecter de gros agrégats en s'intéressant au temps caractéristique de rotation. Sa simplicité d'utilisation explique pourquoi elle a été retenue par deux industriels : Bertin Technologies et Horiba Médical.

Cette méthode a été validée sur un système modèle ainsi que sur un système réel : la limite de détection y est divisée par deux par rapport au test standard. Cette méthode nous permettra donc de caractériser plus finement l'agrégation colloïdale induite par des protéines.

En comparant toutes les méthodes de détection présentées ici, il est remarquable que les limites de détection atteintes sont très proches. Pour améliorer significativement la sensibilité des tests, le facteur déterminant n'est donc plus le mode de détection, mais plutôt la physico-chimie des particules ou le format du test. Car ce sont les particules, qui en s'agrégeant de façon spontanée ou à cause de protéines 'adsorbées autres que les protéines cibles, qui imposent la

## Chapitre 2. Mesure d'agrégation par orientation magnétique

---

limite de détection.

Cette étude de l'adsorption des protéines non cibles est présentée dans la partie suivante, elle sera suivie des résultats sur l'agrégation induite par ces mêmes protéines non cibles.

## Chapitre 3

# Mesures d'adsorption de protéines

Suivant la nature de la protéine et de la surface mises en contact, la protéine s'adsorbe, ou pas, sur la surface. Cependant ce phénomène n'est toujours pas correctement décrit, c'est pourquoi l'objectif de cette partie est de caractériser au mieux l'adsorption d'une protéine - la BSA - sur une surface - la silice. Ainsi il sera envisageable de mieux décrire cette adsorption. Les mesures principales seront également réalisées sur d'autres protéines et surfaces afin de s'assurer qu'ils ne sont pas spécifiques au couple retenu.

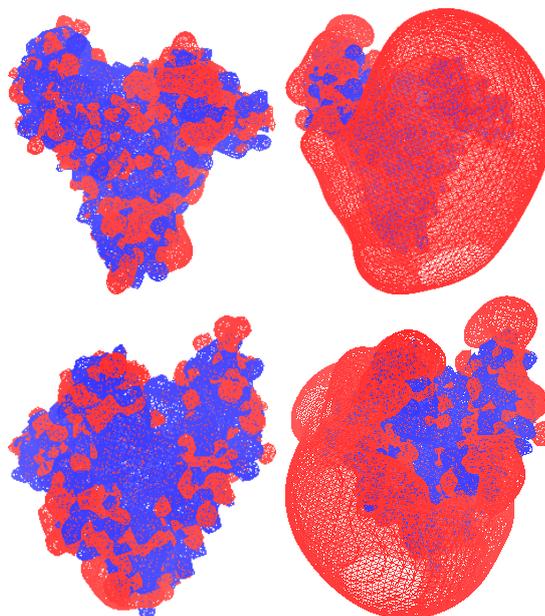
Dans un premier temps, nous verrons pourquoi ce système protéine - surface a été choisi. Il s'agira ensuite de présenter le protocole expérimental, en s'attachant à démontrer la fiabilité des résultats obtenues. Les protéines - en particulier la BSA - sont connues pour s'adsorber en quantités importantes sur de nombreuses surfaces, ces adsorptions parasites ne doivent pas interférer avec nos mesures.

Les résultats expérimentaux pourront alors être présentés, ce qui permettra d'avancer de nouvelles hypothèses sur la description de l'adsorption de protéines.

### 3.1 Le choix des protéines et surfaces

#### 3.1.1 Les protéines

Les protéines qui ont été utilisées pour les mesures d'adsorption ont été introduites en 1.1.3. Parmi elles se trouve l'albumine de sérum bovin. Cette protéine est fréquemment utilisée en laboratoire pour saturer les surfaces, afin que les protéines d'intérêt ne s'y adsorbent pas. Elle est également un bon modèle de la HSA, protéine principale du sang humain, pour un coût réduit.



**FIGURE 3.1** – Potentiel électrostatique de la BSA à pH 5.5 (gauche) et pH 7.4 (droite) ; haut et bas représentent les deux côtés de la protéine. Les tracés en bleu représentent les isosurface à  $+3kcal/(mol.e)$ , ceux en rouge celles à  $-3kcal/(mol.e)$ . La structure de la protéine a été obtenue par Majorek et al. [2012], le calcul des énergies de surface a été réalisé grâce au logiciel développé par Dolinsky et al. [2004] et au serveur PDB2PQR.

La BSA est une protéine de  $\sim 67kDa$ , dont le point isoélectrique est de 4.9. La représentation de la structure secondaire se trouve dans la figure 1.3, la répartition des charges à différents pH est visible sur la figure 3.1. Pour rappel l'albumine a un rôle de maintien du pH et de transport des petites molécules.

Deux autres protéines ont également été étudiées ici : la myoglobine (18kDa) et l'hémoglobine (68kDa). L'hémoglobine est constituée de 4 sous-unités qui ont chacune une structure proche de celle de la myoglobine, en première approximation on pourra considérer que l'hémoglobine est donc un tétramère de myoglobine. Ces protéines serviront d'illustration du modèle d'adsorption multi-sites.

### 3.1.2 Les surfaces

Dans cette thèse, l'adsorption est testée sur des surfaces solides, et non sur les surfaces en polymères. Les surfaces devant alors être stable sous forme colloïdale en milieu aqueux - hydrophiles - seuls la silice et le titane ont été retenus.

### Le titane

Le titane a été utilisé sous forme de particules commerciales de 500nm de diamètre (Dupont Ti-Pure R-960), cet élément est utilisé commercialement pour la fabrication de peintures particulièrement résistantes.

Sous forme rutilé, c'est un matériau très dense ( $d \sim 3.9$ ) qui possède un indice de réfraction très élevé ( $\sim 2.9$ ).

### La silice

Dans la littérature, la surface la plus utilisée est du dioxyde de silicium  $SiO_2$ . Deux types ont été utilisés pour nos travaux : la première sous formes de particules de 150nm de diamètre (Sigma 56799), de densité comprise entre 1.8 et 2.0. Quant à la deuxième, il s'agit de particules constituées d'un coeur magnétique et recouvertes d'une couche de  $SiO_2$ . Provenant d'Ademtech, que nous remercions pour l'envoi de ces particules non commerciales, leur taille est de  $\sim 220$ nm.

La silice est très fréquemment utilisée comme surface modèle hydrophile [Arai and Norde, 1990; Kondo et al., 1991; Haynes and Norde, 1994; Norde and Giacomelli, 2000; Larsericsdotter et al., 2005; Greer et al., 2009; Langdon et al., 2012]. A cet effet c'est sur cette surface que l'essentiel des expériences d'adsorption de protéine - surtout de la BSA - ont été réalisées.

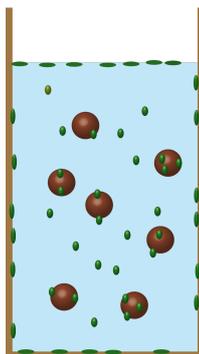
## 3.2 Protocole et validation

Après avoir choisi le système d'étude, la mise au point du protocole est ici présentée. Ce protocole mérite d'être décrit et entièrement vérifié, les protéines étant réputées pour saturer les interfaces - en particulier la BSA - les mesures peuvent rapidement ne pas rendre compte de l'adsorption sur les particules sélectionnées.

### 3.2.1 Le choix des colloïdes

Le premier point est le choix de l'utilisation de particules colloïdales. Comme indiqué dans la partie 1, l'adsorption des protéines sur les surfaces peut être réalisée soit sur des surfaces planes, soit sur des surfaces colloïdales. Remplacer les surfaces par des objets d'une taille proche du  $\mu\text{m}$  a deux avantages principaux.

Pour qu'une réaction entre deux réactifs ait lieu, les deux réactifs doivent être au contact. Dans notre cas il faut donc minimiser les distances entre protéines et surfaces d'adsorption.



**FIGURE 3.2** – Les protéines (en vert) s'adsorbent sur les colloïdes (sphères marrons), sur les parois et à l'interface liquide/gaz

Les colloïdes servent cet effet, car étant eux-mêmes en solution, une protéine diffusant dans l'échantillon entrera plus vite en contact avec le colloïde que si elle doit uniquement se rapprocher de la paroi, cas où suivant la configuration du système elle devra parcourir plusieurs  $\mu\text{m}$ , voire mm.

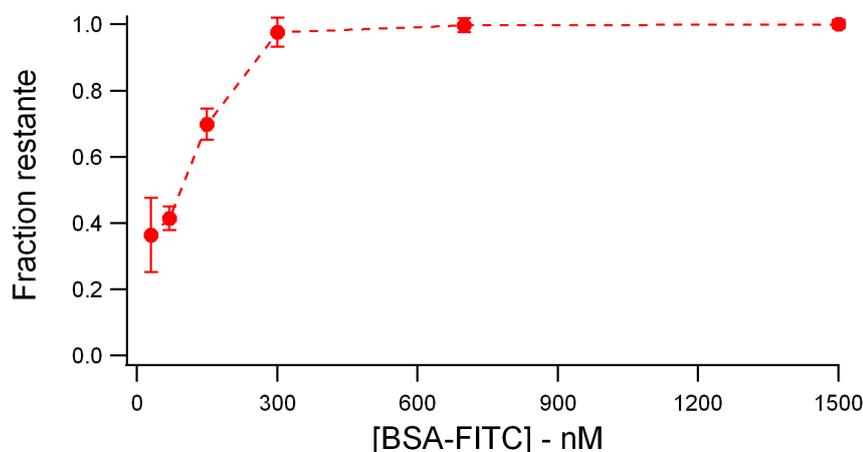
Et le plus important, cela permet de grandement augmenter la surface d'adsorption. Considérons le cas de 20  $\mu\text{L}$  d'une solution à 1% - 5nM - de particules de 150nm : elles représentent une surface de 42cm<sup>2</sup>. Dans un eppendorf, 20  $\mu\text{L}$  de liquide couvrent une surface de 0.5 cm<sup>2</sup>, les colloïdes permettent donc de multiplier la surface d'adsorption par un facteur 100. Il est alors également possible de multiplier les concentrations de protéines par 100, les signaux seront donc plus intenses et mieux définis, et les mesures plus précises. Cela permet également de minimiser la compétition entre l'adsorption sur les particules et celle sur les bords de l'eppendorf.

### 3.2.2 Les adsorptions parasites

L'adsorption de protéines sur les colloïdes est souvent considérée comme un équilibre entre des protéines en solution et des protéines adsorbées sur les particules.

Dans une mesure d'adsorption idéale, les protéines s'adsorbent uniquement sur la surface d'intérêt. Malheureusement ce n'est jamais le cas : quand les protéines sont en solution, elles s'adsorbent sur différentes surfaces, comme illustré dans la figure 3.2 :

- sur les colloïdes
- sur les parois du contenant
- à l'interface liquide/gaz



**FIGURE 3.3** – Adsorption de BSA sur les eppendorfs standards; tampon MES pH 5.5, NaCl 10mM. La fraction restante de BSA-FITC est obtenue après une journée d’incubation de 100 $\mu$ L de solution en eppendorf. Aux faibles concentrations plus de la moitié de la BSA est adsorbée sur les parois.

Ces adsorptions parasites peuvent être gênantes si elles modifient de façon importante les quantités adsorbée et en solution. Une telle situation est illustrée dans la figure 3.3. 100 $\mu$ L de solution de BSA-FITC (BSA greffée avec un fluorophore, la fluorescéine isothiocyanate) à différentes concentrations ont été mis dans des eppendorfs de 600 $\mu$ L et laissés à incuber pendant une nuit. Par comparaison de l’intensité de fluorescence le lendemain, la fraction de protéine restante en solution est déterminée : pour une solution à 30nM seuls 40% des protéines ne se sont pas adsorbées sur les parois. Cette mesure illustre également l’impossibilité de réaliser des mesures quantitatives en molécule unique ou en microfluidique, car une part importante des protéines sont perdues sur les parois.

Cet exemple montre l’importance d’avoir un protocole qui permet une mesure fiable de l’adsorption. De nombreuses autres difficultés sont apparues au cours de la mise au point du protocole, nécessitant divers ajustements afin de s’en affranchir. Toutes ces potentielles limites du protocole sont présentées ci-après, avec les mesures associées qui montrent la fiabilité du protocole final.

### 3.2.3 Protocole d’adsorption

De nombreuses études ont été réalisées sur l’adsorption de la BSA, une méthode de quantification fréquemment utilisée est la mesure de fluorescence des tryptophanes [Docoslis et al., 1999] - excitation à 280nm, détection à 354nm. Le signal par BSA étant très faible, le choix a été fait ici de travailler avec de la BSA marquée, qui donne un signal beaucoup plus important :

la détection est plus précise. A cet effet la protéine adsorbée est de la BSA-FITC de chez Sigma. Pour les mesures sur la myoglobine et l'hémoglobine, ces protéines ne sont pas marquées donc la quantification de ces protéines se fait par densité optique - à 409nm.

Afin de minimiser les étapes de préparation, la quantification de la BSA-FITC adsorbée sur les particules de silice se fait préférentiellement par dosage en retour - même si la mesure de la fluorescence des billes est également possible, comme détaillé ci-après. Lors de la mesure, outre l'échantillon de 20 $\mu$ L qui contient les protéines (1.5 $\mu$ M) et les colloïdes, un échantillon de référence ne contenant que de la BSA-FITC est préparé (à la même concentration).

**Protocole expérimental** 20 $\mu$ L de particules et protéines sont mis à incuber dans des ependorfs de 600 $\mu$ L. Afin de maintenir l'homogénéité de la solution, l'incubation se fait sur un agitateur rotatif; de l'aluminium protège également les fluorophores du photoblanchiment dû à la lumière ambiante. L'incubation a lieu à température ambiante.

Après incubation, les billes sont séparées du surnageant par centrifugation - 10min. Les surnageants - ou les particules après lavages - sont déposées dans une plaque 96 puits pour la mesure de fluorescence. A noter qu'il est impossible de doser la BSA-FITC sur les billes de titane du fait de leur fort indice de réfraction - le signal des protéines étant masqué par celui des billes -, seul le surnageant sera dosé dans ce cas.

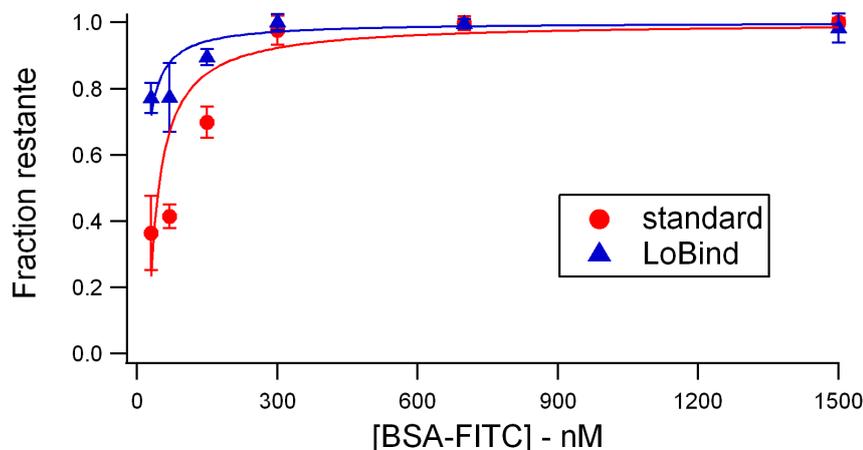
Les mesures de fluorescence ont été réalisées avec un lecteur de microplaque - Infinite 200, Tecan. L'utilisation de plaques 96 puits permet d'effectuer rapidement un grand nombre de mesures, et ainsi de pouvoir faire plus de réplicats. La limite de détection de la FITC a été évaluée à 8pM, cette sensibilité est suffisante pour que la détection par le fluorimètre ne soit pas une limitation aux concentrations utilisées.

Afin de ne garder que les signaux provenant de la BSA-FITC, l'intensité de fluorescence du tampon seul (autrement appelé *Blanc*) est soustraite aux intensités de fluorescence du surnageant et de la référence. Enfin, le ratio entre ces deux intensités permet d'obtenir la fraction de BSA-FITC qui a été adsorbée sur les particules.

Pour plus de détails, cf annexe D.

### 3.2.4 Validation du protocole

Pour toutes les vérifications ci-après, on considère l'adsorption de BSA-FITC sur des particules de silice de 150nm de diamètre.



**FIGURE 3.4** – Comparaison de l’adsorption de BSA-FITC sur des eppendorfs standard et Protein LoBind. Afin de minimiser les pertes de protéine il est préférable d’utiliser les eppendorfs Protein LoBind. La fraction restante de BSA-FITC est obtenue après une journée d’incubation de 100 $\mu$ L de solution en eppendorf. Mesures en tampon MES pH 5.5, NaCl 10mM. Les fits sont obtenus par un modèle d’adsorption irréversible de protéine sur les parois.

### Adsorption de BSA sur l’eppendorf

Les mesures sont faites en tampon MES pH 5.5 + NaCl 10mM. Des solutions allant de 15nM à 1.5 $\mu$ M ont été mises à incuber dans deux types d’eppendorfs : les *standards* et les *Protein LoBind*. Après 24h d’incubation, l’intensité de fluorescence est mesurée et comparée à celle d’avant incubation. On en déduit ainsi la quantité de protéine adsorbée sur les parois pendant l’incubation (figure 3.4).

Dans le modèle le plus simple on considère que les protéines se fixent aux parois tant que celles-ci ne sont pas saturées. C’est avec un tel modèle que les fits ont été réalisés, la seule variable d’ajustement étant la concentration de protéine saturant les interfaces. Dans les conditions expérimentales sélectionnées, la saturation serait ainsi atteinte avec 24nM de BSA sur les eppendorfs standards contre 8nM sur les *Protein LoBind*.

Cette valeur doit être minimale par rapport à la concentration initiale de protéines, car elle fausse à la fois l’intensité de fluorescence de la solution de référence (son signal est diminué de ce qui est perdu aux parois) et celle du surnageant. Dans le tableau suivant les erreurs sont estimées sur les fractions de BSA adsorbées pour les cas où 10%, 50% et 90% de la quantité initiale de BSA s’adsorbe sur les colloïdes ; et ce pour une concentration initiale en BSA de 1.5 $\mu$ M ou 150nM. Comme il est probable que la quantité de protéines qui s’adsorbent sur les parois dépend de la quantité de billes en solutions, ces erreurs correspondent aux erreurs maximales attendues.

### Chapitre 3. Mesures d'adsorption de protéines

---

Fraction adsorbée	1.5 $\mu$ M		150nM	
	Mesure	Erreur	Mesure	Erreur
10%	10.1%	0.1%	10.6%	0.6%
50%	50.3%	0.3%	52.8%	2.8%
90%	90.5%	0.5%	95.1%	5.1%

Alors que les erreurs deviennent non négligeables pour 150nM de BSA en solution, elles restent suffisamment faibles pour une solution 10 fois plus concentrée. La concentration des protéines en solution sera donc prise égale à 1.5 $\mu$ M, l'effet de l'adsorption sur les parois est ainsi suffisamment minimisé.

#### Adsorption de billes sur l'éppendorf

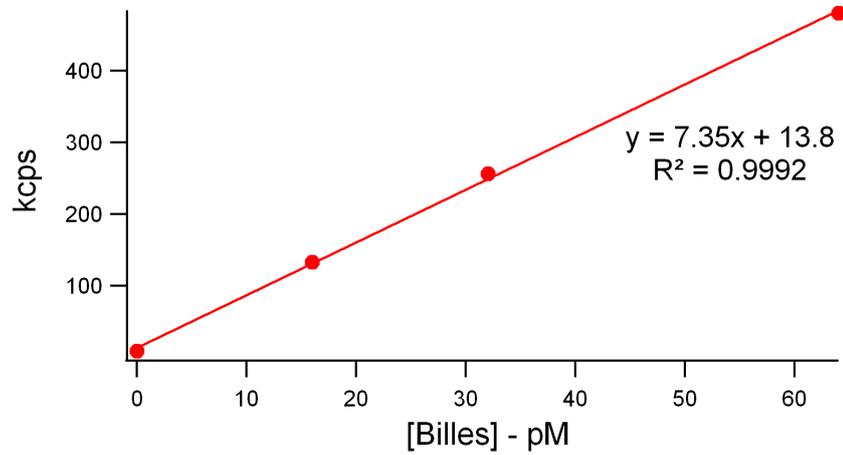
Autre limite potentielle du test, il est possible que les particules de silice s'adsorbent sur les parois de l'éppendorf - ce qui fausserait également la mesure, en particulier lors du dosage de la fluorescence des billes.

La quantification des particules de silice se fait au moyen d'un appareil de DLS (diffusion dynamique de la lumière, appareil Malvern Nano ZS). La première fonction de cet appareil est de vérifier qu'il n'y a pas d'agrégats de billes. De par son fonctionnement, son détecteur reçoit une quantité de signaux proportionnelle au nombre d'objets. Il peut donc également quantifier le nombre d'objets dans l'échantillon, permettant de comparer différentes concentrations en particules. La figure 3.5 montre le nombre de cps pour une gamme en particules de silice. Les mesures de taille ne montrent aucune agrégation dans ces conditions.

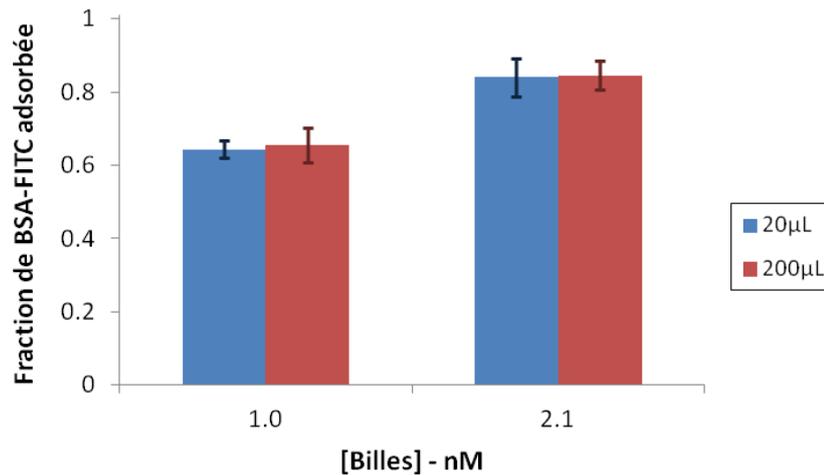
4 solutions à 64pM de billes ont ensuite été incubées une journée, dans un tampon MES pH 5.5 contenant 10mM de NaCl. Le nombre de cps détectés le lendemain a été comparé à celui de la veille, indiquant que 96%  $\pm$  4% des particules ont été récupérés. On considère donc qu'il n'y a pas de perte de particules due à l'adsorption sur les eppendorfs.

#### Adsorption de BSA à l'interface eau/air

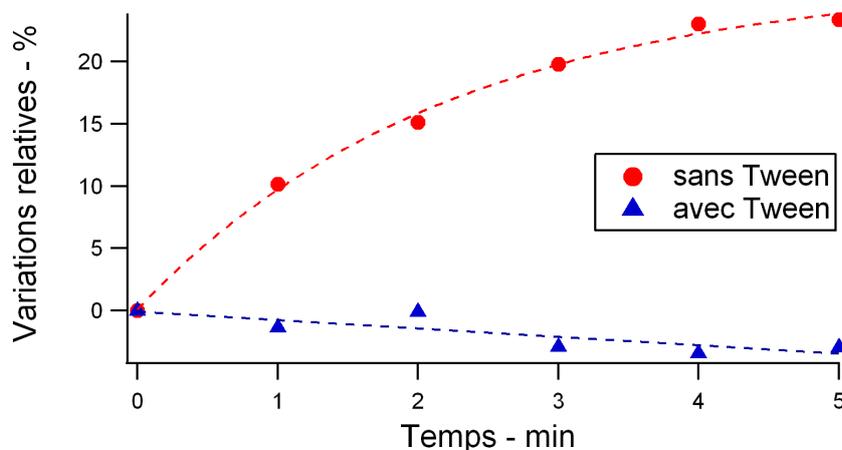
L'albumine s'adsorbe à l'interface eau/air [Hansen and Myrvold, 1995], et donc en particulier dans l'éppendorf durant l'incubation. La fraction de protéines qui s'y adsorbe à la surface est d'autant plus faible que le volume de solution est important. Le protocole a donc été testé sur deux volumes différents : 20 $\mu$ L et 200 $\mu$ L ; le résultat est visible en figure 3.6. Il ne montre aucune différence significative : l'adsorption de BSA à l'interface à la concentration choisie est négligeable et 20 $\mu$ L d'échantillons suffisent.



**FIGURE 3.5** – Nombre de cps mesurés par la DLS en fonction de la concentration en billes. Le signal est linéaire, ce qui permet d'utiliser cette mesure pour la quantification des billes présentes en solution.



**FIGURE 3.6** – Adsorption de BSA-FITC 1.5 µM pour des volumes de 20 et 200 µL. Les barres d'erreur représentent les écart-types sur 3 échantillons pour 20 µL et 2 échantillons sur 200 µL. 4 références ont été préparées pour chaque volume.



**FIGURE 3.7** – Evolution du signal de fluorescence d’une solution de BSA-FITC 150nM, avec et sans addition de Tween. Mesure en MES pH 5.5.

Une autre difficulté apparaît au moment de la lecture de la fluorescence. Pour la détection, 100 $\mu$ L de solution sont déposés dans un puits de plaque 96 puits, l’excitation et la détection ont lieu par le haut.

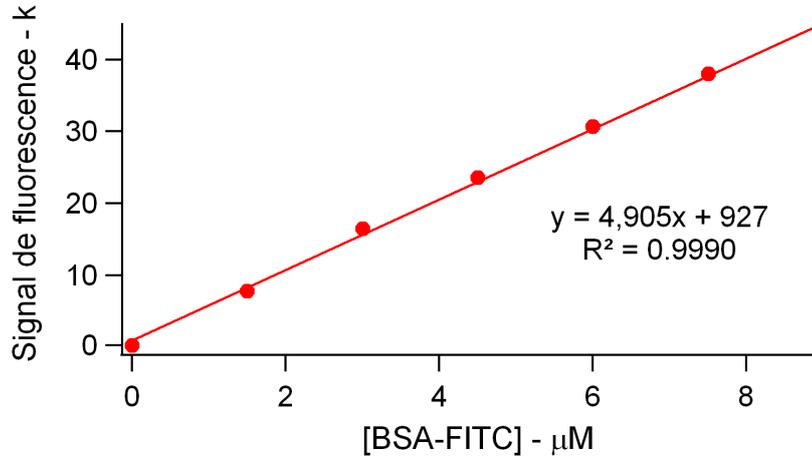
Comme la BSA-FITC s’adsorbe aux interfaces - entraînant une déformation du ménisque -, ce qui se traduit expérimentalement par une augmentation continue du signal. Un exemple d’instabilité du signal se trouve en figure 3.7 : l’intensité de fluorescence augmente de 20% en 5 minutes. Bien entendu une telle variation ne permet pas de réaliser une mesure fiable.

La solution retenue pour remédier à ce problème est de saturer l’interface en ajoutant 83 $\mu$ L de Tween 20 à 1% au moment de mesurer la fluorescence. La plus grande stabilité du signal donne ainsi une plus grande précision sur la mesure de fluorescence. La figure 3.8 confirme qu’en dépit de l’ajout de Tween la mesure de fluorescence reste proportionnelle à la quantité de BSA-FITC ajoutée dans le milieu.

#### Fluorescence des billes et du surnageant

Le protocole présenté en annexe est basé sur un dosage en retour. Cependant, comme indiqué en fin de protocole, il est possible de quantifier la BSA adsorbée à partir de la fluorescence des billes. Pour cela les billes, séparées du surnageant, doivent être lavées au moins deux fois avant d’être redispersées dans le même tampon ; ainsi la BSA-FITC non adsorbée ne perturbe pas la mesure. Il a également été vérifié que les billes seules ne contribuent pas au signal de fluorescence.

Cette mesure de fluorescence des billes n’est possible que si l’adsorption est irréversible -



**FIGURE 3.8** – Gamme en BSA-FITC dans les conditions ci-dessus. Tampon MES pH 6, NaCl 10mM.

au moins à l'échelle de temps du rinçage des billes -, et si la fluorescence de la FITC n'est pas affectée par le fait que la BSA soit adsorbée. Dans ce cas, les fractions adsorbées obtenues d'après le surnageant et les billes doivent naturellement être identiques. Les résultats, sur la figure 3.9, montrent que tel est le cas.

Aux fortes concentrations en billes, celles-ci s'agrègent de façon importante en présence de BSA (cf chapitre 4). Les agrégats ne pouvant être défaits, il n'est alors plus possible de mesurer la fluorescence, ce pourquoi la courbe n'est pas complète.

Un autre point intéressant à discuter est la précision des mesures, représentée par les barres d'erreur sur la figure. En effet on peut voir sur cette figure que pour les faibles concentrations en BSA, la précision est meilleure si on dose les billes et non le surnageant.

Suivant la méthode choisie, la fraction adsorbée  $F$  est :

$$F = 1 - \frac{\text{Surnageant} - \text{Blanc}}{\text{Référence} - \text{Blanc}} \text{ ou } F = \frac{\text{Billes} - \text{Blanc}}{\text{Référence} - \text{Blanc}}$$

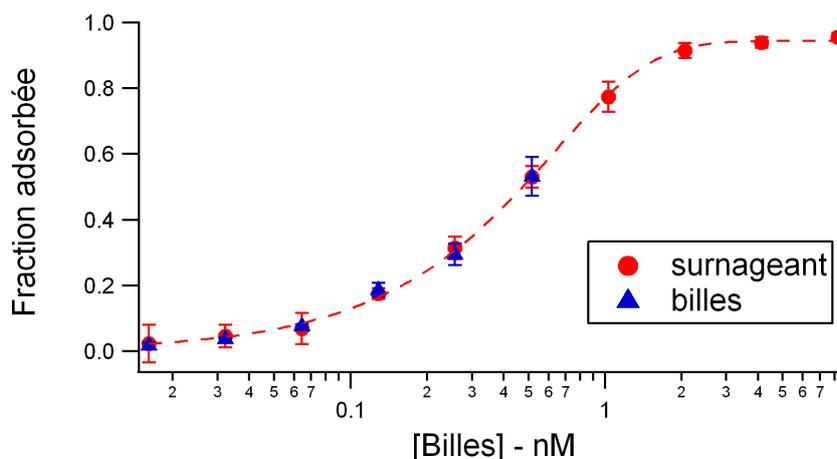
qu'on notera plus simplement :

$$F = 1 - \frac{\tilde{S}}{\tilde{R}} \text{ ou } F = \frac{\tilde{B}}{\tilde{R}}$$

L'incertitude sur la mesure peut être estimée par :

$$\frac{dF}{F} = \frac{d\tilde{S}}{\tilde{S}} + \frac{d\tilde{R}}{\tilde{R}} \text{ ou } \frac{dF}{F} = \frac{d\tilde{B}}{\tilde{B}} + \frac{d\tilde{R}}{\tilde{R}}$$

Or la mesure de fluorescence est relativement d'autant plus précise que la fluorescence est importante. Ainsi, si  $Fraction_{adsorbée} > 0.5$  (gauche du graphique), la fluorescence des billes est plus importante que celle du surnageant,  $\frac{dF}{F}$  est donc minimal en mesurant la fluorescence des billes. *A contrario* on préférera quantifier l'adsorption d'après le signal du surnageant si



**FIGURE 3.9** – Fraction de BSA adsorbée mesurée d’après le signal de fluorescence des billes et du surnageant. La solution contenait initialement  $1.5\mu\text{M}$  de BSA. Les barres d’erreur représentent les écart-types sur 4 mesures pour le surnageant et 3 mesures pour les billes, mesures effectuées à plusieurs mois d’intervalle.

$Fraction_{adsorbée} < 0.5$ .

Cette méthode a néanmoins des limites : elle ne permet pas d’étudier le cas des très faibles quantités de protéines adsorbée. Si la fraction adsorbée ne représente que 1-2% de la BSA totale, plusieurs lavages devront être effectués - au moins 3 ou 4 - pour que la fluorescence du surnageant devienne négligeable devant celle des billes. L’imprécision de la mesure devient également plus grande que la mesure elle-même, aucune information ne peut donc être conservée.

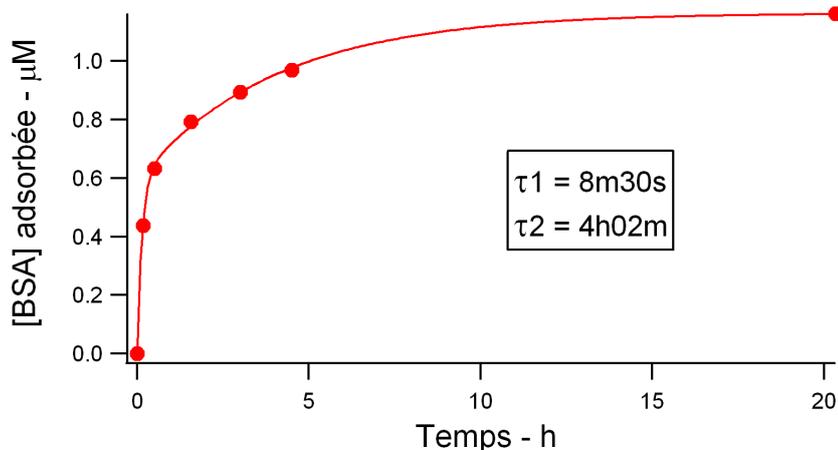
### Effet cinétique

Il s’agit enfin de vérifier que les mesures observées sont réellement obtenues en régime stationnaire. Pour cela, une cinétique d’adsorption a été réalisée à pH 6, le résultat se trouve sur les figure 3.10.

Deux temps caractéristiques sont présents, le plus important étant qu’une dizaine d’heures est suffisant pour atteindre l’équilibre avec une bonne approximation. Les mesures réalisées au bout de 24h sont donc effectivement des mesures à l’équilibre.

### Adsorption de la BSA et de la BSA-FITC

Les mesures d’adsorption vont donc être réalisées avec de la BSA greffée avec des groupements FITC. Le comportement de la BSA-FITC est probablement très proche de celui de



**FIGURE 3.10** – Adsorption de  $1.5\mu\text{M}$  de BSA-FITC sur  $8.2\text{nM}$  de billes à pH 6 + NaCl 10mM. Le fit est obtenu par une double exponentielle de temps caractéristiques 8min30s et 4h02.

la BSA, il n'est pourtant pas à exclure que le greffage ait modifié sa structure et donc son comportement d'adsorption.

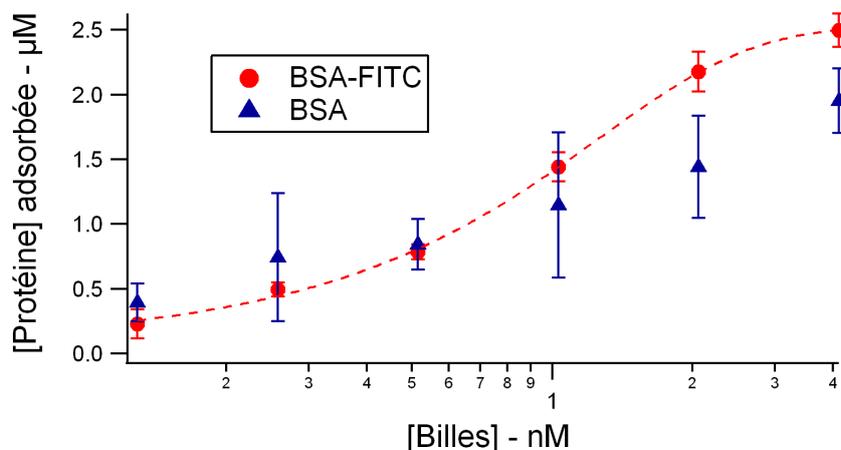
Une mesure d'adsorption de la BSA non greffée a donc également été réalisée. Le protocole d'incubation est similaire, seuls les volumes sont modifiés - multipliés par 3 - pour avoir suffisamment de signal. La détection se fait par mesure de la fluorescence des tryptophanes : excitation à 280nm et émission à 346nm. La mesure est faite en plaque noire, avec  $50\mu\text{L}$  d'échantillon, sans Tween ajouté.

La comparaison des mesures d'adsorption de la BSA et de la BSA-FITC, sur 3 réplicats, est en figure 3.11. La première remarque est que les mesures de l'adsorption de la BSA sont très imprécises, malgré la hausse de volume, l'utilisation des plaques noires et l'absence de surfactant - cette imprécision justifie l'utilisation de la BSA-FITC. Les résultats d'adsorption obtenus pour les deux types de BSA sont proches, mais l'imprécision des mesures ne permet cependant pas d'affirmer que l'adsorption est parfaitement similaire.

### 3.2.5 Conclusion

Bien que la BSA s'adsorbe sur toutes les parois, que celle-ci n'émette par défaut qu'un faible signal, que le signal de fluorescence ne soit pas stable, un protocole permettant de réaliser des mesures fiables a été mis au point. Les points principaux sont l'utilisation de BSA marquée pour augmenter le signal, et l'utilisation de particules colloïdales pour augmenter les concentrations de travail, ce qui permet de diminuer les adsorption parasites.

Les mesures d'adsorption de protéines peuvent à présent être réalisées. Il s'agira de s'inté-



**FIGURE 3.11** – Adsorption comparée de la BSA et de la BSA-FITC. Les concentrations initiales sont de 3µM, le tampon est de MES pH 5.5 + NaCl 10mM.

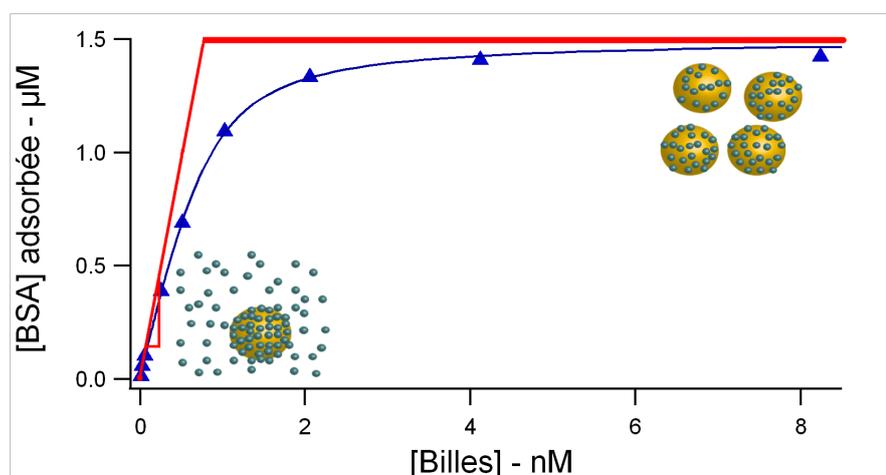
resser particulièrement au couple BSA - silice, en vérifiant que les principales observations sont également valables sur d'autres surfaces et d'autres protéines.

### 3.3 Mesures d'adsorption de protéines

#### 3.3.1 Courbe d'adsorption

Les premières mesures d'adsorption ont été faites avec 24h d'incubation en tampon MES pH 5.5 + NaCl 10mM ; cette valeur de pH permet d'observer une forte adsorption de la BSA. Les résultats obtenus sont sur la figure 3.12. Les faibles concentrations en billes entraînent une faible quantité de BSA adsorbées : de nombreuses protéines restent en solution. Aux fortes concentrations en billes, la totalité des BSA est adsorbée.

Le modèle de Langmuir ajuste parfaitement les données expérimentales ; les deux paramètres sont  $K_D = 370nM$  et  $monocouche = 2,000BSA/billes$ . Le diamètre des nanoparticules étant de 150nm, les BSA occupent une surface de  $36nm^2$ . Le rayon hydrodynamique de la BSA étant de 3.48nm [Ikeda and Nishinari, 2000], cela correspond à une surface de  $\sim 38nm^2$ , en bon accord avec la surface obtenue expérimentalement. Il est également possible d'ajuster avec un modèle d'adsorption irréversible, auquel cas  $monocouche = 2,000BSA/bille$ .



**FIGURE 3.12** – Adsorption de  $1.5\mu\text{M}$  de BSA-FITC à différentes concentrations en billes. Le fit bleu est obtenu avec le modèle de Langmuir,  $K_D = 370\text{nM}$  et  $\text{monocouche} = 2,000\text{BSA/billes}$ ; le fit rouge correspond à une adsorption irréversible, la pente à l'origine indique le nombre de BSA dans la monocouche :  $2,000\text{BSA/billes}$ . L'adsorption a lieu en tampon MES 10mM pH 5.5, NaCl 10mM.

### 3.3.2 Effet de l'électrostatique

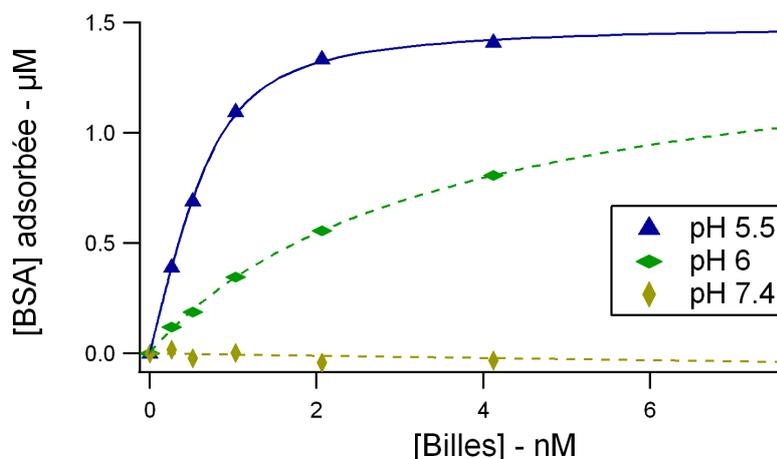
Il est possible de modifier la force des interactions électrostatiques du système de deux façons différentes. La première possibilité consiste à modifier le pH : on modifie dans ce cas les densités de charges des protéines ainsi que des surfaces. La deuxième consiste à modifier la force ionique via la concentration en NaCl. La longueur de Debye est ainsi modifiée, les objets pourront explorer des configurations dans lesquelles ils seront plus ou moins proches.

#### pH

A partir des résultats à pH 5.5, le pH est porté à 6 puis à 7.4, en maintenant la force ionique à 10mM - cf figure 3.13. La baisse de la pente initiale indique une plus faible quantité de protéines adsorbées à saturation : ce phénomène s'explique clairement par une augmentation de la répulsion électrostatique, aussi bien entre les protéines et la surface qu'entre les protéines adsorbées à la surface. Il est en effet impossible de séparer les deux possibilités, qui mènent au même résultat.

#### NaCl

La deuxième façon de modifier les interactions électrostatiques est de modifier la force ionique. En augmentant la concentration en NaCl, la portée des répulsions électrostatiques est diminuée, une plus grande adsorption est attendue. Ce résultat est effectivement observé à pH



**FIGURE 3.13** – Adsorption de  $1.5\mu\text{M}$  de BSA-FITC à différentes concentrations en billes. L'adsorption a lieu pour une force ionique de  $\sim 10\text{mM}$ , le pH varie de 5.5 à 7.4. La courbe à pH 5.5 est ajustée par le modèle de Langmuir, modèle qui n'ajuste pas correctement à pH 6 et pH 7.4 - seul un guide pour les yeux est représenté.

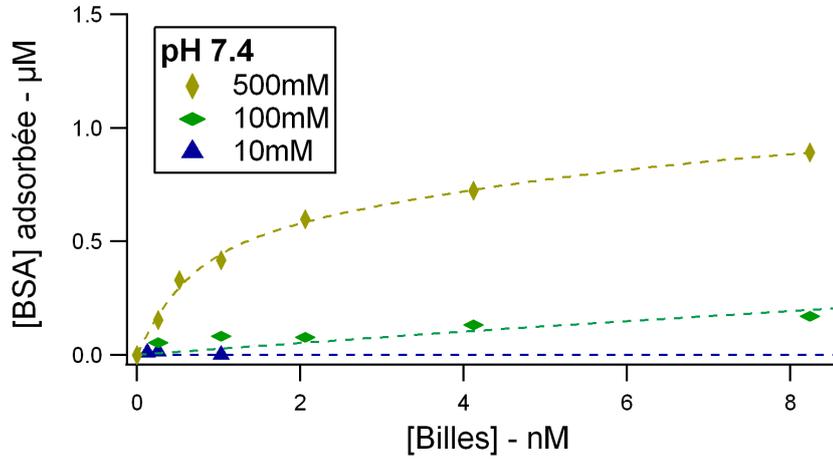
7.4, cf figure 3.14. Alors qu'aucune adsorption n'est observée à  $10\text{mM}$  de NaCl, la pente initiale augmente fortement pour  $500\text{mM}$  de NaCl. A noter qu'à ce pH le modèle de Langmuir ne permet pas d'ajuster correctement les données.

A pH 6 une augmentation de  $[\text{NaCl}]$  permet d'adsorber la totalité des BSA (figure 3.15). Pour  $100\text{mM}$  et  $500\text{mM}$  le fit de Langmuir est approprié, à  $500\text{mM}$  la valeur de  $K_D$  pour une *monocouche* fixée à  $2,000$  BSA/bille est de  $820\text{nM}$ .

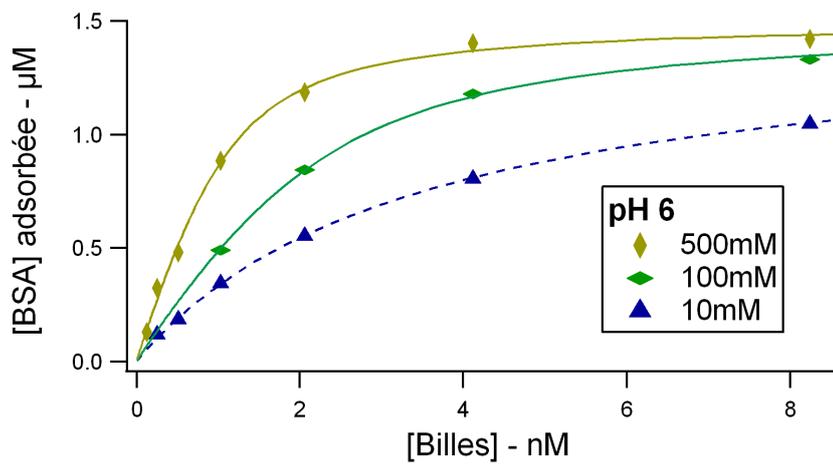
Enfin, à pH 5.5, la concentration en sel n'a qu'une très faible influence sur l'adsorption de la BSA, comme le montre la figure 3.16. C'est à ce pH, où l'adsorption est la plus forte, que le fit de Langmuir correspond le mieux, avec  $K_D = 200\text{nM}$  pour pH 5.5.

Il est à remarquer qu'un modèle irréversible permet d'ajuster les courbes uniquement à pH 5.5, et pas aux pH plus élevés. Un modèle à un unique paramètre ne permet donc pas de rendre compte du phénomène, deux paramètres ne semblent pas non plus suffisants, en particulier à pH 7.4.

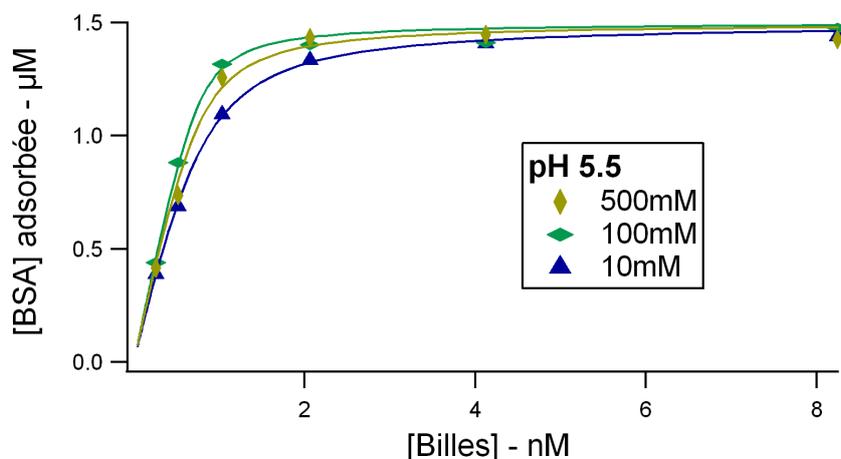
A pH donné, une augmentation de la quantité de sel diminue donc les répulsions électrostatiques, les protéines sont plus aptes à se lier à la surface : la constante de dissociation  $K_D$  diminue.



**FIGURE 3.14** – Adsorption de 1.5µM de BSA-FITC à différentes concentrations en billes. L'adsorption a lieu en tampon phosphate 10mM pH 7.4; la concentration en NaCl ajouté varie de 0 à 500mM. Le modèle de Langmuir n'ajuste les données que pour 100 et 500mM de NaCl.



**FIGURE 3.15** – Adsorption de 1.5µM de BSA-FITC à différentes concentrations en billes. L'adsorption a lieu en tampon MES 10mM pH 6; la concentration en NaCl varie de 10 à 500mM.



**FIGURE 3.16** – Adsorption de 1.5µM de BSA-FITC à différentes concentrations en billes. L'adsorption a lieu en tampon MES 10mM pH 5.5 ; la concentration en NaCl varie de 10 à 500mM.

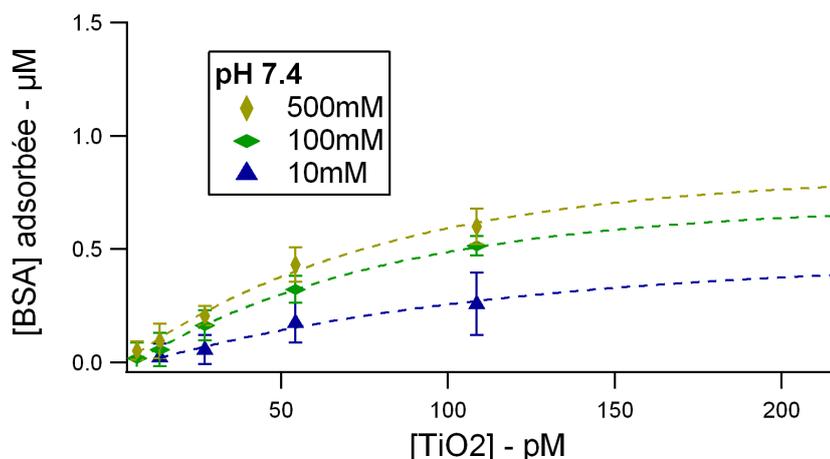
#### BSA sur TiO<sub>2</sub>

Après avoir retrouvé ces effets sur le système BSA-FITC/SiO<sub>2</sub>, il est intéressant de voir si ces résultats sont aussi valables pour le couple BSA-FITC/TiO<sub>2</sub>.

L'adsorption a donc été testée dans les mêmes conditions de pH et de force ionique, les résultats se trouvent en figure 3.17. Du fait de l'important indice de réfraction des particules de TiO<sub>2</sub>, le dosage de la BSA-FITC adsorbée sur les billes n'est pas possible ; les mesures pour les faibles quantités de protéine adsorbée (pour les faibles concentrations en bille) ne sont donc pas précises.

A pH 7.4 un effet similaire de la présence de NaCl a été obtenu : une augmentation de la concentration en NaCl entraîne une augmentation de la quantité de protéines adsorbées.

Les particules de TiO<sub>2</sub> ont un diamètre proche de 500nm, et sont légèrement plus polydisperses que les particules de silice. Il est néanmoins possible d'estimer le nombre de BSA dans la monocouche à saturation d'après les pentes à l'origine du graphe 3.17, les valeurs à pH 7.4 pour les deux types de particules, ainsi qu'à pH 5.5 pour les particules de silice se trouvent dans le tableau ci-dessous.



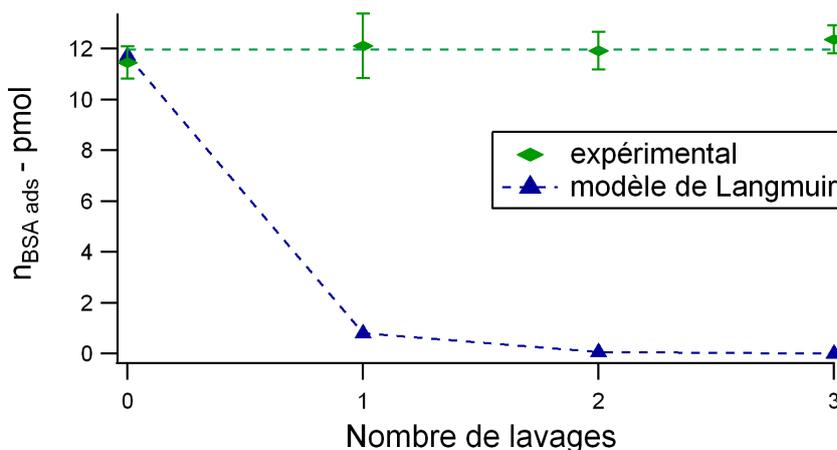
**FIGURE 3.17** – Adsorption de 1.5µM de BSA-FITC à différentes concentrations en particules de  $TiO_2$ . la mesure est à faite à pH 7.4, la concentration en NaCl varie de 10 à 500mM.

	monocouche à saturation	SiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub>
pH 5.5	nombre de BSA	1,400	
NaCl 10mM	densité - mg/m <sup>2</sup>	2.2	
	surface par BSA - nm <sup>2</sup>	50	
pH 7.4	nombre de BSA	710	8,100
NaCl 500mM	densité - mg/m <sup>2</sup>	1.1	1.1
	surface par BSA - nm <sup>2</sup>	100	96

La densité de protéines obtenue est donc très proche entre les surfaces de titane et de silice à pH 7.4; cette densité est comme observée précédemment inférieure à celle obtenue à pH 5.5.

L'adsorption de BSA sur les surfaces est donc gouvernée par l'électrostatique via le pH et la force ionique. Etant donné les courbes d'adsorption obtenues, le modèle de Langmuir peut souvent être utilisé pour approximer les données, même s'il ne permet pas d'ajuster les données dans le cas des faibles adsorptions.

Si ce modèle était valable aux fortes adsorptions, alors l'adsorption devrait être réversible; sinon un autre modèle doit être envisagé. Ce point fait l'objet de la partie suivante.



**FIGURE 3.18** – Désorption de la BSA-FITC de particules de  $SiO_2$  en fonction du nombre de lavages. Initialement  $1.5\mu M$  de BSA-FITC ont été adsorbés sur  $2nM$  de billes, à  $500mM$  en  $NaCl$ . Après lavage et dilution  $10X$ , l'échantillon est mis à désorber, chaque étape de désorption durant une journée.

### 3.4 Réversibilité et adsorption multi-sites

#### Irréversibilité par dilution infinie

A la base du modèle de Langmuir, il y a un équilibre entre la fraction de protéines adsorbées et la fraction de protéines restantes en solution : ce ratio est déterminé par la valeur de  $K_D$ . Il est donc important de valider expérimentalement cette hypothèse afin de pouvoir valider cette hypothèse.

Pour ce faire, après une première adsorption, le surnageant d'un mélange de billes incubées avec de la BSA-FITC a été retiré. Ceci doit décaler l'équilibre : des protéines adsorbées devraient se désorber afin que l'équilibre protéines adsorbées/protéines en solution soit à nouveau respecté, d'autant plus qu'après lavage elles ont été diluées  $10X$ . Ceci a été testé dans un cas où une forte désorption est attendue : à  $pH\ 7.4$  avec  $500mM$  de  $NaCl$ . La figure 3.18 montre le résultat obtenu.

Dans cette configuration - avec  $monocouche = 2,000\ BSA/bille$  et  $K_D = 5,500nM$  -, dès le premier lavage  $90\%$  des protéines auraient dû se déborder. Ce n'est pas ce qui est observé puisque les particules émettent toujours la même intensité de fluorescence, et ce même après plusieurs lavages. Au vu des valeurs de  $k_{on}$  et  $k_{off}$  qui peuvent être obtenues d'après les cinétiques d'adsorption, une journée de désorption est pourtant suffisante pour atteindre l'équilibre.

Ces résultats sont en accord avec la figure 3.9, qui compare les résultats d'adsorption selon que le dosage se fait d'après les billes ou d'après le surnageant. Si une désorption rapide avait

lieu - durant moins de 10 minutes - de la BSA-FITC se désorberait des particules au cours des lavages. L'adsorption mesurée d'après la fluorescence des billes serait donc différente de celle obtenue d'après la fluorescence des surnageants. Ce premier résultat montrait qu'aucune désorption n'avait lieu en 10 minutes, cette nouvelle mesure démontre que la réaction est également irréversible à l'échelle de plusieurs jours : le protocole utilisé est donc correct. Il est à noter que la désorption a également été testée à pH 5.5, pH 6, dans différentes conditions de NaCl ainsi que sur les particules de titane, mais aucune désorption n'a jamais été observée.

A pH 7.4 avec 500mM de NaCl, la courbe  $[BSA]_{ads} = f([billes])$  ne s'ajustait déjà pas parfaitement avec le modèle de Langmuir. Des ajustements du modèle étaient certes possible pour mieux rendre compte des résultats, mais cette mesure remet en cause la base même de ce modèle, à savoir la réversibilité imposée par un équilibre thermodynamique. Le modèle de Langmuir n'est donc pas un modèle valable pour décrire les mesures d'adsorption de la BSA sur les particules de silice et de titane.

#### 3.4.1 Réversibilité par compétition

L'adsorption n'est pourtant pas irréversible dans toutes les conditions : deux expériences sont présentées où les BSA-FITC adsorbées sur de la silice ont pu être désorbées.

##### Changement de force ionique

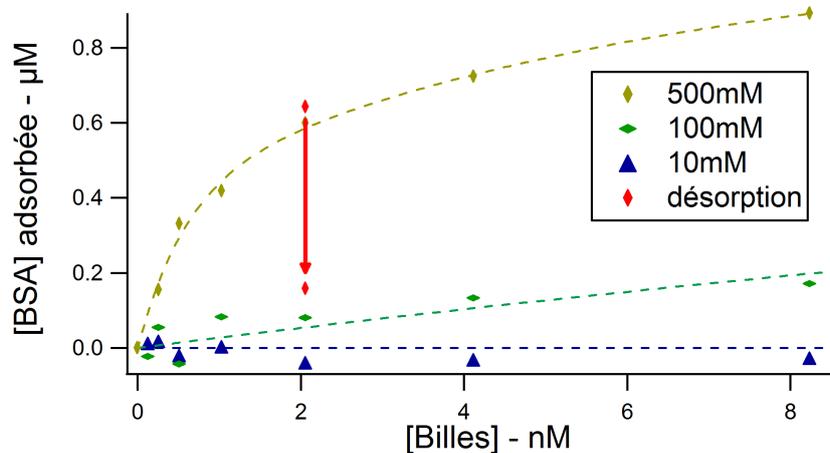
La première consiste à abaisser la force ionique, à pH 7.4, comme montré sur la figure 3.19. La protéine est initialement adsorbée à 500mM de NaCl, puis après deux lavages cette concentration est amenée à  $\sim 20$ mM.

Au bout de deux jours, une part importante de la BSA-FITC s'est désorbée. Les protéines semblent pourtant garder une mémoire de leur première adsorption, car le niveau d'adsorption observé après le changement de force ionique est bien supérieur à celui qui serait obtenu en mettant en contact billes et protéines à 20mM de NaCl.

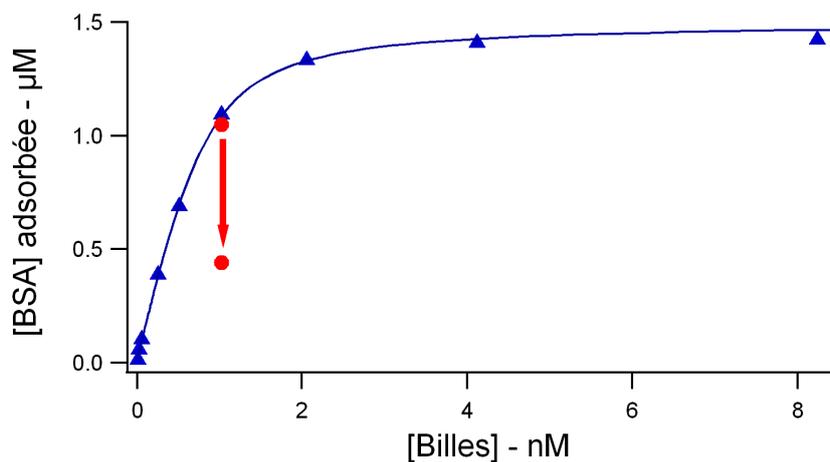
##### Compétition BSA - BSA

La deuxième possibilité consiste à rajouter un large excès de BSA non marquées. Le résultat de cette expérience, réalisée à pH 5.5, se trouve dans la figure 3.20. En trois jours, la moitié des BSA-FITC se sont donc désorbées, au profit des BSA placées en excès.

Ces deux expériences montrent que l'adsorption n'est pas irréversible, mais que l'approche de Langmuir ne permet pas pour autant d'ajuster les résultats. Elles suggèrent par contre l'idée



**FIGURE 3.19** – Désorption de BSA-FITC à pH 7.4. L'adsorption de  $1.5\mu\text{M}$  sur  $2\text{nM}$  de billes a lieu à NaCl  $500\text{mM}$ . Après deux lavages, ce taux est ramené à  $20\text{mM}$ . La désorption est superposée à la figure 3.14. L'adsorption a lieu pendant une journée, la désorption pendant deux jours.



**FIGURE 3.20** – Désorption de BSA-FITC par ajout de BSA non marquée  $1\%$ . Expérience réalisée en MES pH  $5.5$  + NaCl  $10\text{mM}$  avec  $1.03\text{nM}$  de billes. Suite à une adsorption avec  $1.5\mu\text{M}$  pendant une journée, la désorption a eu lieu pendant 3 jours.

d'une adsorption multi-sites, dans laquelle la protéine se lierait à la surface via plusieurs régions de sa surface. Ce modèle est présenté ci-dessous.

### 3.5 Simulation : modèle multi-sites

L'hétérogénéité de la répartition des charges de la BSA laisse supposer qu'elle peut s'adsorber via plusieurs régions. Le modèle décrivant au mieux cette existence de plusieurs zones d'adsorption est donc un modèle multi-sites.

Ce modèle n'est pas nouveau, il a notamment été développé pour représenter qualitativement l'adsorption de polymères sur les interfaces [Fleer et al., 1993]. Mais là encore la complexité est telle que le phénomène n'est pas encore compris : *it is fair to say that the question concerning the equilibrium of the adsorption process remains currently unresolved* [Borkovec and Papastavrou, 2008].

#### 3.5.1 Application aux anticorps

Dans certains systèmes tels le Biacore, la reconnaissance entre anticorps et antigènes se fait par greffage de l'un des deux sur une surface. Soit l'antigène est greffé sur la surface et l'anticorps en solution s'y adsorbe, soit l'antigène en solution s'adsorbe sur l'anticorps fixé à la surface. Les mêmes affinités étaient attendues dans les deux cas, mais les résultats expérimentaux ont montré deux comportements différents. Cette différence a pu s'expliquer par un modèle d'adsorption multi-sites, comme décrit par exemple dans Kaufman and Jain [1992].

Les anticorps possèdent deux sites réactifs - comme présenté dans la figure 3.21 -, qui peuvent tous deux se lier à un antigène. Cette nuance introduit le terme d'avidité - décrivant l'ensemble de l'interaction -, par opposition à l'affinité - qui ne décrit qu'une seule interaction.

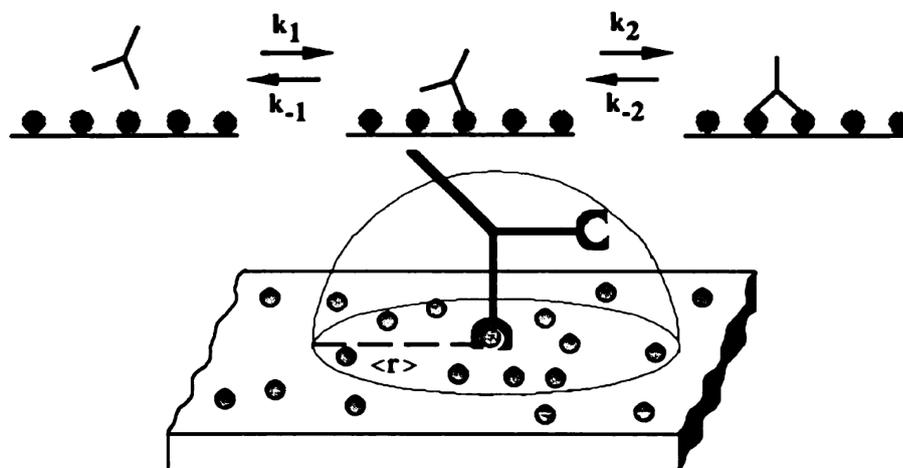
La première adsorption est caractérisée par une constante d'association  $k_1$  et une constante de dissociation  $k_{-1}$ . La constante d'affinité  $K_1$  est alors définie par

$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[AbAg]_s}{2[Ab][Ag]_s}$$

où  $[AbAg]_s$  et  $[Ag]_s$  sont les concentrations surfaciques en anticorps lié une fois et en antigène. La constante d'affinité de la deuxième adsorption s'écrit

$$K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}} = \frac{2[AbAg_2]_s}{[AbAg]_s[Ag]_s}$$

avec  $[AbAg_2]_s$  concentration surfacique en anticorps lié deux fois. Seul la concentration en anticorps libre  $[Ag]$  est donc une concentration volumique.



**FIGURE 3.21** – Haut : adsorption en deux temps d'un anticorps sur une surface recouverte d'antigènes. Les constantes d'association et de désorption sont différentes entre la première et la deuxième adsorption : la deuxième dépend de la concentration locale en antigènes (bas) [Kaufman and Jain, 1992].

L'anticorps étant ancré à la surface, la deuxième adsorption est accélérée, l'extrémité de la chaîne non liée voit une concentration locale en antigène plus élevée, comme le montre la figure 3.21 (bas). La constante d'affinité de la deuxième adsorption est liée à celle de la première adsorption via

$$K_2 = \frac{3}{2 \langle r \rangle} \cdot K_1$$

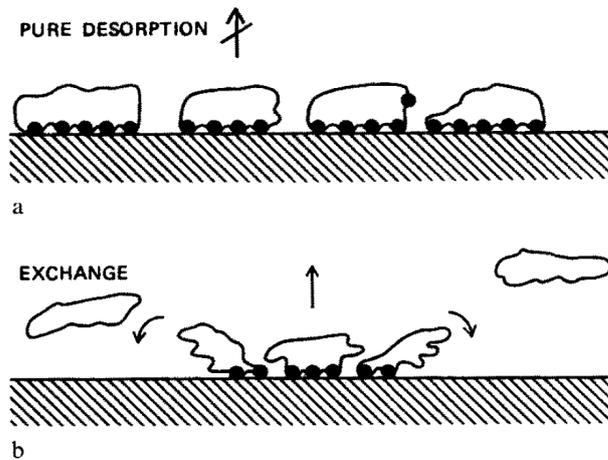
où  $\langle r \rangle$  est la distance moyenne entre les deux sites d'adsorption de l'anticorps.

La constante d'équilibre globale de la réaction n'est donc pas simplement  $K_1^2$ , mais une constante qui dépend de la concentration surfacique en antigène. Si cette concentration est suffisamment élevée, l'anticorps effectue donc deux liaisons avec la surface.

Dans le cas d'une adsorption mono-site, il suffit de défaire un lien pour qu'une protéine se désorbe. Dans le cas d'une adsorption à deux sites, les deux liens doivent être défaits simultanément pour que la désorption ait lieu. Or cette probabilité est beaucoup plus faible : l'avidité pour la surface est beaucoup plus importante - et elle augmente avec le nombre de liens.

### 3.5.2 Application aux protéines

Nous montrons à présent que ce modèle multi-sites peut être appliqué à l'adhésion non spécifique des protéines, en particulier pour modéliser la désorption de BSA dans différentes conditions. L'idée d'appliquer un tel modèle aux protéines date des années 1970 [Jennissen, 1976]. Le modèle est également détaillé dans Andrade and Hlady [1986], une représentation schématique des protéines est visible en figure 3.22.



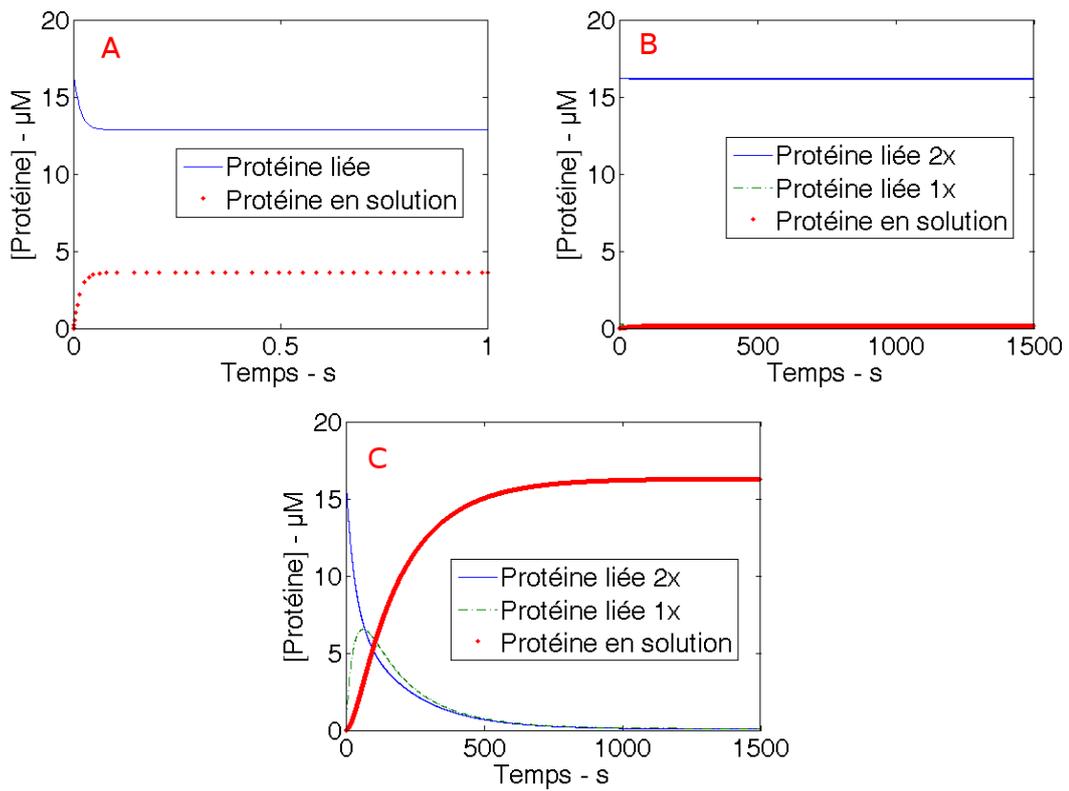
**FIGURE 3.22** – Représentation schématique de l’adsorption multi-sites entre une protéine et la surface. Aucune désorption n’a lieu par dilution, mais un échange entre protéines adsorbées et protéines en solution est possible 3.22.

Une simulation a été réalisée pour modéliser la désorption de la BSA adsorbée sur de la silice après avoir retiré du milieu toutes les BSA non adsorbées. Pour cela, on considère une solution de 8.2nM de billes, saturées chacune de 2,000 BSA. Il est considéré que la protéine possède au moins deux régions capables de créer un lien avec la surface - en se limitant à deux pour la simulation. Les résultats sont dans la figure 3.23.

Tout d’abord, le modèle à un seul site pour référence donne une désorption non négligeable, le  $K_D$  étant relativement important. Puis, dans le cas d’une adsorption à deux sites (sans compétiteur), les deux sites augmentent l’affinité entre la protéine et la surface, la désorption devient quasiment nulle. En effet le  $K_D$  global de la réaction devient extrêmement faible, et une quantité négligeable de protéines désorbées suffit à atteindre le nouvel équilibre. Enfin, avec un compétiteur à un site 100 fois plus concentré, la désorption se fait de façon quasi-totale. Le compétiteur ayant la même affinité pour la surface que la protéine, on retrouve approximativement ce facteur 100 en comparant les quantités adsorbées à la surface.

Ce modèle permet donc de rendre compte des principales observations sur la désorption : aucune désorption ne se produit par dilution, mais elle se produit en présence d’un compétiteur. Pour cela, le compétiteur s’adsorbe progressivement sur les sites où la protéine est adsorbée, jusqu’à entraîner le décollement de la première adsorbée.

Si la force ionique varie, un changement du  $K_D$  est attendu : ceci expliquerait pourquoi les protéines se désorbent par diminution de la concentration en sel. Alors qu’une très faible augmentation de  $K_D$  n’a aucun effet, une augmentation plus conséquente - amplifiée par les multiples sites d’adhésion - doit entraîner une désorption totale après lavage dans du tampon.



**FIGURE 3.23** – Désorption de protéines pour trois conditions différentes. Initialement, 8.24nM de billes recouvertes de 2,000 BSA sont mises dans un milieu sans BSA. A/ un seul site d'adsorption, suivant le modèle de Langmuir. B/ deux sites d'adsorptions, comme les anticorps. C/ deux sites d'adsorption, avec une protéine 100x plus concentrée en compétition - ne possédant qu'un seul site d'adsorption. Pour toute ces simulation,  $K_1 = K_2 = 1\mu\text{M}$ ,  $\langle r \rangle = 10\text{nm}$ .

Or ceci n'a pas été observé : seule une fraction se désorbe, de nombreuses BSA restant encore liées à la surface. La désorption sélective est donc due à un autre effet : les interactions entre protéines. Pour une plus faible force ionique, les interactions latérales augmentent, pouvant forcer les protéines à se désorber.

Afin de vérifier cette hypothèse, l'influence des interactions entre protéines est examinée dans la partie suivante.

#### 3.5.3 Variation de la quantité de BSA

Dans cette partie, outre la concentration en billes, la concentration en BSA-FITC est également modifiée. La figure 3.24 montre ainsi les mesures d'adsorption pour 4 concentrations en BSA différentes, à pH 6 et 10mM de NaCl.

La figure du haut représente la quantité de protéines adsorbée en fonction de la concentration en billes, et ce pour différentes concentrations en BSA-FITC. Il apparaît qu'une plus forte concentration initiale en protéines entraîne une plus grande quantité de protéines adsorbées. Afin de rendre ces résultats plus lisibles, ils sont représentés différemment dans la figure du bas.

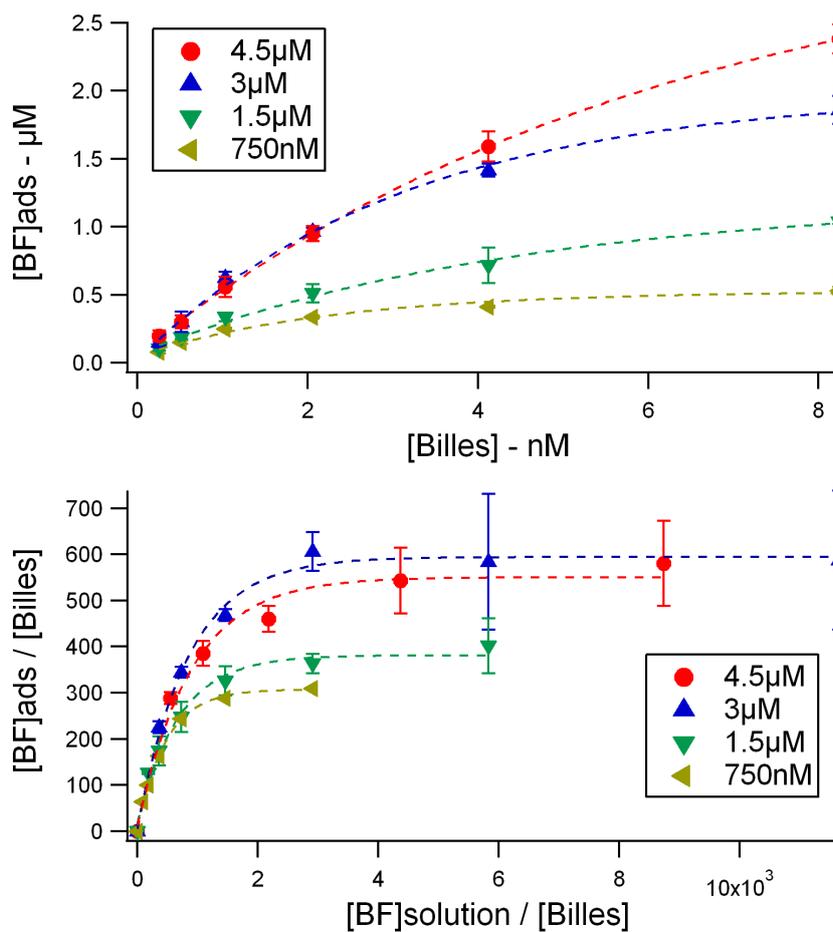
L'axe des ordonnées  $y$  représente le nombre de BSA adsorbées sur une bille, l'axe des abscisses la quantité de BSA initialement présentes en solution divisée par la quantité de billes. Les faibles valeurs en abscisse correspondent donc à un excès de billes, la totalité de la BSA est adsorbée. Les valeurs élevées en abscisse correspondent donc à l'excès de BSA, les particules sont saturées de protéines.

Comme attendu, le nombre maximal de BSA pouvant se fixer sur les billes dépend de la concentration en BSA extérieures. Il varie ainsi du simple au double - 300 à 600 - quand la concentration en BSA varie de 750nM à 4.5 $\mu$ M. Ce résultat montre donc l'importance des interactions entre protéines, permettant d'expliquer effectivement la désorption par changement de force ionique.

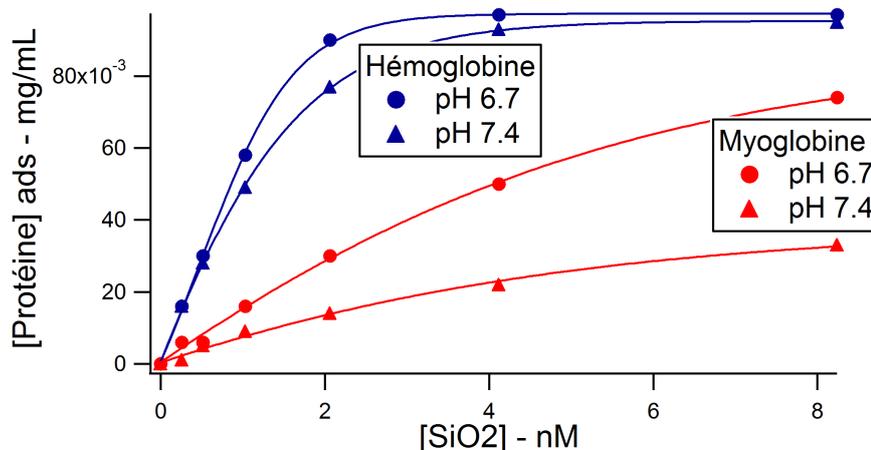
Pour finir, la meilleure façon d'illustrer le modèle d'adsorption multi-sites est de comparer l'adsorption d'une protéine monomère à un de ses multimères. Les deux protéines retenues pour cette expérience sont la myoglobine et l'hémoglobine.

#### 3.5.4 Adsorption de myoglobine et hémoglobine

L'hémoglobine est composée de 4 sous unités, dont la structure est proche de celle de la myoglobine. Les adsorptions de ces deux protéines ont été comparées à pH 6.7 et à pF 7.4, les résultats sont en figure 3.25. D'un point de vue expérimental, ces molécules n'étant pas



**FIGURE 3.24** – Mesures d'adsorption de BSA-FITC à pH 6 NaCl 10mM pour différentes concentrations de BSA-FITC en solution. Haut : quantité de protéines adsorbée en fonction de la quantité de billes. Bas : mêmes données, mais le nombre de BSA (adsorbées ou initialement en solution) est normalisé par la quantité de billes.



**FIGURE 3.25** – Adsorption de  $1.5\mu\text{M}$  d'hémoglobine et  $5.6\mu\text{M}$  de myoglobine à différentes concentrations en particules de  $\text{SiO}_2$ . L'adsorption a lieu en tampon phosphate phosphate 10mM pH 7.4 ou MES 10mM pH 6.7 + NaCl 10mM.

fluorescentes, l'absorbance à 409nm a été utilisée pour quantifier la fraction non adsorbée de protéines, comme indiqué dans le protocole de mesure.

La première observation est que la quantité adsorbée est plus importante lorsque le pH est plus proche du point isoélectrique, en accord avec les résultats précédents.

La deuxième est que le tétramère - l'hémoglobine - se fixe en plus grandes quantités que la myoglobine : la quantité de matière dans la monocouche est plus importante pour l'hémoglobine. Deux raisons expliquent cette différence. La première est que tous les monomères de myoglobine se repoussent à la surface, alors qu'ils sont au contact par 4 pour l'hémoglobine. La deuxième raison provient du modèle d'adsorption multi-sites. Les myoglobines ne pourront guère se rapprocher les unes des autres à la surface, du fait des répulsions électrostatiques. Les hémoglobines, de par leur plus grande avidité pour la surface, pourront explorer des configurations moins favorables, et ainsi minimiser l'espace entre elles.

### 3.6 Conclusion

De par leur hétérogénéité, les protéines s'adsorbent en grandes quantités sur de nombreuses surfaces. Malgré cette difficulté, un protocole de mesure a été mis au point, permettant d'obtenir des mesures précises et pour différentes conditions physico-chimiques.

Plusieurs conclusions peuvent être retenues des expériences présentées :

- la quantité maximale de protéines pouvant s'adsorber dans une monocouche dépend du

### Chapitre 3. Mesures d'adsorption de protéines

---

- pH, de la force ionique et de la concentration initiale en protéines
- le phénomène est irréversible vis-à-vis de la dilution
  - les protéines peuvent se désorber si les conditions électrostatiques sont modifiées, ou si une protéine compétitrice est ajoutée

Le paradoxe de la littérature est également retrouvé : les résultats peuvent s'ajuster par un modèle de Langmuir alors que la réaction est irréversible. Toutes ces observations orientent vers un modèle d'adsorption multi-sites, par analogie aux anticorps ou à l'adsorption des polymères. En y rajoutant des interactions latérales entre les protéines, nous avons alors montré qu'un tel modèle permet de rationaliser l'ensemble des observations effectuées.

Nous voyons ensuite dans la partie suivante en quoi cette adsorption peut entraîner de l'agrégation non spécifique, ce qui est une difficulté pour les mesures d'agrégation spécifiques.

## Chapitre 4

# Protéines et stabilité colloïdale

Dans toutes les applications citées précédemment, que ce soit à des fins agroalimentaires ou médicales, les solutions de colloïdes doivent rester dispersées ; ce point représentant souvent un défi pour le formulateur. Expérimentalement cette stabilité est souvent assurée par des tensio-actifs, les surfactants dont les performances ont été remarquées lors d'un screening sont appliqués au niveau industriel.

Les protéines sont fréquemment utilisées comme agent stabilisant. Elles peuvent ainsi stabiliser des émulsions [McClements, 2004], ou protéger des adsorptions parasites, par exemple dans les tests ELISA [Steinitz, 2000].

Outre ces capacités protectrices, les protéines peuvent également entraîner l'agrégation de particules. Bharti et al. [2011] ont ainsi récemment montré que les lysozymes - chargés positivement - agrégeaient les particules de silice - chargées négativement -, avec une forme d'amas dépendant des paramètres physico-chimiques.

L'étude de l'agrégation des colloïdes induite par les protéines demeure néanmoins un domaine encore peu étudié : il est ainsi difficile de prédire si des protéines chargées négativement entraineront également de l'agrégation, ou de la stabilisation. Si certaines protéines stabilisent les particules elles pourraient pourtant remplacer les surfactants ; avec éventuellement une meilleure protection des particules contre l'agrégation induite par le plasma.

Dans cette partie, nous cherchons donc tout d'abord à comprendre quel effet les protéines peuvent avoir sur l'agrégation, en faisant le parallèle avec les mesures d'adsorption. Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à la stabilisation de solutions de silice dispersées par des protéines, en espérant obtenir un système plus stable, et ainsi moins sensible à la présence de grandes quantités de protéines. Cela pourrait ainsi améliorer les performances des tests de diagnostic, à présents limités par la formation d'agrégats non spécifiques.

### 4.1 Compréhension du phénomène

Dans un premier temps il s'agit donc de comprendre les paramètres qui gèrent ce phénomène. Pour ce faire, en lien avec la partie 3, les premières mesures seront réalisées sur des particules silice -  $R=75\text{nm}$  - sur lesquelles s'adsorbe de la BSA, non marquée.

Le nombre de liens formés dépend de la concentration en protéine et de leur réactivité vis-à-vis de la surface, mais également de la fraction volumique en particules. Afin de ne sonder que l'impact des protéines, il est nécessaire de garder une quantité de billes constante. Il ne s'agira donc plus de faire varier les quantités de billes à concentration en protéine fixée : ce sont les concentrations en protéine qui varient.

Dans un deuxième temps les mesures seront réalisées sur des particules proches de celles utilisées dans le diagnostic -  $R=110\text{nm}$  - ; elles possèdent également un coeur magnétique, mais ont ici une surface en silice.

#### 4.1.1 Mise en évidence du phénomène

##### Particules non magnétiques - incubation 24h

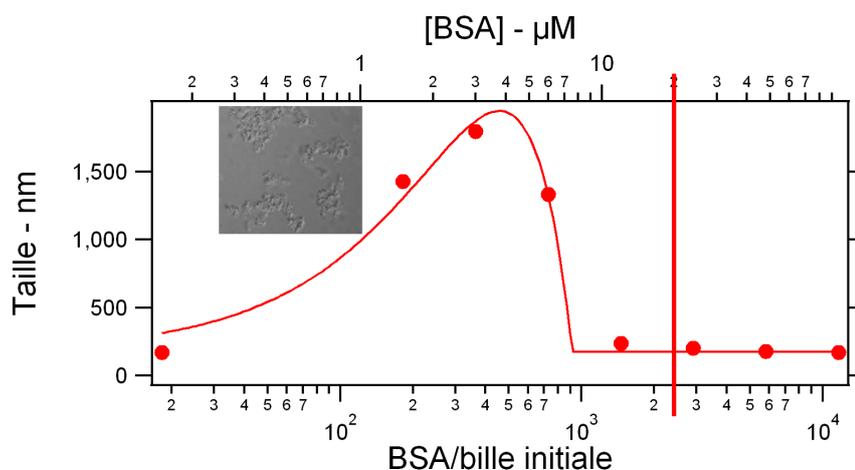
Pour ces particules, l'agrégation est estimée en réalisant une mesure de DLS, la taille mesurée étant liée à l'état d'agrégation de la solution. Il est important de noter que cette mesure n'est pas quantitative, elle permet essentiellement de savoir si les particules sont stables - la taille mesurée correspond à la taille des particules isolées - ou agrégées - les tailles mesurées peuvent être supérieures à  $1\mu\text{m}$ .

Pour ces mesures, les particules de silice, à  $1.7\%$  -  $8.2\text{nM}$  -, ont été incubées pendant 24h avec différentes concentrations en BSA. Après l'incubation une mesure de taille a été réalisée, les résultats se trouvent sur la figure 4.1.

La photo au microscope montre un échantillon fortement agrégé. On y voit des agrégats contenant plusieurs dizaines de billes, agrégats non sphériques et très polydisperses ; plus aucune bille n'est isolée en solution. Cette photo illustre l'impossibilité de remonter à un état d'agrégation précis à partir d'une mesure de DLS. Néanmoins, d'après la courbe Taille=f([BSA]), trois régimes apparaissent sur le graphe.

Pour  $[\text{BSA}] = 0$ , la taille mesurée correspond à la taille des particules. Les particules sont donc stables en MES pH 5.5 + NaCl 10mM : sans ajout de BSA les particules sont stables en solution.

Pour les concentrations élevées en BSA, les particules sont également stables, même si les



**FIGURE 4.1** – Taille des particules de silice en DLS après 24h d’incubation avec de la BSA, en tampon MES 10 mM pH 5.5 + NaCl 10mM. [Billes] = 8.24nM (1.7%). Le point pour la plus faible concentration en BSA correspond à [BSA] = 0, la ligne verticale correspond à la quantité de BSA nécessaire pour remplir une monocouche. Le fit correspond au modèle d’agrégation détaillé ci-après. Image au microscope : échantillon au maximum d’agrégation.

tailles mesurées sont légèrement plus importantes. A de telles concentrations en billes, comme indiqué dans la partie 3, les particules sont saturées en BSA. Le rayon hydrodynamique des particules est donc plus important du fait de la présence d’une monocouche de BSA : le diamètre est mesuré à 170nm.

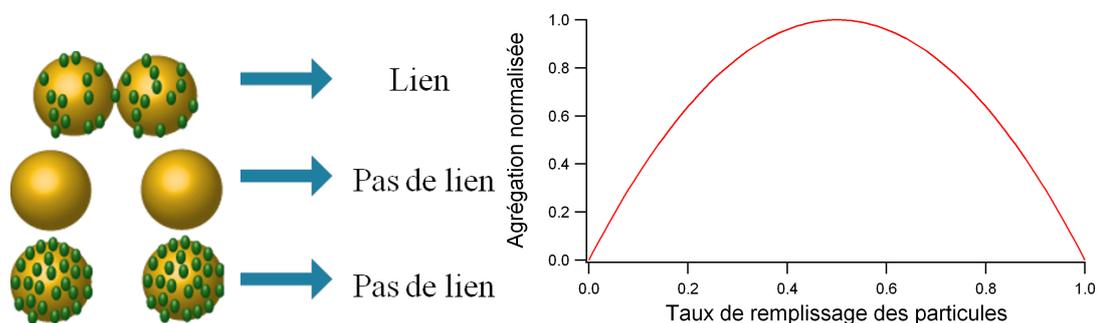
Enfin, aux concentrations intermédiaires, les tailles mesurées sont très importantes : les échantillons sont tous agrégés.

### Localisation du maximum d’agrégation

L’agrégation étant due à la BSA, le taux d’agrégation est lié à la quantité de protéines adsorbées. Un modèle simple permettant de faire le lien entre adsorption et agrégation est montré en figure 4.2 : deux particules s’agrègent uniquement si une protéine adsorbée entre en contact avec un site libre d’une deuxième particule. En notant  $\theta$  le taux de remplissage de la surface, le maximum d’agrégation - proportionnel à  $\theta \cdot (1 - \theta)$  - se situe à  $\theta = 0.5$ .

La figure 4.1 montre un maximum d’agrégation autour de 3.2µM - même si la mesure en DLS n’en permet pas une localisation précise. La concentration en billes étant de 8.2nM, ce maximum correspond donc à  $\sim 400$  protéines par bille.

D’après la partie 3, le nombre de BSA s’adsorbant sur les protéines à pH 5.5 est de 2,000, le maximum d’agrégation est attendu pour 1,000 BSA par billes. L’écart à la mesure est raisonnable, la gêne stérique en  $\theta = 1/2$  décale probablement le maximum vers une valeur plus



**FIGURE 4.2** – Modèle reliant l'agrégation à l'adsorption. Une protéine adsorbée crée un lien si elle entre en contact avec un site libre d'une autre particule. Le maximum d'agrégation s'obtient pour  $\theta = 0.5$ .

faible. Les mesures d'agrégation valident donc le modèle présenté ci-dessus dans lequel les BSA pontent les particules.

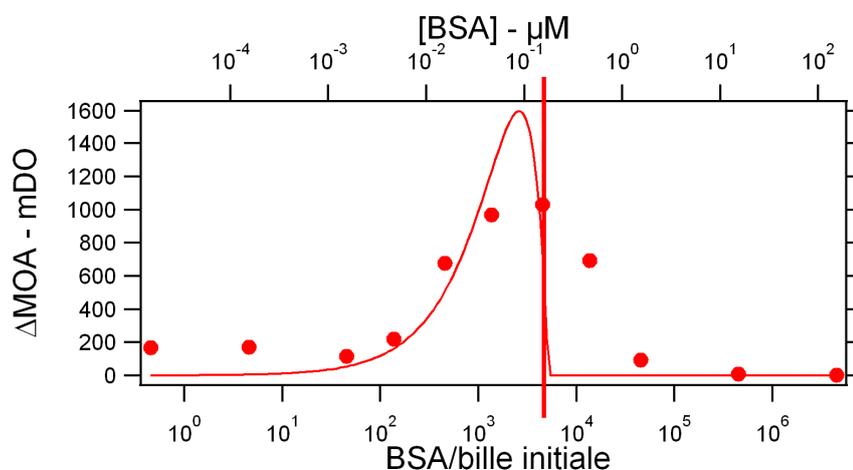
### Particules magnétiques - incubation 5min

Cette mesure a également été réalisée avec des particules constituées d'un cœur magnétique et d'une surface en silice - des particules proches de celles utilisées pour la détection de protéines. Avec une détection turbidimétrique, les concentrations en particules utilisées sont beaucoup plus faibles qu'avec les particules non magnétiques - 0.02% contre 1.7%. Pour ce système l'état d'agrégation est donnée par le paramètre  $\Delta MOA$  expliqué précédemment, donnant accès aux mesures de faibles états d'agrégation, contrairement à la DLS.

Pour se mettre dans des conditions proches d'un test de diagnostic, les particules n'ont été incubées que 5 minutes avec les protéines avant l'application du champ magnétique. La mesure a été réalisée pour une grande gamme de [BSA]. Pour les faibles concentrations il est probable, malgré le faible temps d'incubation, que l'adsorption des BSA sur les parois soit non négligeable. Les concentrations indiquées ne correspondent donc pas exactement aux concentrations réelles en solution. Les résultats se trouvent en figure 4.3.

La surface et la protéine étant les mêmes que précédemment, les résultats sont similaires. Cependant les particules ne sont pas soumises aux mêmes contraintes. Avec les billes non magnétiques, les particules vont au contact uniquement grâce à la diffusion brownienne. Les billes magnétiques, elles, sont amenées au contact grâce au champ magnétique, qui génère une force attractive importante entre les colloïdes. La réaction d'agrégation est donc accélérée, ce qui est indispensable au vu de la faible concentration en particules.

C'est dans cette situation que la BSA protège vraiment de l'agrégation. En effet à  $15\mu\text{M}$ , même avec un champ magnétique de 200mT au lieu des 20mT habituels, le variation  $\Delta MOA$



**FIGURE 4.3** – Agrégation  $\Delta MOA$  des particules de silice magnétique -  $R=110\text{nm}$  - à 0.02% (34pM). La mesure est faite en tampon phosphate-citrate 10mM pH 5.5, avec 5 minutes d'incubation. Le point pour la plus faible concentration en BSA correspond à  $[BSA] = 0$ , la ligne verticale correspond à la quantité de BSA nécessaire pour remplir une monocouche. Le fit correspond au modèle présenté ci-dessus.

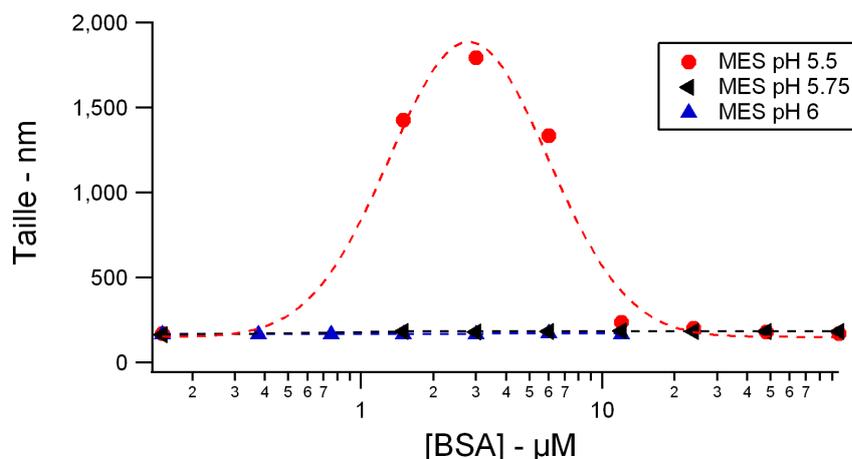
est nulle. L'utilisation de la *MOA* présente ici un avantage sur la DLS : elle permet d'affirmer qu'aucun agrégat n'est formé durant l'application du champ - la précision de la DLS ne permet pas une telle affirmation.

Le maximum d'agrégation s'obtient pour une monocouche de 5,200. D'après les résultats sur les particules non magnétiques ainsi que la différence de taille entre les types de bille, 4,300 BSA devraient s'adsorber sur chaque bille. Etant donné que l'adsorption est ici moins efficace du fait de la faible incubation, ce résultat valide encore le modèle présenté.

### Effet du pH sur l'agrégation

Les paramètres externes, tels le pH et la force ionique, ont un effet important sur l'adsorption. En modifiant l'intensité du lien BSA - bille, ils doivent donc également modifier la mesure d'agrégation. L'effet d'une hausse du pH - de 5.5 à 6 - a ainsi été testée sur ses billes non magnétiques, les résultats se trouvent dans la figure 4.4.

D'après ces mesures, l'agrégation disparaît dès pH 5.75. Deux phénomènes peuvent expliquer ce phénomène : le nombre de sites disponibles sur les billes diminue, ou l'affinité diminue. Cette expérience valide au moins la seconde hypothèse : s'il est plus difficile pour une BSA de se lier à une première surface, la deuxième adsorption est encore plus difficile, et elle n'a plus lieu : la BSA perd alors son aptitude à l'agrégation.



**FIGURE 4.4** – Mesure de la taille de particules de silice non magnétique, dans des tampons MES 10mM + NaCl 10mM dont le pH varie de 5.5 à 6.

#### 4.1.2 Étude du lien générant l'agrégation

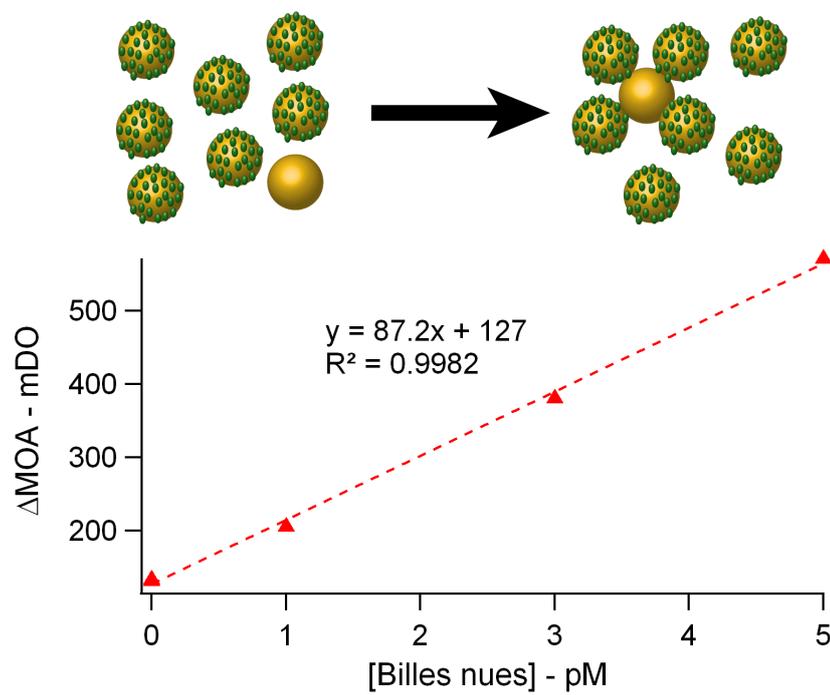
Selon les conditions, la BSA est donc capable soit d'agréger les particules de silice, soit de les protéger de l'agrégation. Mais ces mesures ne renseignent ni la nature du lien qui maintient les billes au contact, ni sur le nombre de protéines nécessaires au maintien de ce lien. L'utilisation de la méthode développée dans la partie 2 permet ici de quantifier cette agrégation, le lien entre l'augmentation du signal et le nombre de lien formé ayant été explicité.

#### Nature du lien

Les BSA restant dispersées en solution [Zhang et al., 2007], il est peu probable que l'agrégation des colloïdes soit due à un lien BSA-BSA, mais plutôt bille-BSA-bille.

Pour vérifier cette hypothèse, deux types de particules ont été mélangées, comme montré dans la figure 4.5. Différentes quantités de particules "nues" - qui n'ont pas vu de BSA - y sont mises au contact avec des particules préalablement incubées à pH 5.5 NaCl 10mM avec un excès de BSA (la quantité de billes nues reste faible de la quantité de billes saturées).

On observe que le signal obtenu est proportionnel à la quantité de billes nues ajoutées : l'agrégation est donc liée à la quantité de billes. La pente, de 87mDO/pM de billes, est bien supérieure à la pente théorique de 19mDO/pM d'antigène cible obtenue précédemment. Cette différence s'explique par la différence d'agrégats formés avec un agent cible : dans un cas seul un doublé est formé alors qu'ici une bille nue peut être recouverte de plusieurs billes saturées. Cette mesure indique que toutes les billes nues s'agrègent aux billes saturées de BSA. Les agrégats



**FIGURE 4.5** – A 34pM de billes magnétiques saturées en BSA - incubation 24h avec BSA 1% -, différentes quantités de billes nues sont ajoutées. L'expérience est faite en tampon phosphate-citrate 10mM pH 5.5.

s'obtiennent donc grâce à des liens bille-BSA-bille.

Cette observation concorde également avec les figures 4.1 et 4.3 obtenues précédemment. L'agrégation a uniquement lieu dans le cas où des BSA sont adsorbées et où des sites restent disponibles pour qu'elles se lient à une deuxième particule. Aux faibles concentrations - peu de BSA adsorbées - et aux fortes concentrations en BSA - billes saturées - ce phénomène n'est pas possible.

La BSA s'adsorbe donc suffisamment bien sur les particules pour maintenir les particules agrégées. Mais le nombre de BSA nécessaires à la formation d'un lien n'est pas encore connu, ceci fait l'objet du paragraphe suivant.

### Nombre de BSA dans un lien

Dans le cas de l'adsorption spécifique, étudiée dans la 3, une unique protéine cible suffit à former un lien entre deux billes. Ceci est particulièrement bien vérifié pour la BSA-biotine, dont le rendement a été estimé à 70%. Si *a contrario* le lien protéine-bille est trop faible, plusieurs protéines seraient nécessaires pour ponter deux billes entre elles, la seconde adsorption n'étant pas assez forte pour maintenir les deux billes au contact.

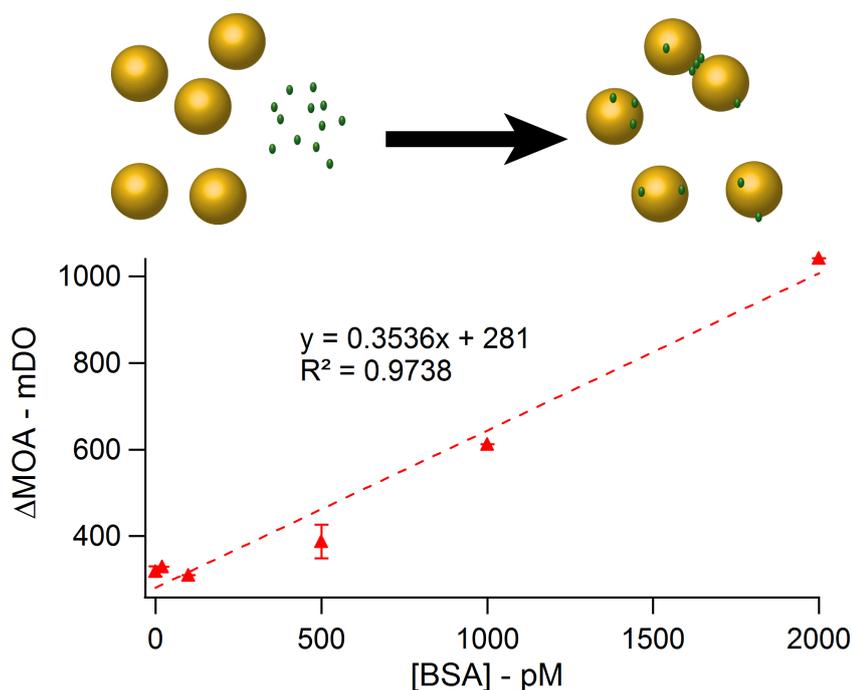
Pour savoir dans lequel de ces régimes le système BSA - silice se situe, de façon analogue au dosage immunologique de la partie 2, la BSA a été dosée par des particules de silice nues. Le schéma 4.6 illustre cette expérience.

Le signal obtenu est, comme attendu, proportionnel à la quantité de BSA. Cependant la pente  $y$  est faible : les 0.35mDO/pM sont à comparer aux 13.5mDO/pM de BSA-biotine pour le lien streptavidine-biotine.

Le facteur 50 ne peut cette fois-ci pas provenir d'un temps d'incubation trop faible. Le rendement étant très faible, il peut s'expliquer de deux façons :

- le rendement de deuxième adsorption est très faible, seule une petite partie des BSA adsorbées sont dans une configuration favorable à une deuxième adsorption ; la majorité est incapable de ponter des billes.
- un lien ne peut être maintenu que si plusieurs BSA sont localisées entre deux billes. L'énergie de deuxième adsorption d'une BSA est trop faible, mais l'énergie cumulée de plusieurs BSA est, elle, suffisante.

Aux fortes concentrations, en milieu peu salé, la BSA protège donc les particules de silice de l'agrégation. L'agrégation et la protection des particules de silice par la BSA est donc un phénomène qui se corrèle aux mesures d'adsorption précédemment effectuées. La position du



**FIGURE 4.6** – Dosage de la BSA par des billes de silice magnétiques à 34pM, en tampon phosphate-citrate 10mM, pH 5.5. L'incubation a lieu durant  $\sim 2min$ .

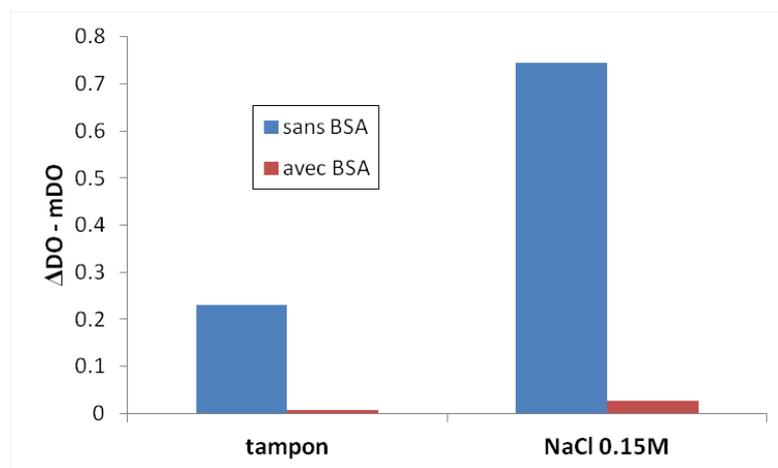
maximum et l'effet de l'électrostatique s'expliquent par un modèle où plusieurs BSA, adsorbées à une première bille, s'adsorbent également sur une deuxième bille et les maintiennent ainsi agrégées.

De nombreuses applications ayant lieu en milieu salé, il serait intéressant de déterminer s'il en va de même pour une concentration en NaCl portée à 150mM, puis en plasma : cette question fait l'objet de la partie suivante.

## 4.2 Application à la stabilisation

La plupart des applications nécessitent une bonne stabilisation des particules. Pour éviter que les surfaces ne collent, il faut y rajouter un composé qui sature les interfaces, et qui ne sera pas à même de créer des ponts avec les particules voisines. Les polymères sont fréquemment greffés à la surface des particules, il est aussi possible d'ajouter des surfactants en solution.

Ces solutions ont néanmoins montré leurs limites, une meilleure stabilisation permettrait en effet de diminuer le nombre d'agrégats non spécifiques formés, et ainsi d'améliorer la détection. La BSA se liant fortement à la surface en silice, elle peut être un bon candidat pour protéger de l'agrégation en présence de sel et en présence de plasma sanguin.



**FIGURE 4.7** – Mesures d’agrégation  $\Delta DO$  pour des particules de silice magnétique à 34pM, en tampon MES pH 5.5 + NaCl 10mM. La première est une mesure de référence dans le tampon, pour la deuxième 150mM de NaCl sont ajoutés. Pour les mesures avec BSA, les billes ont été préalablement incubées avec de la BSA 0.1%, diminuant grandement l’agrégation.

### 4.2.1 En milieu salin

#### A pH 5.5

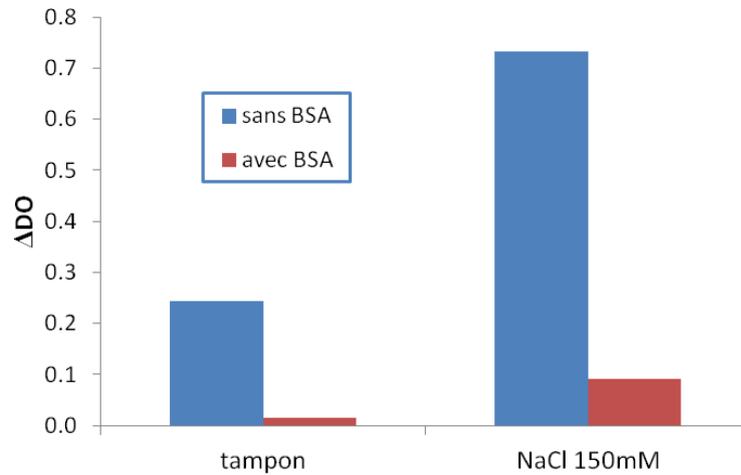
Du fait des forces de van der Waals, comme détaillé dans la partie 1, de nombreuses particules ne sont pas stables en conditions salines. Proche des conditions physiologiques, pour  $[NaCl] = 150mM$ , les colloïdes sont amenés à se rapprocher des fortement, la longueur de Debye étant de 0.8nm, et les particules s’agrègent - comme le montre la figure 4.7.

Cette figure montre également l’effet de la BSA, à pH 5.5, sur l’agrégation induite par le sel. Tout d’abord, les particules seules montrent une légère agrégation due au champ magnétique en l’absence de sel -  $\Delta DO = 200mDO$ . Comme attendu, cette valeur augmente de façon dramatique si les billes sont en présence de NaCl 150mM.

Si par contre les billes sont préalablement incubées avec de la BSA, sans ajout de sel elles sont parfaitement stables (ce résultat a déjà été observé sur les figures 4.1 et 4.3) et avec sel l’agrégation est grandement diminuée.

#### A pH 7.4

Les résultats obtenus à pH 5.5 sont prometteurs, mais la protection sera moins aisée à pH 7.4 où l’adsorption de la BSA y est beaucoup plus faible. Il est important ici de s’attarder sur les conditions d’adsorption de la BSA à pH 7.4.



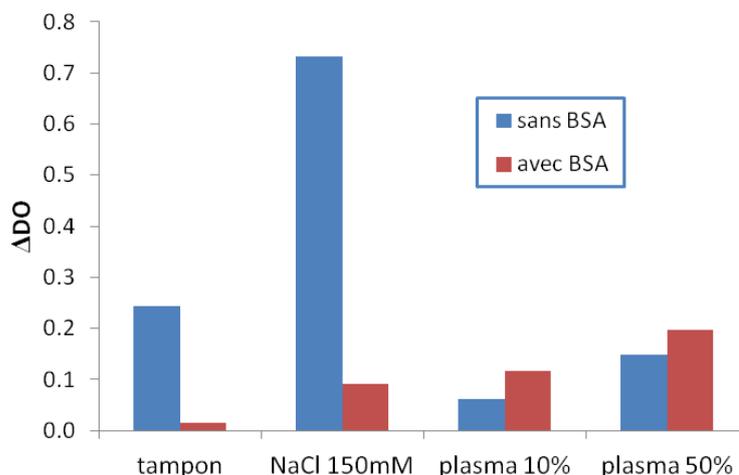
**FIGURE 4.8** – Effet de la BSA sur l’agrégation en tampon phosphate pH 7.4. Les mesures d’agrégation des particules de silice à 34pM ont été faites : sans sel ni plasma, avec 150mM de NaCl, puis avec 10% et 50% de plasma.

Dans la partie 3, il a été montré qu’à pH 7.4 + NaCl 10mM l’adsorption de la BSA-FITC est extrêmement faible, seul un petit nombre de protéines sont adsorbées sur une bille. Cependant le ratio entre le nombre de BSA initialement en solution et le nombre de particules ne variait que entre 180 et 5,800. Dans les conditions actuelles, avec 0.02% de particules magnétiques et 0.1% de BSA en solution, ce ratio est porté à 44,000. Avec un tel ratio il est impossible de mesurer la fraction de BSA adsorbée - proche de 0 - mais quelques centaines de BSA peuvent être adsorbées sur chaque bille. Cette hypothèse est renforcée par l’effet observé de la concentration en BSA, qui est ici très élevée.

Les tests réalisés dans ces conditions se trouvent en figure 4.8. Pour tous les échantillons, *avec BSA* et *sans BSA*, aucune incubation n’est réalisée (dans les faits environ deux minutes s’écoulent entre la mise en contact des produits et le début d’application du champ magnétique).

Tout d’abord, en mettant uniquement les billes seules dans le tampon phosphate, une agrégation intermédiaire est observée (250mDO). Cette valeur augmente considérablement si 150mM de NaCl sont rajoutés.

Pour les mesures avec de la BSA 0.1%, les billes ont été mises en premières dans l’éppendorf, suivies de la BSA puis du sel. Les billes ont donc eu quelques secondes d’incubation avec l’agent stabilisant. Dans ce cas, les billes dans le milieu sont très stables (signal  $\sim 0$ ), et l’agrégation est faible en présence de sel.



**FIGURE 4.9** – Effet de la BSA sur l’agrégation en tampon phosphate pH 7.4. Les mesures d’agrégation des particules de silice à 34pM ont été faites : sans sel ni plasma, avec 150mM de NaCl, puis avec 10% et 50% de plasma.

### 4.2.2 En milieu plasmatique

#### Protection avec la BSA

Si par contre du plasma est ajouté dans le milieu (cf figure 4.9), à 10% ou 50%, avec ou sans BSA les billes ne sont pas stables : une agrégation intermédiaire est observée. Ces mesures ont également été réalisées avec des billes incubées pendant 4h avec de la BSA ; les résultats sont similaires.

Dans le chapitre précédent, il a été montré que les protéines adsorbées pouvaient être désorbées par des protéines concurrentes. Il est donc probable que les BSA soient désorbées par des molécules concurrentes - autres protéines, lipides... -, molécules qui ont des propriétés d’agrégation plus importantes. Dans ce cas la BSA ne peut donc pas protéger les particules de silice de l’adsorption liée au plasma.

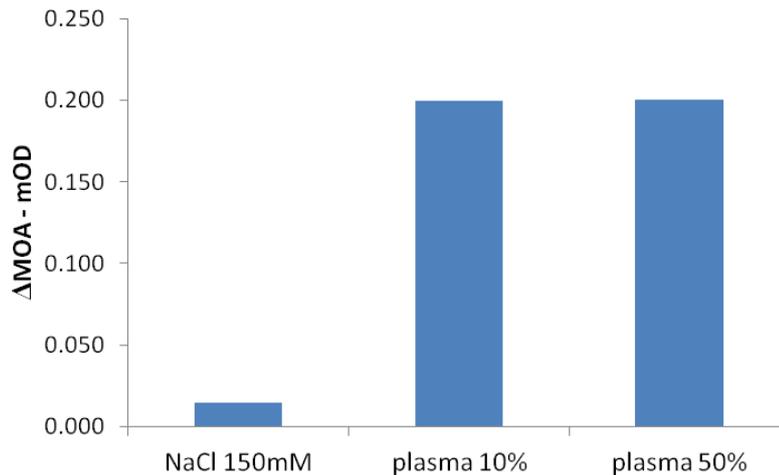
#### Choix de la protéine en fonction du pI

Pour protéger les particules de l’agrégation avec des protéines, il faut former les liens bille - protéine les plus forts possibles, avec le plus de protéines possibles à la surface. Or l’adsorption est maximale quand le pH est proche du point isoélectrique de la protéine : pour travailler à pH 7,4 il faut donc des protéines dont le pI est proche de cette valeur, et qui ne seraient pas déplacées par d’autres éléments du plasma.

Plusieurs protéines ont ainsi été retenues, elles sont indiquées dans le tableau 4.1. Cependant,

Protéine	pI	MW - kDa
Albumine	4.9	66
Myoglobine	6.5	18
Hémoglobine	6.9	68

**TABLE 4.1** – Sélection des protéines en fonction de leur point isoélectrique.



**FIGURE 4.10** – Effet des caséines sur la stabilisation des particules. Les caséines à 0.1%, incubées avec les billes à 34pM pendant 4h, protègent de l'agrégation avec le sel mais pas du plasma.

après les avoir testées, aucune n'a montré de résultat satisfaisant, et ce même en l'absence de sel et de plasma.

### Les caséines

Les caséines sont les protéines principales du lait. Il s'agit d'un groupe de protéines, dont les plus importantes sont les  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\kappa$ . Pour plusieurs critères elles n'apparaissent pas comme les candidates idéales : leur point isoélectrique est de  $\sim 4,6$ , et elles ne possèdent pas de structure secondaire. Malgré cela les caséines sont connues pour être de bonnes protéines stabilisantes, elles stabilisent notamment les globules gras du sang.

Des tests ont donc été faits avec les caséines, pour déterminer si elles sont capables de protéger les particules de l'agrégation : les résultats sont en figure 4.10. Malheureusement les performances sont les mêmes en présence de NaCl et en présence de plasma que celles obtenues avec la BSA.

### 4.3 Conclusion

Suivant sa concentration et le pH, la BSA peut agréger ou stabiliser les particules de silice. Aux faibles concentrations, la formation des agrégats dans le cas du système BSA - bille de silice est due à des liaisons billes - BSA - billes. Une BSA n'est cependant pas suffisante pour former un lien entre deux billes, plusieurs protéines sont nécessaires. Et de même que pour l'adsorption, ce phénomène est hautement sensible aux conditions électrostatiques : l'agrégation disparaît aux pH élevés.

A pH 5.5, alors que dans le chapitre 1 il a été montré qu'en milieu salin les particules de silice sont agrégées à cause des interactions de van der Waals, ces dernières peuvent être écartées par la BSA. L'échantillon de particules est donc stable dans ces conditions.

Cette protéine a donc le même effet que les polymères et les surfactants, bien que ces molécules ne soient pas comparables : les parties hydrophiles et hydrophobes sont clairement séparées pour les surfactants et les polymères peuvent adopter un grand nombre de configurations à la surface. *A contrario*, les différents domaines des protéines ne sont pas aussi clairement séparés, et la protéine a une structure dans l'espace qu'elle tend à conserver.

A pH 7,4, la BSA est cependant moins efficace du fait de sa plus faible affinité pour la surface. Elle peut diminuer l'agrégation due au sel, mais pas dans des proportions aussi importantes qu'à pH 5.5. De plus, elle ne protège pas du tout de l'agrégation induite par le plasma, ni d'ailleurs les autres protéines testées et dont le point isoélectrique en faisait de meilleures candidates.

Il serait alors intéressant de déterminer les éléments du plasma responsables de l'agrégation. D'un point de vue pratique, en retirant séparément les composés du plasma, on pourrait déterminer celui qui est responsable de l'agrégation ou responsable de la désorption de la BSA. Avec un simple pré-traitement du plasma un système stable pourrait alors être obtenu.

# Conclusion

Une méthode de caractérisation de l'agrégation de particules magnétiques a tout d'abord été mise au point en partenariat avec Bertin Technologies. Basée sur l'orientation d'agrégats anisotropes, cette méthode, très simple à mettre en oeuvre, fournit un signal directement proportionnel aux agrégats formés. Il est ainsi possible de détecter une concentration en doublets de particules magnétiques de quelques pM.

Cette méthode peut alors être utilisée dans la détection de protéines cibles : la quantité d'agrégats formés durant une mesure indique la quantité de cibles initialement présentes en solution. Cette technique a été validée sur le système modèle BSA-biotine - streptavidine, puis sur un système réel en collaboration avec Horiba Medical : la protéine C-réactive. Cette nouvelle méthode a permis de diviser la limite de détection par deux.

La limite de ces tests d'immuno-agglutination est la formation durant la mesure d'agrégats non-spécifiques dus entre autres à l'adsorption de protéines sur les particules. Cette étude de l'adsorption a donc également été réalisée.

Un protocole de mesure d'adsorption de protéines basé sur fluorescence a tout d'abord été mis au point, l'ensemble des vérifications effectuées permettant de s'assurer de la fiabilité des résultats obtenus. Les mesures effectuées ont alors montré que :

- la quantité maximale de protéines pouvant s'adsorber dans une monocouche dépend du pH, de la force ionique et de la concentration initiale en protéines
- le phénomène est irréversible vis-à-vis de la dilution
- les protéines peuvent se désorber si les conditions électrostatiques sont modifiées, ou si une protéine compétitrice est ajoutée

Ces observations nous ont orienté vers un modèle d'adsorption multi-sites, par analogie aux anticorps ou à l'adsorption des polymères. En combinant ce modèle à l'existence d'interactions latérales entre les protéines, toutes les observations ont pu être rationalisées. Il serait alors intéressant de tester ces hypothèses sur d'autres protéines avec d'autres surfaces, puis de comparer ces résultats à des simulations numériques. Le modèle pourrait également être

## Conclusion

---

amélioré, permettant à terme d'identifier les paramètres pertinents puis d'ajuster les données expérimentales.

Nous nous sommes finalement intéressés à l'agrégation de particules de silice par la BSA. Dans les conditions où les liens d'adsorption sont forts, les protéines comme la BSA sont capables de créer des liens entre les particules. Aux fortes concentrations, elles sont même capables de saturer les interfaces et ainsi de protéger les surfaces de l'agrégation induite par les rencontres brownienne ou magnétique.

Les protéines sont capables de protéger d'une force ionique élevée, mais elles ne sont cependant pas capable de protéger du plasma à pH physiologique. Afin de maximiser les chances de protection, d'autres protéines ont été testées, avec des points isoélectriques plus proches du pH sanguin. Mais dans tous les cas aucune protection efficace n'a pu être obtenue.

Il est à retenir que la mesure de l'agrégation induite par les protéine fournit de nouvelles informations sur les protéines, comme le fait que les protéines peuvent éventuellement s'adsorber avec leurs deux extrémités. Une quantification plus fine permettrait donc de quantifier les énergies d'interactions entre les différents côtés des protéines et les surfaces.

# Appendices



## Annexe A

# Energie d'interaction protéine - surface

Les expressions des énergies d'interactions électrostatiques et de van der Waals ont été inscrites dans la partie 1. Dans le cas de l'adsorption de protéines, ces expressions ne sont plus valables car les grandeurs en jeu ne sont pas grandes devant la longueur de Debye. Des expressions plus complexes ont donc été explicitées [Oberholzer et al., 1997].

L'énergie d'interaction électrostatique entre une protéine de rayon  $a$  et une surface, séparées par une distance  $d$ , est :

$$U_{ps}^{el}(d) = B_{ps} \exp[-\kappa d]$$

Dans cette expression,  $\kappa$  est l'inverse de la longueur de Debye et  $B_{ps}$  est un coefficient défini par :

$$B_{ps} = \left( \frac{4\pi k T \epsilon \epsilon_0 a}{e^2} \right) \left( \frac{\psi_s + 4\gamma \Omega \kappa a}{1 + \Omega \kappa a} \right) 4\gamma$$

$$\text{avec } \gamma = \tanh\left(\frac{\psi_s}{4}\right)$$

$$\text{et } \Omega = \frac{\psi_p - 4\gamma}{2\gamma^3}$$

$\psi_s$  est le potentiel de surface de la surface,  $\psi_p$  celui de la protéine.

En notant  $h = d/a$ , l'énergie d'interaction de van der Waals est définie par

$$U_{ps}^{vdw}(h) = -\frac{A_{ps}}{6kT} \left[ \frac{1}{h} + \frac{1}{h+2} + \ln\left(\frac{h}{h+2}\right) \right]$$

où  $A$ , constante de Hamaker, peut être ici prise égale à  $10^{-20}$  J.



## Annexe B

# Mesures d'adsorption de protéines

### B.1 Adsorption sur surface plane

De nombreuses techniques étant disponibles pour mesurer l'adsorption de protéines sur des surfaces planes [Nakanishi et al., 2001; Rabe et al., 2011], nous ne présentons donc ici que les principales utilisées.

**Titration calorimétrique isotherme** Au fil des ans et grâce à l'amélioration de la sensibilité des appareils, l'ITC est devenue une technique de plus en plus utilisée pour la mesure de l'association de protéines sur des surfaces [Becker et al., 2011; Deshapriya and Kumar, 2013; Devineau et al., 2013]. Expérimentalement deux cellules sont utilisées : une de référence et une qui ne contient initialement qu'un des réactifs. Un circuit électronique calcule en permanence l'énergie à fournir pour que la température soit identique dans les deux cellules.

Quand le deuxième réactif est ajouté au premier, si une réaction d'association se fait, celle-ci sera endothermique ou exothermique. Dans les deux cas la température de la cellule est modifiée, nécessitant l'apport d'énergie pour que la température de la cellule rejoigne celle de la référence. Cette mesure d'énergie permet de déterminer plusieurs grandeurs thermodynamiques comme l'enthalpie de la réaction et la constante d'affinité.

**La résonance plasmonique** La surface à analyser est illuminée à un angle correspondant à la réflexion totale interne : la totalité de la lumière incidente est réfléchie. Dans cette configuration une onde évanescente, perpendiculaire à la surface, est générée. Deux techniques sont ensuite possibles : la *SPR* et la *TIRF*.

Pour la première, la *surface plasmon resonance*, l'intensité de l'onde réfléchie est mesurée.

Si les propriétés de la surface d'étude sont modifiées, via l'adsorption de protéines, l'intensité de cette onde diminue. Cette technique permet donc de suivre en temps réel l'adsorption des protéines sur les surfaces [Karlsson et al., 2005; Glasmästar et al., 2002] ; elle est notamment utilisée dans le *Biacore*.

La deuxième possibilité requiert l'adsorption de composés fluorescents, soit par un marqueur tel la FITC, soit en utilisant les tryptophanes contenus dans de nombreuses protéines. L'onde évanescente générée excite des fluorophores localisés à la surface, l'intensité mesurée à la longueur d'onde d'émission permet de remonter à la quantité de protéines adsorbées [Daly et al., 2003].

**Diffusion de rayons X aux petits angles SAXS** Technique plus délicate à mettre en oeuvre, elle requiert l'usage de rayons X de longueur d'onde typique de 0.1nm. Les profils de diffusion fournissent des données à la fois sur la quantité de protéines adsorbées et sur des éventuels changements de conformation [Henzler et al., 2011].

De nombreuses autres techniques sont utilisées mais ne seront pas présentées ici. On pensera notamment à la spectroscopie de corrélation de fluorescence FCS [Rocker et al., 2009], la microbalance à cristal de quartz QCM [Glasmästar et al., 2002] ou encore la microscopie de fluorescence [Anikin et al., 2005].

## B.2 Adsorption sur colloïdes

### Dosage du surnageant

Une première méthode utilisée est la mesure d'absorbance [MacRitchie, 1972]. Une solution de protéines est laissée plusieurs heures à incuber avec différentes quantités de particules. Après centrifugation, l'absorbance du surnageant (à 278nm dans le cas de l'albumine) indique la quantité de protéines adsorbée sur les particules - sous réserve qu'aucune désorption significative n'ait eu lieu durant la centrifugation.

Hormis la mesure d'absorbance, la même mesure est réalisable en utilisant la fluorescence de l'albumine [Docoslis et al., 2001].

### Dosage des billes

Outre le dosage du surnageant, il est possible de doser directement les protéines adsorbées sur les billes. Ce dosage peut se faire par une mesure de fluorescence si les particules ne

perturbent pas la mesure, sinon les techniques suivantes sont couramment utilisées.

**Potentiel  $\zeta$**  A un pH et une force ionique donnée, protéines et particules ont le plus souvent des potentiels  $\zeta$  différents. Si des protéines s'adsorbent sur les particules, elles en modifieront donc le potentiel  $\zeta$  [Baier et al., 2011; Meder et al., 2012]. Mais cette méthode a d'importants désavantages :

- la mesure n'est réalisable qu'aux faibles forces ioniques, sinon le potentiel  $\zeta$  est trop faible et une variation ne serait pas visible. Pour observer l'adsorption à une force ionique physiologique, il faudra donc changer de tampon avant la mesure, avec le risque que ceci entraîne une désorption des protéines.
- elle permet de déterminer pour quelle concentration de protéine en solution l'adsorption commence et est complète. Elle ne permet nullement de déterminer quelle quantité de protéine s'est fixée à l'interface.

**Mesure de taille** La fixation d'une protéine sur une particule entraîne une augmentation de la taille de cette dernière. Une mesure de la taille de la particule permet donc d'obtenir des informations sur l'adsorption [Rocker et al., 2009]. La méthode classiquement utilisée est la DLS, qui mesure le rayon hydrodynamique de la particule.

Cette mesure n'apporte guère plus d'information que la précédente, car là encore la quantité de protéine adsorbée sur la particule est inconnue. D'autres désavantages s'ajoutent : cette mesure n'est possible que si la taille de la protéine est significative devant celle de la particule (impossible pour des particules de plus de 100nm) ; et une agrégation des particules fausserait la mesure.



## Annexe C

# Détection de protéines

**Application des cycles de champ** L'échantillon est tout d'abord mis au repos une minute afin de le laisser s'homogénéiser et que la première capture se fasse. Puis 5 aimantations à 20mT sont appliquées - de 10 à 160s - pour une aimantation totale de 5 minutes. Chaque aimantation est suivie d'une relaxation de 20s. Durant l'aimantation, les chaînes se forment, les liens spécifiques se créent entre les billes. A la fin, quand le champ est coupé, une relaxation finale de 100s permet à une partie des agrégats non-spécifiques de se dissocier. La durée totale du test est de 10minutes.

**Dosage de la BSA-biotine** Les particules magnétiques sont achetées chez Ademtech, Pessac, France. Le principe de la MOA a été validé sur des Bio-Adembeads Streptavidin (200nm) ; afin d'obtenir une faible quantité d'agrégats les billes ont été centrifugées une minute dans un Qualitron DW-41. Les billes ont ensuite été diluées en PBS + PF127 0,3% ; la densité optique initiale indique une concentration en billes autour de 50pM.

Les mêmes billes sont utilisées pour le dosage de la BSA-biotine. Les billes sont à 0,02% w/v - approximativement 45pM. Billes et protéines cibles sont diluées en PBS X + PF 127 0,3%. PBS, PF 127 et BSA-biotine sont achetés chez Sigma. Pour les échantillons contenant 1000pM et 2000pM de billes le trajet optique était de 4mm au lieu de 1cm et les DO mesurées ont été multipliées par 2,5 pour obtenir l'équivalent sur 1cm.

**Dosage de la CRP** Le diamètre moyen des particules utilisées pour doser la CRP est 190nm, mesuré grâce à un appareil de diffusion dynamique de la lumière (Zetasizer Nano de Malvern). Des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine C-réactive - CRP - sont fournis par Interchim et greffés sur les billes par Horiba Medical. La CRP est fournie par Euromedex : 7,5µLde

## Chapitre C. Détection de protéines

---

billes stockées à 0,8% w/w, 7,5 $\mu$ L de CRP concentrée en saponine et 135 $\mu$ L de tampon. La concentration finale de billes est 0,04% w/w. Après une dilution 75x en saponine la concentration en CRP est de 1,1nM and la concentration finale en CRP dans la cuve est de 56pM ; Afin d'obtenir une courbe de dosage pour estimer la limite de détection de la CRP, 11 blancs et 2 points à chaque concentration ont été réalisés.

## Annexe D

# Protocole d'adsorption

La quantification de l'adsorption de BSA-FITC sur les particules de silice se fait par dosage en retour. Il est possible de faire varier la concentration en billes ou celle en BSA-FITC, nous prenons ici le cas de la concentration en BSA-FITC fixée à 1.5  $\mu\text{mol/L}$ .

**Préparation du tampon** Le tampon utilisé est un tampon MES 10mM, de pH et de concentration en NaCl variable.

- Dissoudre 195.2 mg de MES (MW=195.2 g/mol) dans 50mL d'eau.
- Ajuster le pH avec NaOH 1M.

**Préparation de la solution de billes** La solution mère de particules de silice, de Sigma-Aldrich, est à 5% en masse ( $\sim 25\text{nM}$ ). 200 $\mu\text{L}$  sont centrifugés 10min dans un eppendorf de 1.5mL ; à chaque lavage 190  $\mu\text{L}$  de surnageant sont remplacés par 190  $\mu\text{L}$  de tampon. Après 5 lavages le pH cible est atteint.

Par dilution on obtient des solutions à 1.67% puis 0.21%.

**Préparation de la BSA-FITC** 10mg de BSA-FITC sont dispersés dans 1mL de tampon. Le pH est ajusté avec HCl ou NaOH 1M.

A partir de la solution mère en BSA-FITC, une solution à 3 $\mu\text{M}$  est obtenue en diluant 10  $\mu\text{L}$  dans 490 $\mu\text{L}$  de tampon. Les incubations ont lieu dans des eppendorfs Protein LoBind (VWR), permettant une faible perte de la BSA-FITC sur les parois. Pour chaque concentration en billes 10 $\mu\text{L}$  de BSA-FITC sont mélangés à 10 $\mu\text{L}$  de billes.

**Mesure d'adsorption** Ci-dessous un exemple permettant d'obtenir 20 $\mu\text{L}$  par échantillon.

## Chapitre D. Protocole d'adsorption

---

[Billes]	BSA-FITC	Billes 5%	Billes 1.67%	Billes 0.21%	tampon
8.2nM	10 $\mu$ L	6.7 $\mu$ L			3.3 $\mu$ L
4.1nM	10 $\mu$ L		10 $\mu$ L		
2.1nM	10 $\mu$ L		5 $\mu$ L		5 $\mu$ L
1.0nM	10 $\mu$ L		2.5 $\mu$ L		7.5 $\mu$ L
0.52nM	10 $\mu$ L			10 $\mu$ L	
0.26nM	10 $\mu$ L			5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
0.13nM	10 $\mu$ L			2.5 $\mu$ L	7.5 $\mu$ L
0nM	100 $\mu$ L				100 $\mu$ L

L'incubation se fait sur un agitateur rotatif pendant une journée, les échantillons sont protégés de la lumière par du papier aluminium.

Le lendemain, les échantillons avec billes sont centrifugés 5min. Dans la plaque 96 puits, 17 $\mu$ L du surnageant de l'échantillon à doser sont ajoutés à 83 $\mu$ L de Tween 1% dans une plaque 96 puits. L'intensité de fluorescence est ainsi mesurée pour :

- 2 blancs (tampon)
- 4 référence (0nM de BSA-FITC)
- les surnageants

Pour chaque concentration en billes, on déduit la fraction de BSA-FITC adsorbée sur les billes :

$$Fads = 1 - \frac{Surnageant - Blanc}{Référence - Blanc}$$

**Dosage de la fluorescence sur les billes** Il est également possible de mesurer la fluorescence directement sur les billes, il faut pour cela suffisamment les laver du surnageant. Pour cela aux 3 $\mu$ L restants dans l'ependorf après centrifugation et prélèvement des 17 $\mu$ L pour la mesure du surnageant, 17 $\mu$ L de tampon sont rajoutés. Cette opération est réalisée de 1 à 3 fois en fonction de la quantité de BSA restant dans le surnageant. Comme précédemment 17 $\mu$ L de l'échantillon contenant les billes sont ajoutés à 83 $\mu$ L de Tween 1%. La fraction de BSA-FITC adsorbée sur les billes est donc :

$$Fads = \frac{Billes - Blanc}{Référence - Blanc}$$

# Bibliographie

- Alberts, B. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Garland sc edition.
- Andrade, J. D. and Hlady, V. (1986). Protein adsorption and materials biocompatibility : A tutorial review and suggested hypotheses. *Advances in Polymer Science*, 79 :1–63.
- Anikin, K., Röcker, C., Wittmann, A., Wiedenmann, J., Ballauff, M., and Nienhaus, G. U. (2005). Polyelectrolyte-Mediated Protein Adsorption : Fluorescent Protein Binding to Individual Polyelectrolyte Nanospheres. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(12) :5418–5420.
- Arai, T. and Norde, W. (1990). The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces 1. Adsorption from single protein solutions. *Colloids and Surfaces*, 51(0) :1–15.
- Arvizo, R. R., Bhattacharyya, S., Kudgus, R. A., Giri, K., Bhattacharya, R., and Mukherjee, P. (2012). Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles : past, present and future. *Chem. Soc. Rev.*, 41(7) :2943–2970.
- Baier, G., Costa, C., Zeller, A., Baumann, D., Sayer, C., Araujo, P. H., Mailander, V., Musyanovych, A., and Landfester, K. (2011). BSA adsorption on differently charged polystyrene nanoparticles using isothermal titration calorimetry and the influence on cellular uptake. *Macromol Biosci*, 11 :628–638.
- Baldwin, R. L. (1996). How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys. J.*, 71 :2056–2063.
- Baudry, J., Rouzeau, C., Goubault, C., Robic, C., Cohen-Tannoudji, L., Koenig, A., Bertrand, E., and Bibette, J. (2006). Acceleration of the recognition rate between grafted ligands and receptors with magnetic forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103 :16076–16078.
- Becker, A. L., Welsch, N., Schneider, C., and Ballauff, M. (2011). Adsorption of RNase A on Cationic Polyelectrolyte Brushes : A Study by Isothermal Titration Calorimetry. *Biomacromolecules*, 12(11) :3936–3944.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Bharti, B., Meissner, J., and Findenegg, G. H. (2011). Aggregation of Silica Nanoparticles Directed by Adsorption of Lysozyme. *Langmuir*, 27(16) :9823–9833.
- Borkovec, M. and Papastavrou, G. (2008). Interactions between solid surfaces with adsorbed polyelectrolytes of opposite charge. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13(6) :429–437.
- Bruls, D. M., Evers, T. H., Kahlman, J. A. H., van Lankvelt, P. J. W., Ovsyanko, M., Pelssers, E. G. M., Schleipen, J. J. H. B., de Theije, F. K., Verschuren, C. A., van der Wijk, T., van Zon, J. B. A., Dittmer, W. U., Immink, A. H. J., Nieuwenhuis, J. H., and Prins, M. W. J. (2009). Rapid integrated biosensor for multiplexed immunoassays based on actuated magnetic nanoparticles. *Lab Chip*, 9(24) :3504–3510.
- Burg, T. P., Godin, M., Knudsen, S. M., Shen, W., Carlson, G., Foster, J. S., Babcock, K., and Manalis, S. R. (2007). Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature*, 446(7139) :1066–9.
- Cabane, B. and Hénon, S. (2003). *Liquides : solutions, dispersions, émulsions, gels*. Belin edition.
- Capriotti, A., Caracciolo, G., Cavaliere, C., Crescenzi, C., Pozzi, D., and Laganà, A. (2011). Shotgun proteomic analytical approach for studying proteins adsorbed onto liposome surface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(4) :1195–1202.
- Carrasco, B. and de la Torre, J. G. (1999). Hydrodynamic Properties of Rigid Particles : Comparison of Different Modeling and Computational Procedures. *Biophysical Journal*, 76(6) :3044–3057.
- Clyne, B. and Olshaker, J. S. (1999). The C-reactive protein. *Journal of Emergency Medicine*, 17(6) :1019–1025.
- Couvreur, P. and Vauthier, C. (2006). Nanotechnology : intelligent design to treat complex disease. *Pharmaceutical research*, 23(7) :1417–50.
- Czeslik, C. (2004). Factors ruling protein adsorption. *Zeitschrift für physikalische Chemie*, 218(7) :771–801.
- Daly, S. M., Przybycien, T. M., and Tilton, R. D. (2003). Coverage-Dependent Orientation of Lysozyme Adsorbed on Silica. *Langmuir*, 19(9) :3848–3857.
- de Gennes, P. and Pincus, P. (1970). Pair correlations in a ferromagnetic colloid. *Zeitschrift für Physik B Condensed Matter*, 11(3) :189–198.

- Deshapriya, I. K. and Kumar, C. V. (2013). Nanobio interfaces : charge control of enzyme/inorganic interfaces for advanced biocatalysis. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 29(46) :14001–16.
- Devineau, S., Zanotti, J.-M., Loupiac, C., Zargarian, L., Neiers, F., Pin, S., and Renault, J. P. (2013). Myoglobin on silica : a case study of the impact of adsorption on protein structure and dynamics. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 29(44) :13465–72.
- Docoslis, A., Rusinski, L. A., Giese, R. F., and van Oss, C. J. (2001). Kinetics and interaction constants of protein adsorption onto mineral microparticles - measurement of the constants at the onset of hysteresis. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 22(4) :267–283.
- Docoslis, A., Wu, W., Giese, R. F., and van Oss, C. J. (1999). Measurements of the kinetic constants of protein adsorption onto silica particles. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 13(2) :83–104.
- Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A., and Baker, N. A. (2004). PDB2PQR : an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic acids research*, 32(Web Server issue) :W665–7.
- Dreyfus, R., Lacoste, D., Bibette, J., and Baudry, J. (2009). Measuring colloidal forces with the magnetic chaining technique. *Eur Phys J E Soft Matter*, 28 :113–123.
- Eich, R. F., Li, T., Lemon, D. D., Doherty, D. H., Curry, S. R., Aitken, J. F., Mathews, A. J., Johnson, K. A., Smith, R. D., Phillips, G. N., and Olson, J. S. (1996). Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry*, 35(22) :6976–83.
- Fainerman, V. B., Lucassen-Reynders, E. H., and Miller, R. (2003). Description of the adsorption behaviour of proteins at water/fluid interfaces in the framework of a two-dimensional solution model. *Advances in colloid and interface science*, 106 :237–59.
- Fleer, G., Cohen, S. M. A., Cosgrove, T., Scheutjens, J., and Vincent, B. (1993). *Polymers at Interfaces*. Chapman and Hall.
- Giacomelli, C. E. and Norde, W. (2001). The Adsorption-Desorption Cycle. Reversibility of the BSA-Silica System. *Journal of Colloid and Interface Science*, 233(2) :234–240.
- Glasmästar, K., Larsson, C., Höök, F., and Kasemo, B. (2002). Protein adsorption on supported phospholipid bilayers. *Journal of colloid and interface science*, 246(1) :40–7.
- Görge, J. (2011). Immunodiagnostic par agglutination magnétique. *PhD thesis*.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Greer, R. M., Scruggs, B. A., May, R. A., and Chandler, B. D. (2009). Patterning High Surface Area Silica with Lysozyme : Adsorption Kinetics, Fluorescence Quenching, and Protein Readsorption Studies To Evaluate the Templated Surface. *Langmuir*, 25(12) :7161–7168.
- Gregory, J. (2009). Monitoring particle aggregation processes. *Advances in colloid and interface science*, 147-148 :109–23.
- Han, J., Silcock, P., McQuillan, A. J., and Bremer, P. (2009). Bovine serum albumin adsorption on N-methyl-d-glucamine modified colloidal silica. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 349(1-3) :207–213.
- Hansen, F. K. and Myrvold, R. (1995). The Kinetics of Albumin Adsorption to the Air/Water Interface Measured by Automatic Axisymmetric Drop Shape Analysis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 176(2) :408–417.
- Haynes, C. A. and Norde, W. (1994). Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 2(6) :517–566.
- Hecht, A., Kinnunen, P., McNaughton, B., and Kopelman, R. (2011). Label-acquired magnetorotation for biosensing : An asynchronous rotation assay. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 323(3-4) :272–278.
- Henzler, K., Haupt, B., Rosenfeldt, S., Harnau, L., Narayanan, T., and Ballauff, M. (2011). Interaction strength between proteins and polyelectrolyte brushes : a small angle X-ray scattering study. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13(39) :17599–17605.
- Hill, T. L. (1960). *An Introduction to Statistical Thermodynamics*.
- Ikeda, S. and Nishinari, K. (2000). Intermolecular forces in bovine serum albumin solutions exhibiting solidlike mechanical behaviors. *Biomacromolecules*, 1(4) :757–63.
- Imamura, K., Shimomura, M., Nagai, S., Akamatsu, M., and Nakanishi, K. (2008). Adsorption characteristics of various proteins to a titanium surface. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(3) :273–278.
- Israelachvili, J. N. (2011). *Intermolecular and Surface Forces - third edition*. Academic Press.
- Jennissen, H. P. (1976). Evidence for negative cooperativity in the adsorption of phosphorylase b on hydrophobic agaroses. *Biochemistry*, 15(26) :5683–5692.
- Jiang, X., Weise, S., Hafner, M., Rucker, C., Zhang, F., Parak, W. J., and Nienhaus, G. U. (2010). Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding. *J R Soc Interface*, 7 Suppl 1 :S5–S13.

- Jin, X., Wang, N. H. L., Tarjus, G., and Talbot, J. (1993). Irreversible adsorption on nonuniform surfaces : the random site model. *The Journal of Physical Chemistry*, 97(17) :4256–4258.
- Karlsson, M., Ekeröth, J., Elwing, H., and Carlsson, U. (2005). Reduction of irreversible protein adsorption on solid surfaces by protein engineering for increased stability. *The Journal of biological chemistry*, 280(27) :25558–64.
- Karp, G. (2004). *Cell and Molecular Biology, Concepts and Experiments - Fourth edition*. Wiley edition.
- Kaufman, E. N. and Jain, R. K. (1992). Effect of bivalent interaction upon apparent antibody affinity : experimental confirmation of theory using fluorescence photobleaching and implications for antibody binding assays. *Cancer research*, 52(15) :4157–67.
- Kim, J. and Somorjai, G. A. (2003). Molecular packing of lysozyme, fibrinogen, and bovine serum albumin on hydrophilic and hydrophobic surfaces studied by infrared-visible sum frequency generation and fluorescence microscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 125(10) :3150–8.
- Koenig, A. (2004). Etude de la dynamique d un polymere semi flexible à l aide de colloides magnetiques Exemple de l ADN. *PhD thesis*.
- Kondo, A. and Higashitani, K. (1992). Adsorption of model proteins with wide variation in molecular properties on colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 150(2) :344–351.
- Kondo, A., Oku, S., and Higashitani, K. (1991). Structural changes in protein molecules adsorbed on ultrafine silica particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 143(1) :214–221.
- Kowalczyńska, H. M., Nowak-Wyrzykowska, M., Szczepankiewicz, A. A., Dobkowski, J., Dydka, M., Kamiński, J., and Kolos, R. (2011). Albumin adsorption on unmodified and sulfonated polystyrene surfaces, in relation to cell-substratum adhesion. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 84(2) :536–544.
- Kurrat, R., Ramsden, J. J., and Prenosil, J. E. (1994). Kinetic model for serum albumin adsorption : experimental verification. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 90(4) :587.
- Kwok, K. C., Yeung, K. M., and Cheung, N. H. (2007). Adsorption Kinetics of Bovine Serum Albumin on Fused Silica : Population Heterogeneities Revealed by Single-Molecule Fluorescence Microscopy. *Langmuir*, 23(4) :1948–1952.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Langdon, B. B., Kastantin, M., and Schwartz, D. K. (2012). Apparent Activation Energies Associated with Protein Dynamics on Hydrophobic and Hydrophilic Surfaces. *Biophysical Journal*, 102(11) :2625–2633.
- Langmuir, I. (1917). The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 39(9) :1848–1906.
- Larsericdotter, H., Oscarsson, S., and Buijs, J. (2005). Structure, stability, and orientation of BSA adsorbed to silica. *Journal of Colloid and Interface Science*, 289(1) :26–35.
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., and Muller, R. N. (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles : Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews*, 108(6) :2064–2110.
- Lin, M. Y., Lindsay, H. M., Weitz, D. A., Ball, R. C., Klein, R., and Meakin, P. (1989). Universality in colloid aggregation. *Nature*, 339(6223) :360–362.
- Loe, M. J. and Edwards, W. D. (2004). A light-hearted look at a lion-hearted organ (or, a perspective from three standard deviations beyond the norm) Part 1 (of two parts). *Cardiovascular Pathology*, 13(5) :282–292.
- Lu, J., Su, T., and Thomas, R. (1999). Structural Conformation of Bovine Serum Albumin Layers at the Air-Water Interface Studied by Neutron Reflection. *Journal of Colloid and Interface Science*, 213(2) :426–437.
- Luey, J.-K., McGuire, J., and Sproull, R. D. (1991). The effect of pH and NaCl concentration on adsorption of  $\beta$ -lactoglobulin at hydrophilic and hydrophobic silicon surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 143(2) :489–500.
- Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., and Dawson, K. A. (2008). Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105 :14265–14270.
- MacRitchie, F. (1972). The adsorption of proteins at the solid/liquid interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 38(2) :484–488.
- Majorek, K. A., Porebski, P. J., Dayal, A., Zimmerman, M. D., Jablonska, K., Stewart, A. J., Chruszcz, M., and Minor, W. (2012). Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*, 52(3-4) :174–182.
- Martin and Malmsten (1995). Ellipsometry studies of the effects of surface hydrophobicity on protein adsorption. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 3(5) :297–308.

- Martínez-Pedrero, F., Tirado-Miranda, M., Schmitt, A., Vereda, F., and Callejas-Fernández, J. (2007). Structure and stability of aggregates formed by electrical double-layered magnetic particles. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 306(1) :158–165.
- McClements, D. J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(5) :305–313.
- Meder, F., Daberkow, T., Treccani, L., Wilhelm, M., Schowalter, M., Rosenauer, A., Maedler, L., and Rezwani, K. (2012). Protein adsorption on colloidal alumina particles functionalized with amino, carboxyl, sulfonate and phosphate groups. *ACTA BIOMATERIALIA*, 8(3) :1221–1229.
- Melsens, M. L. (1851). Note sur les matières albuminoïdes. *Annales de chimie et de physique*, 3(33) :170.
- Milani, S., Baldelli Bombelli, F., Pitek, A. S., Dawson, K. A., and Rädler, J. (2012). Reversible versus Irreversible Binding of Transferrin to Polystyrene Nanoparticles : Soft and Hard Corona. *ACS Nano*, 6(3) :2532–2541.
- Miller, R., Grigoriev, D., Krägel, J., Makievski, A., Maldonado-Valderrama, J., Leser, M., Michel, M., and Fainerman, V. (2005). Experimental studies on the desorption of adsorbed proteins from liquid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 19(3) :479–483.
- Moser, Y., Lehnert, T., and Gijs, M. A. M. (2009). On-chip immuno-agglutination assay with analyte capture by dynamic manipulation of superparamagnetic beads. *Lab Chip*, 9(22) :3261–3267.
- Nakanishi, K., Sakiyama, T., and Imamura, K. (2001). On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(3) :233–244.
- Noh, H. and Vogler, E. A. (2006). Volumetric interpretation of protein adsorption : Partition coefficients, interphase volumes, and free energies of adsorption to hydrophobic surfaces. *Biomaterials*, 27(34) :5780–5793.
- Norde, W. (1996). Driving forces for protein adsorption at solid surfaces. *Macromolecular Symposia*, 103(1) :5–18.
- Norde, W. and Anusiem, A. C. I. (1992). Adsorption, desorption and re-adsorption of proteins on solid surfaces. *Colloids and Surfaces*, 66(1) :73–80.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Norde, W. and Favier, J. P. (1992). Structure of adsorbed and desorbed proteins. *Colloids and Surfaces*, 64(1) :87–93.
- Norde, W. and Giacomelli, C. E. (2000). BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states. *Journal of Biotechnology*, 79(3) :259–268.
- Oberholzer, M. R., Wagner, N. J., and Lenhoff, A. M. (1997). Grand canonical Brownian dynamics simulation of colloidal adsorption. *The Journal of Chemical Physics*, 107(21) :9157.
- Pandey, L. M. and Pattanayek, S. K. (2011). Hybrid surface from self-assembled layer and its effect on protein adsorption. *Applied Surface Science*, 257(10) :4731–4737.
- Pasche, S., Vörös, J., Griesser, H. J., Spencer, N. D., and Textor, M. (2005). Effects of ionic strength and surface charge on protein adsorption at PEGylated surfaces. *The journal of physical chemistry. B*, 109(37) :17545–52.
- Pérez, J. P., Carles, R., and Fleckinger, R. (2002). *Electromagnétisme : fondements et applications*. Dunod edition.
- Peula-Garcia, J. M., Ortega-Vinuesa, J. L., and Bastos-Gonzalez, D. (2010). Inversion of Hofmeister Series by Changing the Surface of Colloidal Particles from Hydrophobic to Hydrophilic. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(25) :11133–11139.
- Plotz, C. M. and Singer, J. M. (1956). The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.*, 21 :888–892.
- Rabe, M., Verdes, D., Rankl, M., Artus, G. R. J., and Seeger, S. (2007). A comprehensive study of concepts and phenomena of the nonspecific adsorption of beta-lactoglobulin. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, 8(6) :862–72.
- Rabe, M., Verdes, D., and Seeger, S. (2011). Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 162(1-2) :87–106.
- Ramsden, J. J. (1995). Puzzles and paradoxes in protein adsorption. *Chem. Soc. Rev.*, 24(1) :73–78.
- Ramsden, J. J. and Prenosil, J. E. (1994). Effect of Ionic Strength on Protein Adsorption Kinetics. *The Journal of Physical Chemistry*, 98(20) :5376–5381.
- Ranzoni, A., Janssen, X. J. A., Ovsyanko, M., van IJzendoorn, L. J., and Prins, M. W. J. (2010). Magnetically controlled rotation and torque of uniaxial microactuators for lab-on-a-chip applications. *Lab Chip*, 10(2) :179–188.

- Ranzoni, A., Schleipen, J. J. H. B., van IJzendoorn, L. J., and Prins, M. W. J. (2011). Frequency-Selective Rotation of Two-Particle Nanoactuators for Rapid and Sensitive Detection of Biomolecules. *Nano Letters*, 11(5) :2017–2022.
- Rocker, C., Potzl, M., Zhang, F., Parak, W. J., and Nienhaus, G. U. (2009). A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *Nat Nanotechnol*, 4 :577–580.
- Roth, C. M. and Lenhoff, A. M. (1993). Electrostatic and van der Waals contributions to protein adsorption : computation of equilibrium constants. *Langmuir*, 9(4) :962–972.
- Ruh, H., Kuehl, B., Brenner-Weiss, G., Hopf, C., Diabate, S., and Weiss, C. (2012). Identification of serum proteins bound to industrial nanomaterials. *TOXICOLOGY LETTERS*, 208(1) :41–50.
- Sander, M., Madliger, M., and Schwarzenbach, R. P. (2010). Adsorption of transgenic insecticidal Cry1Ab protein to SiO<sub>2</sub>. 1. Forces driving adsorption. *Environmental science & technology*, 44(23) :8870–6.
- Saphire, E. O., Parren, P. W., Pantophlet, R., Zwick, M. B., Morris, G. M., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Stanfield, R. L., Burton, D. R., and Wilson, I. A. (2001). Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1 : a template for vaccine design. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5532) :1155–9.
- Steinitz, M. (2000). Quantitation of the blocking effect of tween 20 and bovine serum albumin in ELISA microwells. *Analytical biochemistry*, 282(2) :232–8.
- Su, T. J., Lu, J. R., Thomas, R. K., Cui, Z. F., and Penfold, J. (1998). The Effect of Solution pH on the Structure of Lysozyme Layers Adsorbed at the Silica-Water Interface Studied by Neutron Reflection. *Langmuir*, 14(2) :438–445.
- Tekin, H. C., Cornaglia, M., and Gijs, M. A. M. (2013). Attomolar protein detection using a magnetic bead surface coverage assay. *Lab on a chip*, 13(6) :1053–9.
- Tenzer, S., Docter, D., Rosfa, S., Wlodarski, A., Kuharev, J., Reikik, A., Knauer, S. K., Bantz, C., Nawroth, T., Bier, C., Sirirattanapan, J., Mann, W., Treuel, L., Zellner, R., Maskos, M., Schild, H., and Stauber, R. H. (2011). Nanoparticle Size Is a Critical Physicochemical Determinant of the Human Blood Plasma Corona : A Comprehensive Quantitative Proteomic Analysis. *ACS Nano*, 5(9) :7155–7167.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Teste, B., Ali-Cherif, A., Viovy, J. L., and Malaquin, L. (2013). A low cost and high throughput magnetic bead-based immuno-agglutination assay in confined droplets. *Lab on a chip*, 13(12) :2344–9.
- The Lewin Group (2005). The Value of Diagnostics : Innovation, Adoption and Diffusion into Health Care - Lewin.com.
- Van De Hulst, H. C. (1981). *Light Scattering by Small Particles (Structure of Matter Series.)*. Dover Publ Inc. New York.
- Von Smoluchowski, M. (1917). Versuch einer mathematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloidaler Lösungen. *Zeitschrift für physikalische Chemie*, 92(2) :129 – 168.
- Wertz, C. F. and Santore, M. M. (2001). Effect of Surface Hydrophobicity on Adsorption and Relaxation Kinetics of Albumin and Fibrinogen : Single-Species and Competitive Behavior. *Langmuir*, 17(10) :3006–3016.
- Wertz, C. F. and Santore, M. M. (2002). Adsorption and Reorientation Kinetics of Lysozyme on Hydrophobic Surfaces. *Langmuir*, 18(4) :1190–1199.
- Yeung, K. M., Lu, Z. J., and Cheung, N. H. (2009). Adsorption of bovine serum albumin on fused silica : Elucidation of protein-protein interactions by single-molecule fluorescence microscopy. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 69(2) :246–250.
- Yoon, J.-Y., Kim, J.-H., and Kim, W.-S. (1998). Interpretation of protein adsorption phenomena onto functional microspheres. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 12(1) :15–22.
- Zhang, F., Skoda, M. W. A., Jacobs, R. M. J., Martin, R. A., Martin, C. M., and Schreiber, F. (2007). Protein interactions studied by SAXS : effect of ionic strength and protein concentration for BSA in aqueous solutions. *The journal of physical chemistry. B*, 111(1) :251–9.
- Zhang, Q., Menon, R., Deutsch, E. W., Pitteri, S. J., Faca, V. M., Wang, H., Newcomb, L. F., Depinho, R. A., Bardeesy, N., Dinulescu, D., Hung, K. E., Kucherlapati, R., Jacks, T., Politi, K., Aebersold, R., Omenn, G. S., States, D. J., and Hanash, S. M. (2008). A mouse plasma peptide atlas as a resource for disease proteomics. *Genome biology*, 9(6) :R93.