



HAL
open science

Adsorption de protéines à une interface eau-air fonctionnalisée

Nicolas Blondiaux, Laurent Davoust, Jean Berthier, Dominique Masse,
Frédéric Ginot

► **To cite this version:**

Nicolas Blondiaux, Laurent Davoust, Jean Berthier, Dominique Masse, Frédéric Ginot. Adsorption de protéines à une interface eau-air fonctionnalisée. 1er Congrès de Microfluidique, Microécoulements liquides et gazeux; phénomènes physiques et applications, Dec 2002, Toulouse, France. 10.1051/lhb/2003078 . hal-00203859

HAL Id: hal-00203859

<https://hal.science/hal-00203859v1>

Submitted on 25 Feb 2020

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

Adsorption de protéines à une interface eau/air fonctionnalisée

Proteins adsorption at a functionalised air/water interface

Nicolas Blondiaux*, Laurent Davoust^{1*}, Jean Berthier**, Dominique Masse**, Frédéric Ginot***

*LEGI, Equipe PIM, BP 53, 38041 Grenoble cedex 9

**LETI, CEA-Technologie Avancées, BP 53, Grenoble cedex 9

***BIO-MERIEUX, CEA-Technologie Avancées, BP 53, Grenoble cedex 9

An optical set-up coupled to a microscope is developed in order to follow the aging kinetics of a planar air/water interface from induced fluorescence. The technique is characterized with fluorescent-tagged particles and further applied to an air/water interface functionalized to adsorb selectively streptavidin. The second configuration under study turns out to be a 2-D foam entrapped between two glass plates ; a modelling taking into account diffusion and adsorption is solved by finite element method.

I ■ INTRODUCTION

Les systèmes de détection de molécules biologiques actuels (bio-puces) font intervenir un support solide (en verre ou silicium) préalablement fonctionnalisé à l'aide de sites moléculaires récepteurs. L'échantillon liquide à analyser est mis en contact avec le support fonctionnalisé ; si les molécules cibles à capturer sont en quantité suffisante dans l'échantillon liquide, un certain nombre d'entre elles s'adsorbent à la surface par diffusion puis reconnaissance spécifique avec les sites récepteurs. Pour la grande majorité des bio-puces, la distribution des récepteurs est discrète et la surface fonctionnalisée présente une extension finie : ce qui conduit à une sensibilité de détection limitée.

Cet article s'intègre dans une stratégie [1] qui consiste à fonctionnaliser non plus une interface solide/liquide mais

une interface liquide/gaz pour i) adsorber/concentrer des molécules cibles, ii) fabriquer de l'aire interfaciale en produisant une mousse. Les caractéristiques de chaque configuration (interface plane ou mousse) sont rappelées dans le tableau suivant : les moyens de modélisation ou de détection associés font intervenir des phénomènes multi-physiques caractéristiques de la microfluidique : importance de l'adsorption moléculaire, rhéologie interfaciale, détection par le potentiel électrique de surface... Les points abordés dans cet article sont soulignés dans le tableau ; ils se rassemblent autour d'un objectif commun : développer une méthode optique générique permettant d'estimer l'adsorption de molécules cibles à une interface et dans une mousse 2-D constituées toutes deux d'eau et d'air. L'interface eau/air constitue un site privilégié pour l'adsorption d'objets amphiphiles (détergents, lipides, colloïdes).

	Détection des cibles	Modélisation	Avantages (+)/Inconvénients (-)
Interface plane	- Electrique (potentiel de surface) - <u>Optique (BAM, ellipsométrie, microscopie optique, fluorescence)</u> - Rhéologique (tension de surface)	1-D : voir littérature [2, 3]	(+) Géométrie et modélisation simples (-) Surface fonctionnalisée finie
Mousse 2-D	- Rhéologique (élasticité) - <u>Optique (microscopie optique, fluorescence)</u>	2-D : modélisation spécifique	(+) Surface fonctionnalisée (+) Efficacité d'adsorption (-) Modélisation délicate (-) Géométrie complexe

¹ Laurent.Davoust@hmg.inpg.fr

Des expériences sont présentées avec l'exemple de particules fluorescentes et d'une protéine très répandue en biologie : la streptavidine. Les précisions sur la fonctionnalisation physicochimique de l'interface pour l'adsorption de cette protéine sont apportées. Finalement, une modélisation des phénomènes de diffusion/adsorption de molécules cibles est proposée pour une mousse 2-D eau/air.

II ■ ADSORPTION À UNE INTERFACE EAU/AIR PLANE

Pour valider la fonctionnalisation d'une interface eau/air, il faut mesurer son efficacité d'adsorption pour les cibles choisies. La stratégie retenue est une technique de fluorescence induite qui se décompose en trois étapes : l'excitation

du fluorophore, le temps de vie de l'état excité et la désexcitation du fluorophore (émission d'un photon) [4]. Chaque fluorophore possède un spectre d'absorption et d'émission. Il est préférable d'exciter le fluorophore avec une longueur d'onde correspondant à son pic d'absorption tout en prenant garde :

- au *photobleaching* : si le fluorophore est illuminé trop intensément, il est tout simplement détruit.
- au *quenching* : lorsque le fluorophore émet un photon par fluorescence, celui-ci peut aller exciter une molécule voisine plutôt que de partir vers le photodétecteur.
- à toute émission de fluorescence parasite provenant de matériaux comme les plastiques.

● II.1 Description du montage (figure 1)

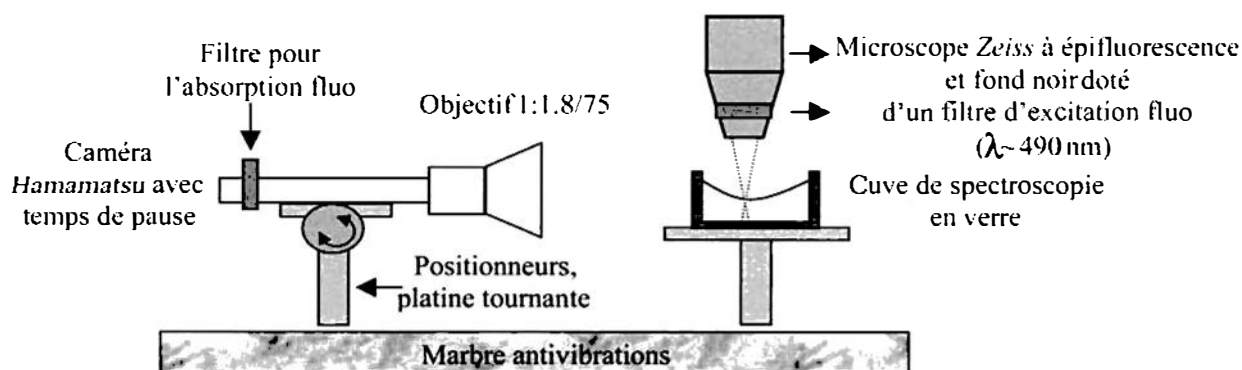


Figure 1 : Montage optique pour les mesures de vieillissement de l'interface eau/monocouche/air fonctionnalisée.

Le but est de mesurer l'augmentation de signal fluorescent provenant de l'interface pendant l'adsorption de molécules cibles fluorescentes tout en surveillant la surface fonctionnalisée (évolution de structurations...). Une cuve de spectroscopie contient un échantillon liquide à la surface duquel est étalée une monocouche de phospholipides (fluorescents). L'émission fluorescente ou l'éclairage en lumière blanche tangentiel (fond noir) sont assurés par un microscope Zeiss. La première solution pour visualiser la fluorescence de l'interface est d'utiliser l'objectif du microscope mais la fluorescence de molécules solubilisées en sous-phase vient se superposer à la contribution de l'interface. Pour s'affranchir de cette difficulté, un dispositif de visualisation latérale est installé. Le microscope réalise donc un faisceau de diamètre et de divergence réglables grâce à ses différents diaphragmes et objectifs. Un filtre permettant de régler la longueur d'onde d'excitation fluo est inséré juste avant l'objectif du microscope. Le faisceau obtenu est plus ou moins conique (selon l'objectif sélectionné) et son diamètre reste faible par rapport aux dimensions de la cuve (réglage par le diaphragme et l'objectif sélectionnés). Le diaphragme permet également de régler l'homogénéité en intensité lumineuse du faisceau émis. Le dispositif de capture latérale comprend une caméra, un objectif, des bagues allonges et un filtre dont le spectre est adapté au fluorophore. L'ensemble est monté sur un positionneur 3 axes et possède un réglage d'inclinaison.

Les filtres sont caractérisés au spectrophotomètre afin de vérifier si leurs spectres ne s'entrecroisent pas et s'ils sont

adaptés au fluorophore considéré. Les tests sont menés sur des particules taggées à la fluorescéine de type *Transflu* (granulométrie : 0,1µm, fournisseur : *Molecular Probes*). La figure 2 présente les spectres des filtres utilisés à comparer avec les spectres d'absorption ($\lambda_{pic} = 490$ nm) et d'émission de fluorescence ($\lambda_{pic} = 519$ nm) des particules. L'acquisition des données est réalisée par numérisation du signal délivré par la caméra Hamamatsu. L'image obtenue présente une taille de 512*512 pixels et les niveaux de gris sont codés sur 8 bits.

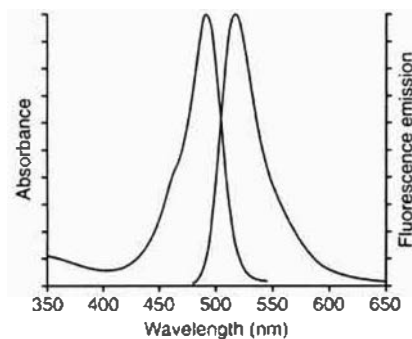
● II.2 Caractérisation du montage

• Le faisceau d'éclairage

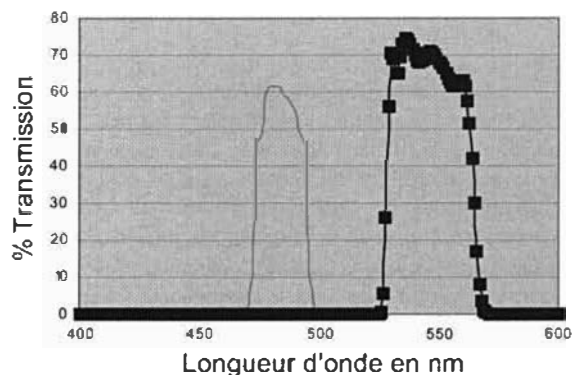
Le faisceau d'éclairage produit par le microscope est caractérisé à l'aide d'une mire (fréquence spatiale de 1 à 12 paires de lignes/mm). La divergence du faisceau varie avec l'objectif utilisé (1,5° - 30°). Le diamètre du faisceau dans le plan de mise au point varie entre 45 µm et 5 mm.

• Dispositif de visualisation latérale

Un banc de caractérisation est mis en place pour mesurer le champ de vue, le grossissement et la profondeur de champ de l'ensemble caméra/bagues allonges/objectif. Il comporte une source lumineuse, un diffuseur et une mire montée sur un positionneur 3 axes. Le champ de vue du dispositif est mesuré (3 mm horizontalement, 2,25 mm verticalement, rapport 4/3) en comptant le nombre de paires de lignes visibles pour une



a)



b)

Figure 2 : a) Spectres d'adsorption et d'émission de fluorescence des particules Transluo.
b). Spectres d'excitation (—) et d'absorption (—■—) des filtres impliqués dans le montage optique.

fréquence spatiale donnée. Puisque la CCD de la caméra mesure 1cm de large, on en déduit un grossissement de 3. La profondeur de champ est la distance séparant deux points extrêmes de l'axe optique du dispositif dont les images sont vues avec une netteté suffisante ; elle dépend du grossissement du dispositif, de son ouverture numérique et de la taille des pixels du capteur. Plus délicate à déterminer, elle fait intervenir la notion de flou ; dans notre application, elle peut être estimée à 300 ± 50 nm. Cette grandeur doit ensuite être comparée à la taille du faisceau : si elle est plus grande que le diamètre du faisceau (objectif de fort grossissement), tout ce qui est éclairé apparaîtra net sur la caméra. Dans le cas contraire (faisceau d'éclairage de grand diamètre), seule une partie de l'image sera nette (situation indésirable).

• **Localisation de la surface**

L'image obtenue par le dispositif de capture latérale est assez complexe car le liquide de la cuve forme un ménisque. La cuve étant carrée et le verre utilisé hydrophile, on

obtient un ménisque de forme concave avec une zone approximativement plane au centre de la cuve. La première expérience réalisée pour localiser l'interface est réalisée avec des phospholipides fluorescents (NBD-PE, fournisseur : Avanti Polar Lipid). De par leur caractère amphiphile, ils se trouvent naturellement à l'interface et en délivrent ainsi une image précise sur la caméra CCD. La *figure 3* montre comment, selon la position du faisceau incident par rapport au centre de la cuve, une ellipse plus ou moins aplatie se dessine qui figure l'interface. En fait, l'élément surfacique éclairé par le faisceau peut être plus ou moins incurvé selon sa position par rapport à l'interface considérée. Dans la région centrale de l'interface (la plus plane), l'étendue géométrique selon l'axe z de l'élément surfacique éclairé est quasiment nulle. En revanche, si le faisceau s'approche du bord de la cuve, la courbure de l'interface augmente et en première approximation, on peut considérer que l'élément surfacique éclairé réalise l'intersection d'un cylindre avec une surface concave.

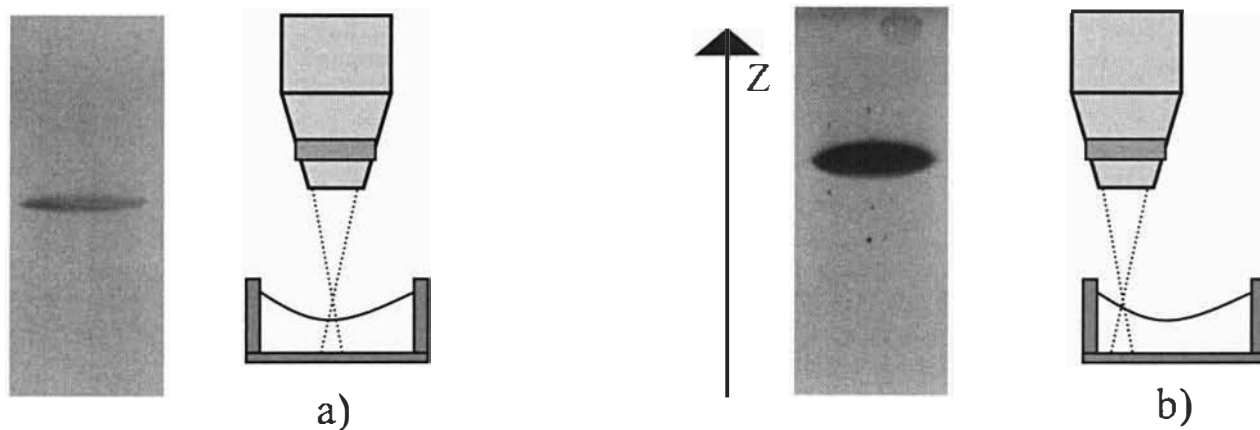


Figure 3 : Localisation de l'interface par des phospholipides fluorescents :
a) éclairage au centre de l'interface, b) éclairage à la périphérie de l'interface.

● **II.3 Cinétique d'adsorption pour des particules fluorescentes**

La deuxième expérience de validation du montage est réalisée à l'aide de particules *Transflu* (ϕ : 0.1 μm , *Molecular Probes*). Ces particules présentent certains avantages par rapport aux molécules fluorescentes : elles sont hydrophobes, ce qui permet de s'affranchir de la fonctionnalisation de l'interface eau/air, et se distinguent les unes des autres sur l'image. Une solution aqueuse contenant des particules *Transflu* est introduite dans la cuve et une image est produite sur la caméra latérale. Cette fois, la sous-phase est également fluorescente (*figure 4*). La zone inférieure correspond aux rayons émis par les particules de la sous-phase (voir cas n° 1 ci-après). L'ellipse très lumineuse provient des particules à l'interface. La zone lumineuse supérieure est un artefact correspondant à l'image de la sous-phase à travers le dioptre que constitue l'interface. Quelques considérations d'optique géométrique sont nécessaires pour voir l'origine de cette dernière interprétation (*figure 5*).



Figure 4 : Image obtenue pendant l'adsorption de particules *Transflu*.

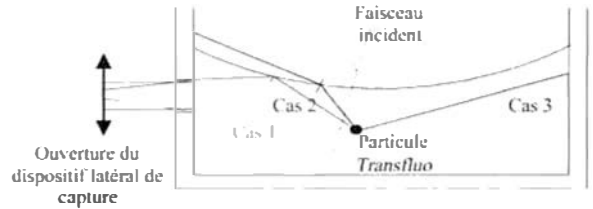


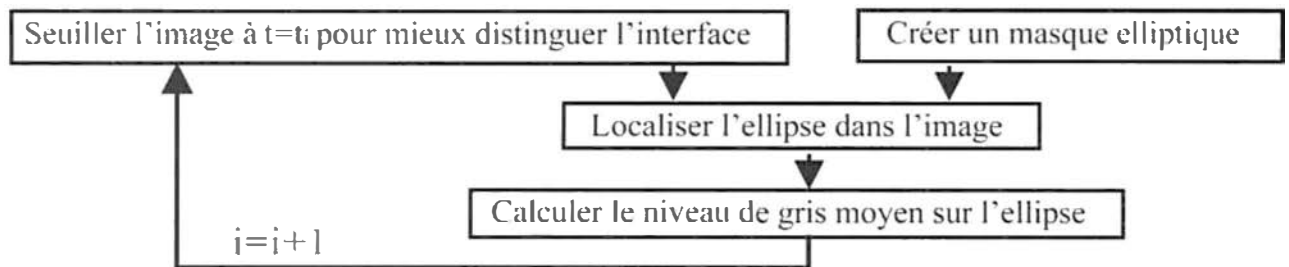
Figure 5 : Trois trajectoires possibles pour des rayons lumineux émis à partir d'un fluorophore en sous-phase.

- *cas n° 1* : les rayons émis par le fluorophore à partir de la sous-phase traversent le liquide, sortent de la cuve puis sont captés par la caméra CCD.
- *cas n° 2* : les rayons sont émis vers l'interface. Leurs angles d'incidence sur l'interface sont tels qu'il y a réflexion totale (indice de l'eau supérieur à celui de l'air, angle de réflexion totale de 41.8°). Ces rayons ainsi déviés sont ensuite captés par la CCD.
- *cas n° 3* : les rayons sont perdus.

Le cas 2 entraîne donc la formation d'une seconde image sur la CCD. Au final, cet artefact s'avère très utile pour s'assurer du bon emplacement de l'interface.

• **Traitement d'image et validation du montage**

Pour valider le montage optique proposé, une cinétique d'adsorption est finalement réalisée avec les particules *Transflu*. Un traitement d'image est réalisé afin d'isoler le signal spécifique de l'interface : le niveau de gris moyen intégré sur l'ellipse. Le diagramme ci-après présente les différentes étapes du traitement d'image réalisé sur Matlab.



Le signal de fluorescence provenant de l'interface augmente notablement comme le montre les clichés de la *figure 6*. Une fois le traitement d'image réalisé, nous obtenons pour ces particules la courbe de cinétique présentée sur la *figure 7* qui montre bien l'augmentation du signal d'adsorption au niveau de l'interface ainsi qu'un processus de saturation explicable par le fait que la concentration interfaciale en particules *Transflu* a atteint sa valeur maximale ($\Gamma \sim \Gamma_\infty$ en mol/m^2).

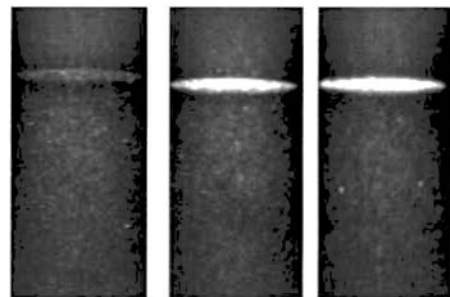


Figure 6 : Images obtenues pendant le processus d'adsorption des particules *Transflu* à 3 instants différents : $t = 20 \text{ mn}$, 40 mn , 60 mn .

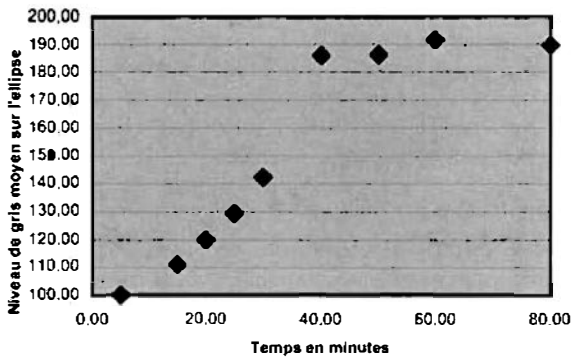


Figure 7 : Courbe de cinétique obtenue après traitement d'image.

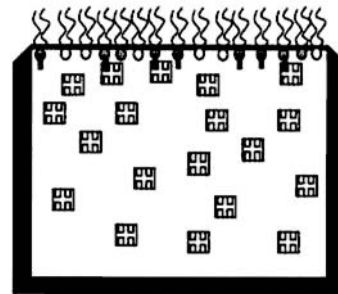
III ■ INTERFACE EAU/AIR FONCTIONNALISEE

⊗ III.1 Montage moléculaire

Si l'on souhaite capturer une molécule cible non spécialement amphiphile, il est nécessaire de créer une affinité chimique entre celle-ci et l'interface eau/air support. Cette dernière est donc fonctionnalisée à l'aide d'une couche de molécules amphiphiles ayant des sites chimiques spécifiques de la cible à capturer par adsorption.

La molécule cible choisie dans cette étude est la streptavidine [5] : c'est une protéine, soluble dans l'eau, bien connue en biologie moléculaire. Les molécules amphiphiles choisies dans cette étude sont des phospholipides insolubles dans l'eau qui possèdent une tête polaire hydrophile reliée à deux chaînes carbonées hydrophobes. Lorsqu'ils sont étalés sur l'eau, ils pointent leur tête hydrophile vers l'eau (sous-phase) et laissent leurs queues hydrophobes hors de l'eau dans l'air (figure 8) ; ils s'organisent sous la forme d'un film plus ou moins fluide selon leur concentration surfacique (phase gazeuse, liquide ou solide, figure 9). Pour achever la fonctionnalisation de la surface, la stratégie adoptée consiste

à greffer au niveau de la tête hydrophile de ces phospholipides une molécule de biotine. Un tel montage moléculaire fait l'objet d'un travail d'ingénierie spécifique : ces phospholipides « biotinylés » sont donc directement achetés (Biotine-DiPalmitoil-Phosphatidylethanolamine ou BDPPE, fournisseur : *Avanti Polar Lipid*). Les phospholipides biotinylés présents à l'interface eau/air fonctionnalisent celle-ci pour la streptavidine via la réaction streptavidine-biotine. La biotine (ou vitamine H), remplit donc un rôle de médiateur : elle possède l'affinité recherchée pour les sites récepteurs de la streptavidine. La réaction de reconnaissance moléculaire entre streptavidine et biotine, de type clé-serrure est très énergétique (interaction ligand-récepteur: 88 kJ.mol^{-1}) ; elle est caractérisée par une constante d'affinité très élevée $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ qui traduit le fait que l'association biotine-streptavidine n'est que très peu réversible. Finalement, les phospholipides biotinylés sont mélangés avec des phospholipides neutres et intercalants (DiOleoyl-Phosphatidylcholine ou DOPC, fournisseur : *Sigma-Aldrich*) qui permettent de conserver la diffusion interfaciale dans la monocouche si des molécules de streptavidine sont adsorbées (figure 8).



- ⊗ Phospholipide
- ⊗ Phospholipide biotinylé
- ⊗ Streptavidine liée à un phospholipide

Figure 8 : Interface eau/air fonctionnalisée.

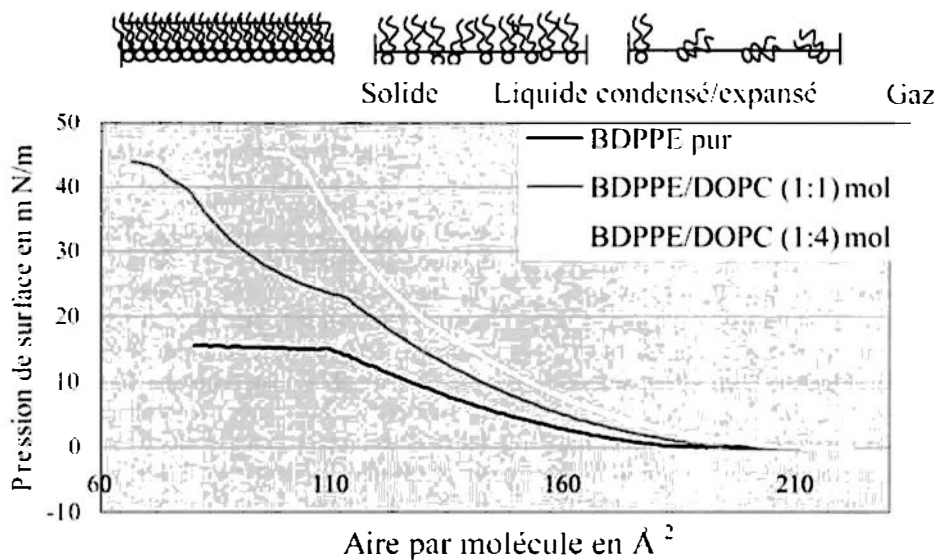


Figure 9 : Isothermes de compression réalisées pour une monocouche de phospholipides biotinylés (BDPPE), une monocouche mixte constituée de BDPPE et phospholipides intercalants (DOPC) avec deux rapports de dilution.

● III.2 Fabrication et caractérisation d'un film de phospholipides

Le film est fabriqué par dépôt(s) sur la sous-phase aqueuse de quelques ml d'un solvant organique volatil (chloroforme, hexane) contenant les phospholipides dilués. La nature du solvant et la concentration en phospholipides utilisés pour l'étalement constituent des paramètres à prendre en compte dès lors qu'ils conditionnent la structuration de la monocouche lipidique (formation d'îlots lipidiques...) [6,7]. Finalement, le protocole expérimental utilisé pour réaliser nos monocouches est le suivant :

- la sous-phase est constituée d'eau pure milliQ et d'une solution tampon (NaCl 0,1 M, Tris-HCl 20 mM) pour fixer le potentiel électrique de surface et le pH,
- le solvant est constitué de chloroforme, d'hexane ou d'un mélange isovolume de ces solvants.

En pratique, deux cuves sont utilisées : une cuve de Langmuir en Téflon (surface : 240 cm²) et une cuve de spectrométrie destinée à la visualisation sous microscope (surface : 1 cm²). Une attente de 30 minutes est respectée après dépôt des phospholipides pour que le solvant s'évapore complètement et que la monocouche s'homogénéise. Une cinétique d'évaporation trop rapide engendre des inhomogénéités dans la monocouche : afin de la ralentir, un couvercle est placé sur la cuve. Les films de phospholipides sont ensuite caractérisés mécaniquement à l'aide de courbes de compression obtenues sur cuve de Langmuir et optiquement *via* la microscopie par épifluorescence.

• Courbes de compression sur cuve de Langmuir

Les manipulations sur cuve de Langmuir permettent de voir l'évolution de la tension de surface en fonction de la compression 2-D de la monocouche de phospholipides [8]. Il est ainsi possible de relier la tension de surface à la concentration interfaciale en phospholipides. La cuve de Langmuir est entièrement remplie par la sous-phase, laquelle est ensuite recouverte de sa monocouche. A la surface, une barrière en Téflon mobile mouille le liquide et comprime la monocouche en se déplaçant. La tension de surface est simultanément mesurée par une balance de Wilhelmy. Les solutions utilisées pour fabriquer les monocouches sur la cuve de Langmuir sont généralement assez concentrées (2 mg/L) pour éviter d'avoir une trop grande quantité à déposer (typiquement 4 ou 5 fois 2 µL). Les phases gazeuse, liquide et solide sont observées sur les courbes obtenues (*figure 9*). Dans la phase gazeuse, les phospholipides sont dispersés et interagissent peu entre eux. Dans la phase liquide, l'aire par molécule est un peu plus réduite et les phospholipides interagissent entre eux ; la surface conserve une certaine fluidité. Lorsque la compression de la monocouche est telle que la phase solide est atteinte, les phospholipides sont collés les uns aux autres, s'inclinent et leurs chaînes carbonées s'entrelacent. Au-delà, si la compression persiste, la monocouche se déstructure (*collapse*). Les isothermes de compression ont été réalisées pour les DOPC, les BDPPE et le mélange BDPPE/DOPC permettant de fonctionnaliser l'interface eau/air.

Pour des monocouche pures composées, soit de DOPC, soit de BDPPE, l'aire disponible par molécule varie entre 70 Å² et 210 Å². Cependant, les deux types de phospholipides adoptent des comportements différents durant la compression puisque les aires par molécule associées au *collapse* sont différentes : 70 Å² pour les DOPC, 120 Å² pour les BDPPE. L'isotherme de compression réalisée sur monocouche mixte

BDPPE:DOPC (1 : 4 mole, *figure 9*) présente un épaulement à une aire moléculaire ~ 100 Å². Si on effectue l'isotherme pour un mélange (1 : 1 mole), l'épaulement, plus précoce et plus prononcé, survient à une aire par molécule ~ 120 Å² qui coïncide avec le *collapse* des BDPPE : il est donc possible que les phospholipides ne soient pas miscibles.

• Visualisation par fond noir et épifluorescence.

Ces isothermes de compression ne donnant accès qu'aux propriétés macroscopiques moyennées de la monocouche, il est intéressant de mener une caractérisation plus microscopique par fond noir ou épifluorescence. La visualisation par fond noir permet de suivre l'étalement et l'évaporation du solvant. Lorsqu'il est déposé sur une surface aqueuse, le chloroforme a tendance à réticuler à la surface de l'eau alors que l'hexane s'étale sur toute la surface et forme un film mince. Cette différence de comportement vient de la solubilité du solvant dans l'eau qui conditionne la tension de surface. Par exemple le chloroforme se dissout suffisamment dans l'eau pour saturer la surface eau/air ce qui modifie l'équilibre des tensions superficielles et permet d'avoir un angle de contact non nul entre l'eau et le chloroforme (formation d'une lentille en surface). Ce phénomène n'est pas observé avec l'hexane dont la solubilité dans l'eau est bien plus faible. Par ailleurs, on observe lors de l'évaporation, un brassage au niveau de l'interface du à l'effet Marangoni chimique (gradient en concentration interfaciale de phospholipides) et thermique (évaporation du solvant).

Une caractérisation de la monocouche par épifluorescence est également réalisée. Pour cela, des phospholipides fluorescents (NBD-PE, Avanti Polar Lipid) sont mélangés à des phospholipides classiques (DOPC) et déposés sur un tampon (0,1 M NaCl, 20 mM Tris HCl). La visualisation de la surface révèle la présence d'îlots fluorescents très denses, compatibles avec la non-miscibilité suspectée à l'issue des isothermes de compression. Les couches de phospholipides ainsi fabriquées se révèlent inhomogènes et la présence d'îlots constitue un réel problème pour mesurer la cinétique d'adsorption de toute molécule cible. Plusieurs études portant sur des phospholipides ont été réalisées en épifluorescence dans la littérature [6,7, 9]. Toutes montrent que la monocouche obtenue est effectivement composée de domaines plus ou moins condensés. Le comportement de la monocouche est complexe puisque selon son état de compression et selon la nature des phospholipides, la taille ou le nombre de ces domaines changent.

● III.3 Montage optique appliqué à l'adsorption de la streptavidine : expérience préliminaire

Avec une seringue Hamilton, un volume de 3 µL d'une solution mixte de phospholipides (lipides ligands BDPPE/ lipides intercalants DOPC, (1 : 4) mol, 230 µM) est déposé sur une sous-phase aqueuse constituée de 0,8 mL de solution tampon (NaCl 0,1M, Tris-HCl 20 mM). Après 30 minutes d'attente, 200 µL de solution de streptavidine fluorescente (fournisseur : *Molecular Probes*) à 40 µM sont injectés dans la sous-phase. La courbe de cinétique obtenue n'est pas satisfaisante : l'émergence aléatoire d'agglomérats condensés de phospholipides fluorescents dans le champ de la caméra perturbe la mesure (saturation du capteur CCD, traitement d'image très délicat). Ce phénomène est attribué à la mobilité de l'interface. La fonctionnalisation n'étant pas homogène, le signal capté par la caméra latérale est instationnaire et ne rend pas compte de la cinétique d'adsorption.

IV ■ PHENOMENES DE DIFFUSION/ ADSORPTION DANS UNE MOUSSE 2-D

Parallèlement aux développements expérimentaux, une approche de modélisation pour une mousse 2-D a été initiée avec trois hypothèses fondamentales préalablement émises :

H1. les interfaces liquide/gaz constitutives de la mousse sont dotées de sites récepteurs fonctionnalisés pour adsorber des molécules cibles : ces sites récepteurs sont uniformément distribués le long des interfaces.

H2. Les phénomènes hydrodynamiques tels que i) le drainage des films interstitiels, ii) le pompage lié à l'effet Marangoni chimique aux interfaces, iii) la convection des molécules cibles dans les films ou les interfaces sont négligés.

H3. La diffusion interfaciale est également négligée.

La première étape de la modélisation consiste à calculer l'évolution de la concentration en cibles dans les films interstitiels. Cette concentration dépend de la diffusion moléculaire au sein de ces films et des phénomènes d'adsorption/désorption aux interfaces fonctionnalisées. Dans notre cas, le principe de la fonctionnalisation des interfaces est tel que la désorption est négligeable devant l'adsorption (liaison ligand-récepteur très énergétique). Par conséquent, on s'attend à ce que, progressivement, la concentration en cibles diminue dans les films interstitiels jusqu'à une valeur asymptotique proche de zéro si tous les sites récepteurs ne sont pas saturés à la fin du calcul ($\Gamma < \Gamma_{\infty}$).

Les hypothèses H2 et H3 impliquent que la diffusion (volumique) dans les films interstitiels est le seul mécanisme de transport moléculaire considéré, $\frac{\partial C}{\partial t} = D \Delta C$, avec C (moles/m³), la concentration en molécules cibles et D (m²/s), le coefficient de diffusion.

La loi constitutive de Langmuir rend compte de l'adsorption aux interfaces fonctionnalisées,

$\frac{d\Gamma}{dt} = k_{on}C_s(\Gamma_{\infty} - \Gamma) - k_{off}\Gamma$, avec Γ_{∞} (moles/m²), la concentration maximale en molécules cibles adsorbées, supposée uniforme (H1), Γ (moles/m²), la concentration de surface en sites occupés, k_{on} (m³/mole/s), le coefficient d'adsorption, k_{off} (1/s), le coefficient de désorption, C_s (mole/m³), la concentration volumique en cibles au voisinage de l'interface. Les deux équations précédentes sont couplées via la loi de Fick, $\frac{d\Gamma}{dt} = -D \nabla C|_s \cdot \mathbf{n}$, avec

$\nabla C|_s \cdot \mathbf{n}$, le flux solutal normal à l'interface. Le système est résolu à l'aide du logiciel aux éléments-finis FEMLAB™ [10]. Les valeurs caractéristiques utilisées dans les calculs, $D = 10^{-10}$ m²/s, $k_{on} = 100$ m³/mole/s, $k_{off} = 10^{-5}$ 1/s,

$\Gamma_{\infty} = 10^{-8}$ mole/m², ont été obtenues à partir d'expériences réalisées dans la méthode classique de capture sur support solide. On fait donc l'hypothèse que l'on peut fonctionnaliser les interfaces impliquées dans la mousse de façon similaire à une interface solide/liquide.

Du point de vue géométrique, le modèle proposé s'applique à un réseau de bulles circulaires et fixes, typiquement représentatif des mousses 2-D eau/air que nous avons obtenu expérimentalement à l'aide de la microscopie par épifluorescence (figure 10). Ces mousses sont stabilisées par ajout de



Figure 10. Observation par épifluorescence d'une mousse 2-D eau/air.

La taille moyenne des bulles est d'environ 500 μm.

tensioactif (Triton) et coincées entre deux plaques de verre. Les particules *Transflu* permettent de visualiser les films interstitiels et de valider l'hypothèse H2. En s'inspirant de la figure 10, on définit pour le calcul autant de régions que de bulles et une seule région pour tous les films interstitiels (domaine connexe). Puis le domaine de calcul est maillé avec des éléments triangulaires de Delauney. La figure 11 représente les isovaleurs en niveaux de gris de la concentration en cibles à 3 instants $t = 1, 10, 100$ secondes. Les bulles périphériques permettent de montrer que l'épaisseur caractéristique de la couche limite diffusionnelle est commensurable avec les films minces interstitiels. Il n'est donc pas étonnant de constater que l'adsorption est limitée dans les films les plus minces : la composante normale du gra-

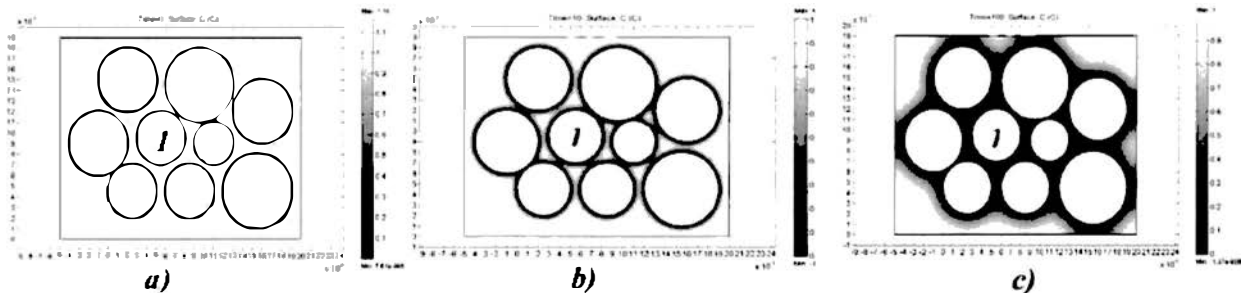


Figure 11. Concentration volumique en molécules cibles dans les films minces, a) $t = 1$ s : la diffusion n'est pas encore visible, b) $t = 10$ s : la diffusion/adsorption commence à affecter une zone circulaire autour des bulles, c) $t = 100$ s : la capture des molécules cibles est pratiquement terminée dans les films interstitiels entre les bulles.

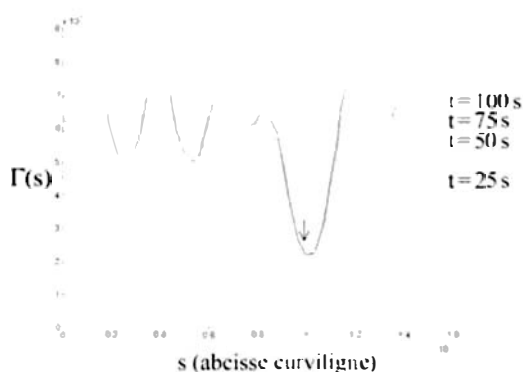


Figure 12. Profils de concentration $\Gamma(s)$ à la surface de la bulle n° 1 (voir figure 11) aux temps $t = 25, 50, 75$ et 100 s. Les petites fluctuations observées sur $\Gamma(s, t = 25$ s) sont la signature d'un léger bruit numérique (effet des mailles). La flèche indique la plus faible valeur de Γ qui coïncide avec la région la plus amincie d'un film interstitiel ; la fin du régime transitoire y est rapidement atteinte, en moins de 25 secondes. Les profils à $t = 75$ s et 100 s tendent à se superposer, ce qui montre que l'équilibre global est atteint au-delà de 100 s.

dient solutal en molécules cibles s'y trouve plus faible. Ce phénomène peut être illustré quantitativement avec la figure 12. A un instant t donné, on trace la distribution de concentration interfaciale $\Gamma(s)$ en molécules cibles adsorbées le long de l'interface d'une bulle-test (bulle n° 1 sur la figure 11) : cette opération est répétée à d'autres instants durant le calcul. On observe une succession de bosses et de creux correspondants aux régions les plus larges ou les plus minces du film interstitiel enveloppant la bulle-test. On observe que les courbes se resserrent dans les creux confirmant que l'équilibre est rapidement atteint dans les régions les plus minces des films interstitiels tandis que les concentrations interfaciales y sont les plus faibles. En accord avec la littérature sur les mousses, la concentration interfaciale est trouvée maximale aux extrémités des films interstitiels (ménisques de Plateau).

V ■ CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le montage optique présenté dans cet article a été entièrement caractérisé (propriétés de l'éclairage, du dispositif de capture, traitement d'image) : il permet de mesurer avec une précision suffisante la cinétique d'adsorption de particules ou molécules fluorescentes solubles ou amphiphiles à l'échelle microfluidique d'une interface liquide/gaz.

Dans le cas où une interface eau/air est fonctionnalisée par des phospholipides, des difficultés ont été mises en évidence quant à l'obtention d'une monocouche homogène. La fluidité de l'interface fonctionnalisée autorise la mobilité 2-D d'îlots denses en phospholipides fluorescents : ces îlots sont capables de provoquer une augmentation soudaine du signal de fluorescence émise lorsqu'ils croisent le faisceau lumineux d'excitation. Le signal reçu par la caméra latérale est donc instationnaire et ne peut rendre compte de la cinétique d'adsorption.

La cuve de spectroscopie utilisée jusqu'alors dans nos expériences devra donc être transformée en une cuve de Langmuir

permettant la compression progressive de la monocouche de phospholipides et l'application simultanée de la méthode de caractérisation optique proposée dans cet article. Il devrait donc être possible de connaître les conditions de température et de pression de la monocouche qui rendent l'interface fonctionnalisée homogène. Dans ce cas seulement, la mesure de l'adsorption de la streptavidine à une interface eau/air fonctionnalisée par des phospholipides est envisageable.

En accord avec la littérature sur les mousses, la modélisation du transport par diffusion/adsorption au sein des films minces interstitiels d'une mousse eau/air 2-D a mis en évidence une densification des molécules cibles adsorbées au niveau des régions de Plateau. Outre le fait que l'effet Marangoni chimique n'est pas inclus dans la modélisation (phénomène pourtant susceptible de s'opposer à la densification locale de cibles adsorbées), le modèle mis en œuvre se base sur des hypothèses simplificatrices portant notamment sur l'absence de convection et sur une fonctionnalisation homogène des interfaces. Néanmoins, on obtient un ordre de grandeur du transitoire nécessaire à la diffusion/adsorption complète de l'ordre de 100 secondes pour le cas d'une fonctionnalisation d'interfaces liquide/gaz équivalente à celle d'une puce solide.

Parmi les compléments utiles à cette modélisation, il paraît opportun d'envisager à terme le couplage avec la microfluidique dans les films interstitiels, couplage qui apparaît à travers le bilan des contraintes aux interfaces et la rhéologie interfaciale.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BERTHIER J., DAVOUST L. (2002). – Capture et concentration de molécules par émulsion dans un micro-réacteur. Application à la détection ou l'extraction spécifiques de macromolécules biologiques ou particules colloïdales. Brevet CEA/CNRS n° DD2319 étendu.
- [2] DUKHIN S., KRETZSCHMAR G., MILLER R. (1995). – Dynamics of Adsorption at Liquid Interfaces, Elsevier.
- [3] FERRI J.K., STEBE K.J. (2000). – Which surfactant reduce surface tension faster. Adv. in Colloid & Int. Sci., **85**, pp. 61-97.
- [4] HANGLAND R., SPENCE M., JOHNSON L. (1996). – Handbook of fluorescent Probes and Research Chemicals, 6^{ème} édition.
- [5] DARST S., AHLERS M., MELLER P., KUBALEK E., BLANKENBURG R., RIBI H., RINGSDORF H., KORSBERG R. (1991). – Two-dimensional crystals of streptavidin on biotinylated lipid layers and their interactions with biotinylated macromolecules. Biophys. J., **59**, pp. 387-396.
- [6] NAG K., KEOUGH K. (1993). – Epi-fluorescence Microscopic Studies of Monolayers Containing Mixtures of Dioleoyl- and Dipalmitoylphosphatidylcholines. Biophys. J., **65**, pp. 1019-1026.
- [7] SCHIEF W., TOURYAN L., HALL S., VOGEL V. (2000). – Nanoscale Topographic Instabilities of a phospholipid Monolayer. J. Phys. Chem., **104**, pp. 7388-7393.
- [8] NIMA, Langmuir Blodgett troughs, Operating Manual
- [9] LIPP M., LEE K., ZASADZINSKI J., WARING A. (1997). – Design and performance of an integrated fluorescence, polarized fluorescence, and Brewster angle microscope/Langmuir trough assembly for the study of lung monolayers. Rev. Sci. Instr., **68**, pp. 2574-2582
- [10] FEMLAB. (2002). – Multiphysics in MATLAB, Version 2.2., <http://www.femlab.com>