



HAL
open science

Développement et caractérisation d'une puce à cellules pour le criblage d'agents toxiques

R. Baudoin

► **To cite this version:**

R. Baudoin. Développement et caractérisation d'une puce à cellules pour le criblage d'agents toxiques. Sciences de l'ingénieur [physics]. Université de Technologie de Compiègne, 2008. Français. NNT : . tel-00342342

HAL Id: tel-00342342

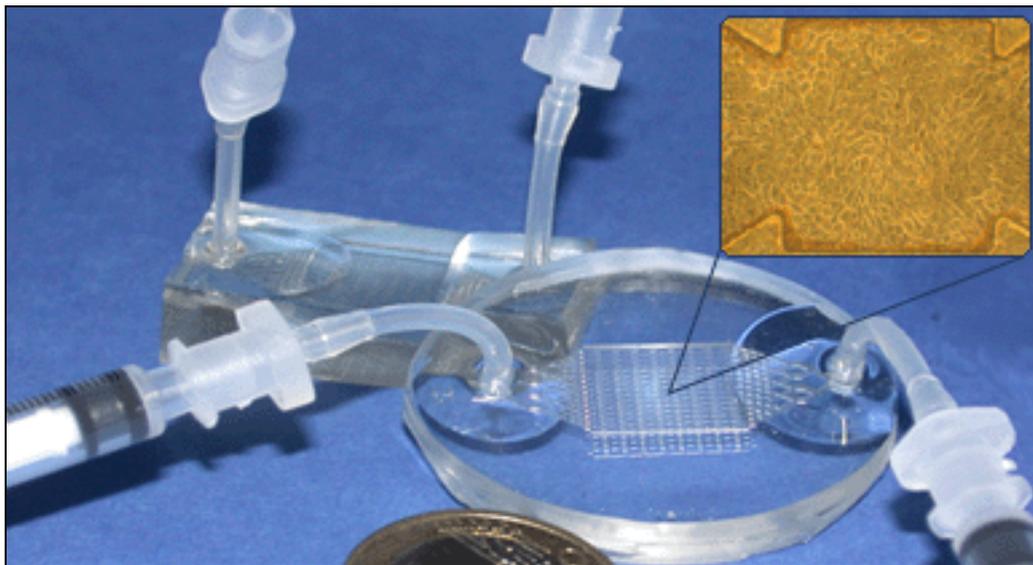
<https://theses.hal.science/tel-00342342>

Submitted on 27 Nov 2008

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.

Développement et caractérisation d'une puce à cellules pour le criblage d'agents toxiques



BAUDOIN Régis

**Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Docteur de l'UTC**

Soutenue le 24 octobre 2008

Spécialité : Bio-Ingénierie, Biomécanique, Biomatériaux

Développement et caractérisation d'une puce à cellules pour le criblage d'agents toxiques

Soutenue le 24 octobre 2008 devant le jury composé de :

MME.	D. BARTHES-BIESEL (Présidente)
MME.	C. BROCHOT (Examineur)
M.	E. LECLERC (Directeur de Thèse)
MLLE.	C. LEGALLAIS (Examineur)
M.	F. MOREL (Rapporteur)
M.	V. SENEZ (Rapporteur)

**Ce travail est soutenu financièrement par la Région Picardie
et le Fond Social Européen.**



Remerciements

Je souhaiterais remercier toutes les personnes qui ont participé et soutenu ce travail.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse Eric LECLERC, chargé de recherche au CNRS qui m'a encadré durant ces 3 ans de thèse. Son accompagnement et son intérêt pour mon travail m'ont permis d'avancer sur mon sujet tout en conservant une vision globale du projet. Il a su me former et me laisser une certaine autonomie pour explorer diverses voies et faire ma propre expérience. Je suis reconnaissant de son écoute, de sa compréhension et de la confiance qu'il m'a accordée.

Merci à Cécile LEGALLAIS, directeur de recherche au CNRS et responsable de notre équipe sans qui toute cette « aventure » n'aurait pu avoir lieu. Elle m'a permis d'intégrer ce laboratoire et m'a donné l'opportunité de réaliser ce travail de recherche dans un domaine passionnant.

Je tiens également à remercier M. Fabrice MOREL chargé de recherche INSERM et M. Vincent SENEZ directeur de recherche au CNRS, pour leur implication et leur évaluation de ce rapport. Je souhaite exprimer ma reconnaissance à MME le Professeur Dominique BARTHES-BIESEL pour sa participation en tant que présidente du jury. Merci à MME Céline BROCHOT, ingénieur de recherche INERIS, pour sa présence en tant qu'examineur.

Merci à Patrick PAULLIER pour ses conseils et sa gentillesse. Toujours présent au sein du groupe, il garde fermement soudé les liens de cette équipe.

Une pensée toute particulière à Liliane PETITJEAN pour son aide précieuse.

A mes camarades étudiants : Aude GAUTIER qui a arrêté de téléphoner !!! ; Jean-Matthieu PROT avec qui nous partageons et partagerons encore ... ; Zaher KARBOUTLY pour ses mézzés libanais et ses conseils. ; Benoit CARPENTIER pour son soutien. ; Silvia PERRONE avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.

A mes collègues de l'équipe Biomatériaux : Murielle VEYSSADE, Murielle DUFRESNE, Pascale VIGNERON, Elodie VELZENBERGER, Oumou GOUNDIAM et Jean-Luc DUVAL pour leur convivialité.

A mes parents et mes grands-parents qui m'ont soutenu durant toutes ces années.

Je souhaiterais dédier ce travail à ma femme Ysabelle et ma fille Alia. Merci d'être à mes côtés ...

Table des matières

CHAPITRE I : INTRODUCTION	p14
1. Contexte socio-économique	p14
2. Objectifs de la thèse.....	p16
CHAPITRE II : BIBLIOGRAPHIE.....	p17
1. La toxicité et pharmacocinétique.....	p17
1.1 Généralité.....	p17
1.2 Les différentes voies d'absorption, distribution, métabolisme et excrétion (A.D.M.E)...	p17
1.2.1 <i>L'absorption.....</i>	<i>p17</i>
1.2.1.a) <i>Les barrières tissulaires.....</i>	<i>p19</i>
1.2.1.b) <i>L'absorption cellulaire.....</i>	<i>p20</i>
1.2.2 <i>La distribution.....</i>	<i>p22</i>
1.2.3 <i>Le métabolisme.....</i>	<i>p23</i>
1.2.4 <i>L'excrétion.....</i>	<i>p28</i>
1.3 Modélisation de l'A.D.M.E	p32
1.3.1 <i>Les modèles in vivo et ex-vivo.....</i>	<i>p32</i>
1.3.2 <i>Les modèles in vitro.....</i>	<i>p34</i>
1.3.3 <i>Les modèles in silico.....</i>	<i>p37</i>
2. Ingénierie des systèmes de cultures cellulaires <i>in vitro</i>.....	p39
2.1 La matrice extracellulaire	p39
2.2 La coculture.....	p41
2.3 Les bioréacteurs.....	p44
3. Les nouveaux modèles cellulaires <i>in vitro</i> liés aux microtechnologies.....	p46
3.1 La microfluidique.....	p46
3.1.1 <i>Phénomène de transport.....</i>	<i>p47</i>
3.1.2 <i>Stimulation mécanique.....</i>	<i>p48</i>
3.2 Science des matériaux/biomatériaux et microfabrication.....	p49
3.2.1 <i>Topographie de surface.....</i>	<i>p49</i>
3.2.2 <i>La microfabrication et biomatériaux.....</i>	<i>p50</i>
3.3 Ingénierie tissulaire et microtechnologie.....	p52

3.3.1	Contrôle de l'adhésion et de l'arrangement cellulaire sur une surface.....	p53
3.3.2	Contrôle de l'adhésion et de l'arrangement cellulaire en biopuce.....	p53
3.3.2.a)	Dépôt statique de protéines.....	p53
3.3.2.b)	Dépôt et arrangement cellulaire utilisant la dynamique	p54
3.3.2.c)	Arrangement cellulaire par contrôle externe.....	p56
3.4	Les biopuces.....	p58
3.4.1	Vers de nouveaux outils de screening.....	p58
3.4.2	Vers de nouveaux bioréacteurs.....	p61
4.	Conclusion et introduction du sujet.....	p61

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES.....p67

1.	Microfabrication de la biopuce.....	p67
1.1	Le Poly-diméthylsiloxane.....	p67
1.2	Procédé de fabrication du moule.....	p67
1.3	Description et assemblage de la biopuce.....	p69
2.	Culture cellulaire.....	p72
2.1	Choix des cellules.....	p72
2.2	La lignée HepG2/C3A.....	p72
2.3	La lignée MDCK.....	p72
2.4	Entretien des lignées cellulaires.....	p73
2.5	Milieu de culture enrichi en chlorure d'ammonium (NH ₄ Cl).....	p73
2.6	Culture cellulaire en puits.....	p74
3.	Culture cellulaire en biopuce.....	p75
3.1	Organisation temporelle de l'expérimentation.....	p75
3.2	Préparation de la biopuce.....	p75
3.3	Culture en condition statique.....	p78
3.4	Culture en condition dynamique.....	p78
3.5	Prélèvement et changement de milieu 24 heures après le début de l'expérience (J ₂).....	p79
3.6	Arrêt des expériences après 96 heures de cultures (J ₄).....	p79

4. Analyses	p80
4.1 Viabilité cellulaire.....	p80
4.2 Calculs des consommations et productions cellulaires.....	p82
4.3 Dosage de l'ammoniac.....	p82
4.4 Dosage du glucose.....	p83
4.5 Dosage de l'albumine.....	p83
4.6 Dosage de la glutamine.....	p84
4.7 Quantification de l'activité des CYP 1A2.....	p84
5. Choix de la représentation graphique et du test statistique.....	p85
5.1 Choix de la représentation graphique.....	p85
5.2 Choix du test statistique.....	p86
CHAPITRE IV : RESULTATS	p87
1. Résultats des tests préliminaires réalisés sur les C3A.....	p87
1.1 Test de revêtement de fibronectine avec les cellules C3A.....	p87
1.2 Test de culture cellulaire C3A en présence de NH ₄ Cl.....	p90
1.3 Conclusion des tests préliminaires réalisés sur les C3A.....	p91
2. Caractérisation de la biopuce avec les cellules C3A.....	p93
2.1 Morphologies et proliférations cellulaires en biopuce.....	p94
2.2 Comparaison entre la culture en biopuce et la culture en puits.....	p94
2.2.1 Prolifération des C3A.....	p94
2.2.2 Consommations cellulaires.....	p96
2.2.3 Productions cellulaires.....	p96
2.2.4 Activité des cytochromes P450 1A2.....	p96
2.2.5 Conclusion.....	p97
2.3 Influence du débit et de la densité initiale de cellulesensemencées	p97
2.3.1 Prolifération en milieu de culture standard.....	p97
2.3.1.a) Effet du débit.....	p98
2.3.1.b) Effet de la densité.....	p98
2.3.2 Relargage de la LDH en milieu de culture standard.....	p99
2.3.2.a) Effet du débit.....	p99
2.3.2.b) Effet de la densité	p100
2.3.3 Consommations cellulaires en milieu de culture standard.....	p101

2.3.3.a) Effet du débit.....	p101
2.3.3.b) Effet de la densité.....	p101
2.3.4 Productions cellulaires en milieu de culture standard.....	p103
2.3.4.a) Effet du débit.....	p103
2.3.4.b) Effet de la densité.....	p103
2.3.5 Activité des Cytochromes P450 1A2 en milieu de culture standard.....	p105
2.3.5.a) Effet du débit.....	p106
2.3.5.b) Effet de la densité.....	p106
2.3.6 Conclusions sur la culture de C3A en biopuce et milieu de culture standard.....	p106
3. Biopuce et C3A sous chargements de NH₄Cl.....	p108
3.1 Morphologie cellulaire en présence de NH ₄ Cl.....	p108
3.2 Prolifération cellulaire.....	p112
3.2.1 Effet du NH ₄ Cl sur la prolifération cellulaire.....	p112
3.2.2 Conclusion sur la prolifération cellulaire en présence de NH ₄ Cl.....	p114
3.3 Lyse cellulaire par la LDH.....	p114
3.3.1 Effet du NH ₄ Cl sur la lyse cellulaire.....	p114
3.3.2 Conclusion sur le relargage de la LDH en présence de NH ₄ Cl.....	p114
3.4 Consommation de glucose.....	p116
3.4.1 Effet du NH ₄ Cl sur la consommation de glucose.....	p116
3.4.2 Conclusion sur la consommation de glucose en présence de NH ₄ Cl.....	p118
3.5 Consommation de la glutamine.....	p118
3.5.1 Consommation de la glutamine en présence de NH ₄ Cl.....	p118
3.5.2 Conclusion sur la consommation de glutamine en présence de NH ₄ Cl.....	p119
3.6 Bilan de la consommation énergétique en présence de NH ₄ Cl.....	p199
3.7 Production d'ammoniac.....	p121
3.7.1 Effet du NH ₄ Cl sur la production d'ammoniac.....	p121
3.7.2 Conclusion sur la production d'ammoniac en présence de NH ₄ Cl.....	p122
3.8 Synthèse d'albumine.....	p122
3.8.1 Effet du NH ₄ Cl sur la synthèse d'albumine.....	p122
3.8.2 Conclusion sur la production d'albumine en présence de NH ₄ Cl.....	p124
3.9 Activité des CYP 1A2.....	p124
3.9.1 Effet du NH ₄ Cl sur l'activité des cytochromes P450 1A2.....	p124
3.9.2 Conclusion sur l'activité des CYP 1A2 en présence de NH ₄ Cl.....	p127
3.10 Conclusions pour la culture en biopuce des C3A avec le NH ₄ Cl.....	p128

4. Résultats des tests préliminaires réalisés sur les MDCK.....	p130
4.1 Test de revêtement de fibronectine avec les cellules MDCK.....	p130
4.2 Test de culture cellulaire MDCK en présence de NH ₄ Cl.....	p132
4.3 Conclusions des tests préliminaires réalisés avec les MDCK.....	p132
5. Caractérisation de la biopuce avec les cellules MDCK.....	p136
5.1 Morphologies et proliférations cellulaires en biopuce.....	p136
5.2 Consommations cellulaires de glucose.....	p137
5.3 Production d'ammoniac.....	p139
5.4 Conclusions sur la culture de MDCK en biopuce.....	p139
6. Biopuce et MDCK sous chargement de NH₄Cl.....	p141
6.1 Morphologies et proliférations en présence de NH ₄ Cl.....	p141
6.2 Consommation de glucose en présence de NH ₄ Cl	p143
6.3 Production d'ammoniac en présence de NH ₄ Cl	p143
6.4 Conclusions sur la culture de MDCK en biopuce chargée de NH ₄ Cl	p145
CHAPITRE V : DISCUSSION.....	p146
1. Microfabrication des biopuces.....	p146
2. Design de la biopuce.....	p146
3. Choix des cellules.....	p148
4. Caractérisation de l'évaporation en biopuce.....	p149
5. Caractérisation de la diffusion du NH₃ en biopuce.....	p150
6. Modélisation des paramètres d'ADME en biopuce.....	p150
7. Adhésion cellulaire en biopuce.....	p152
8. Ensemencement des cellules en biopuce.....	p153
9. Effet de la densité cellulaire d'ensemencement.....	p154
10. Phénomène de transport.....	p155
10.1 Cultures statiques.....	p155
10.2 Cultures dynamiques.....	p156
11. Apport d'oxygène dans la biopuce.....	p158
12. Effet du NH₄Cl.....	p159
13. Synthèses d'albumine et ammoniac.....	p160

14. Activité du CYP 1A2.....	p161
15. Comparaison de la biopuce avec les systèmes présentés dans la littérature.....	p162
CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	p165

Table des Figures

CHAPITRE I : INTRODUCTION

CHAPITRE II : BIBLIOGRAPHIE

Figure 1 : Représentation graphique des principales voies d'absorption, distribution, métabolisme et élimination.

Figure 2 : Taux plasmatique de cocaïne (ng/ml) à différents temps après absorption.

Figure 3 : Fonctions métaboliques des différentes familles de Cytochromes P450 chez l'Homme.

Figure 4 : Représentation graphique de la structure du lobule hépatique.

Figure 5 : Représentation graphique de la recirculation entéro-hépatique.

Figure 6 : Représentation graphique d'un rein et d'un néphron situé dans les zones corticale et médullaire.

Figure 7 : Principe de conception d'un animal transgénique et visualisation de l'expression d'un gène humain du CYP 1A1 par GFP chez une souris génétiquement modifiée.

Figure 8 : Représentation graphique d'un modèle PBPK pour une substance inhalée.

Figure 9 : Visualisation de l'espace de Disse par immunomarquage à l'or colloïdale du collagène IV contenu dans la matrice basale.

Figure 10 : Représentation des différentes techniques de coculture et de l'effet associé sur la synthèse d'albumine et l'activité de dééthylation de l'ethoxycoumarine.

Figure 11 : Schéma de systèmes perfusés modélisant les phases ADME de substances et métabolites dans différents compartiments cellulaires.

Figure 12 : Visualisation de l'écoulement laminaire dans un canal et module de dilution.

Figure 13 : Représentation du gradient d'oxygène dans une biopuce et activité des CYP 3A4 associée au positionnement des hépatocytes.

Figure 14 : Représentation graphique du profil de vitesse dans un bioréacteur plat microstructuré.

Figure 15 : Photos de cellules musculaires de cordon ombilical sur des topographies microstructurées.

Figure 16 : Photos de biomatériaux transparents microfabriqués et électrodes intégrées

Figure 17 : Principe de dépôt de matrice extracellulaire par tampon de PDMS et exemple de culture d'hépatocytes et de fibroblastes.

Figure 18 : Dépôt de matrice et encapsulation de cellules dans un réseau micro-fluidique avec synthèse d'albumine.

Figure 19 : Modélisation du gradient protéique de la crypte intestinale par module de dilution.

Figure 20 : Positionnement de cellules dans une biopuce par centrifugation-hydrodynamisme, compression et champ électromagnétique.

Figure 21 : Photo d'une biopuce multi-chambres pour le screening à haut débit et d'un laboratoire sur puce de purification d'ADN.

Figure 22 : Représentation et photo de la biopuce Human on Chip.

Figure 23 : Représentations d'un microréacteur hépatique en polycarbonate et d'un bioréacteur constitué de l'empilement de substrats microstructurés en verre.

Figure 24 : Photos du puits perforé permettant la culture d'hépatocytes à forte densité et de microstructures avant et après colonisation cellulaire.

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

Figure 25 : Procédé de fabrication de la biopuce.

Figure 26 : Représentation et dimensionnement des répliques et microstructures de la biopuce.

Figure 27 : Photos au microscope électronique à balayage de l'entrée de la chambre et des microstructures.

Figure 28 : Photos de la biopuce et des microstructures après assemblage

Figure 29 : Représentation graphique des étapes expérimentales réalisées pour la culture en biopuce.

Figure 30 : Schéma du circuit de perfusion.

Figure 31 : Courbes étalons de la LDH relarguée par les cellules MDCK et C3A après lyse cellulaire.

Figure 32 : Représentation de la dé-éthylation de l'éthoxyrésorufine (ERES) en résorufine et gammes associées.

CHAPITRE IV : RESULTATS

Figure 33 : Nombre de cellules C3A en plaque multi-puits pour différents revêtements surfacique.

Figure 34 : Photos de C3A cultivés en puits avec des revêtements de surface différents à 0 et 72 heures.

Figure 35 : Représentation graphique du nombre de cellules C3A pour différents chargements de chlorure d'ammonium.

Figure 36 : Cultures de cellules C3A en puits PDMS+FN sous différents chargements de chlorure d'ammonium.

Figure 37 : Photos réalisées au microscope optique de C3A en biopuce.

Figure 38 : Représentation graphique et tableau de valeurs associées de l'activité de consommation et de production des C3A pour différentes conditions de culture : plaque multi-puits recouverts de PDMS+FN et biopuce pour 0, 10 et 25 μ L/min.

Figure 39 : Représentation graphique de la prolifération cellulaire des C3A cultivés durant 72 heures en biopuces statiques et dynamiques.

Figure 40 : Représentation graphique de la lyse cellulaire par le relargage de la LDH dans le milieu de culture après 72 heures en biopuce.

Figure 41 : Représentations graphiques des consommations de glucose et de glutamine pour les C3A en biopuces statiques (0 μ L/min) et dynamiques (10 et 25 μ L/min).

Figure 42 : Représentations graphiques des productions cellulaires d'ammoniac et d'albumine par les cellules C3A cultivées durant 72 heures en biopuces statiques et dynamiques.

Figure 43 : Représentation graphique de l'activité des CYP450 en début et fin d'expérience.

Figure 44 : Photos de C3A en biopuces statiques et dynamiques après 72 heures de culture en présence de chlorure d'ammonium à 5 et 10mM.

Figure 45 : Graphiques représentant la prolifération des C3A à 0 μ L/min, 10 μ L/min et 25 μ L/min pour 3 densités cellulaires initiales en présence de chlorure d'ammonium.

Figure 46 : Représentation graphique du relargage de LDH par les C3A cultivés en biopuce après 72 heures.

Figure 47 : Représentation graphique des consommations de glucose par les C3A à 0, 10 et 25 μ L/min en présence de chlorure d'ammonium pour différentes densités.

Figure 48 : Représentations graphiques des consommations de glutamine par les C3A à 0, 10 et 25 μ L/min en présence de chlorure d'ammonium.

Figure 49 : Représentation graphique de la production d'ammoniac par les C3A à 0, 10 et 25 μ L/min en présence de 0, 5 et 10mM de chlorure d'ammonium.

Figure 50 : Représentation graphique de la synthèse d'albumine réalisée par les C3A en présence de chlorure d'ammonium à 0, 10 et 25 μ L/min.

Figure 51 : Représentation graphique de l'activité des Cytochrome P450 1A2 en présence de chlorure d'ammonium à 0, 10 et 25 μ L/min.

Figure 52 : Représentation graphique de l'activité des CYP 1A2 à 0, 10 et 25 μ L/min pour trois densités d'ensemencement initiales à 0,35 ; 0,45 et 0,65.10⁶ cellules/biopuce.

Figure 53 : Photos de cellules MDCK cultivés en puits avec des revêtements de surface différents à 0 et 72 heures.

Figure 54 : Nombre de cellules MDCK en plaque multi-puits pour différents revêtements surfaciques.

Figure 55 : Représentation graphique du nombre de cellules MDCK en fonction du temps en présence de chlorure d'ammonium.

Figure 56 : Photos de cellules MDCK en culture sur PDMS+FN avec et sans NH₄Cl.

Figure 57 : Photos réalisées au microscope optique de cellules MDCK en biopuce.

Figure 58 : Représentation graphique des proliférations, consommations de glucose et synthèses d'ammoniac par les MDCK en biopuces statiques et dynamiques.

Figure 59 : Photos des MDCK en biopuce avec ou sans NH₄Cl.

Figure 60 : Représentation graphique de la prolifération, consommation de glucose et production d'ammoniac des cellules MDCK cultivées en biopuce avec des chargements en chlorure d'ammonium.

CHAPITRE V : DISCUSSION

Figure 61 : Visualisation de la perfusion dans la partie supérieure de la biopuce et modifications de l'écoulement dans deux canaux adjacents lors d'un encombrement de cellules dans un microcanal.

Figure 62 : Cinétiques de chargement réalisables en Pétri et biopuce perfusée.

Figure 63 : Représentation graphique de l'adsorption de fibronectine (Fn) sur diverses surfaces et de l'adhésion cellulaire (MC3T3-E1) sur la fibronectine adsorbée.

Figure 64 : Sécrétion d'albumine par des C3A cultivés en éponges d'alginate

Liste des tableaux

Tableau 1 : Relation entre la concentration cellulaire inoculée et la quantité cellulaireensemencée dans la biopuce.

Tableau 2 : Valeurs des densités et du métabolisme des C3A aux débits de 0, 10 et 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ pour 3 densités d'ensemencement initial.

Tableau 3 : Valeurs des densités et du métabolisme des C3A aux débits de 0, 10 et 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ pour 3 densités d'ensemencement initial en présence de 5mM de chlorure d'ammonium.

Tableau 4 : Valeurs des densités et du métabolisme des C3A à des débits de 0, 10 et 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ pour 3 densités d'ensemencement initial en présence de 10mM de chlorure d'ammonium.

Tableau 5: Synthèse des tendances observées durant la culture des C3A en biopuces statiques et dynamiques avec ou sans NH_4Cl .

Tableau 6 : Valeurs des densités finales et du métabolisme des MDCK pour des débits de 0, 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ en milieu de culture standard.

Tableau 7 : Valeurs des densités finales et du métabolisme des MDCK pour des débits de 0, 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ en présence de NH_4Cl à 5 et 10 mM. La densité d'ensemencement initial est de $0,75 \cdot 10^6$ cellules/biopuce.

Tableau 8 : Synthèse des tendances observées durant la culture de MDCK en biopuces avec ou sans NH_4Cl .

Liste des abréviations

Par ordre d'apparition,

REACH : Registration, Evaluation and Autorisation of Chemicals

CEFIC : Conseil Européen des Fédérations des Industries Chimiques

ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion

3R : Réduire, Raffiner et Remplacer l'expérimentation animale

ECVAM : European Centre for the Validation of Alternative Methods

ESAC : European Scientific Advisory Committee

COLIPA : European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association

OCDE : Organisation de Cooperation et de Développement Economiques

C3A ou HepG2/C3A : Lignée cellulaire d'hépatome humain

MDCK : Lignée cellulaire rénale de chien – Madin Darby Canine Kidney cells

CYP450 : cytochromes P450 – Enzymes du métabolisme de phase I

ATP : Adénosine TriPhosphate

SNC : Système Nerveux Central

α 1-GPA : Alpha1-Glycoprotéine acide

RE : Réticulum Endoplasmique

O₂ : Dioxygène

NADP-réductase : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate-réductase

PXR : Pregnane X receptor

PPAR : Peroxisome Proliferator Activated Receptor

CAR : Constitutive Androstane Receptor

AhR : Aryl-Hydrocarbon Receptor

MDR : Multi Drug Resistance proteins

UGT : UDP-Glycosyl-Transférase

GST : Glutathion-S-Transférase

CO₂ : Dioxide de carbone

H₂CO₃ : Acide carbonique

HCO₃⁻ : Bicarbonate

HPO₄²⁻ : Phosphate mono-hydrogène

GFP : Green Fluorescent Protein

NAT : N-acétyl-transférase

DMSO : Dimethylsulfoxyde

QSAR : Quantitative Structure Activity Relationships

PBPK : Physiologically Based Pharmacokinetic

EGF : Epidermal Growth Factor

TCPS : Tissue Culture Polystyrene Surface

PIPAAm : Poly-N-IsoPropylAcryAmide

ECOD : 7-EthoxyCoumarin-O-de-ethylation

HUVS-112D : Human Umbilical Vein Smooth muscle cells

PC : PolyCarbonate

PS : Polystyrène

PDMS : PolyDiMéthylSiloxane

PMMA : PolyMethylMéthAcrylate

IA : IsobornylAcrylate

PI : PolyImide

PEG : PolyEthylèneGlycol

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

ITO : Oxyde d'Indium-étain

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

ARN : Acide RiboNucléique

PCR : Polymerase Chain Reaction

NH₄Cl : Chlorure d'Ammonium

TJ : Tight Junctions

MEM : Minimum Essential Medium

FN : Fibronectine

PBS : Phosphate Buffer Saline

EDTA : Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

LDH : Lactate DésHydrogénase

INT : 2-p-(Iodophényl)-3-(pnitrophényl)-5-phényltétrazolium chloride

DO : Densité Optique

NADH ou NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

GOD : Glucose oxydase

OPD : O-Phénylènediamine Dihydrochloride

EROD : Ethoxyrésorufine-O-dééthylase

ERES : Ethoxyrésorufine

KW : test statistique de Kruskal et Wallis

MC3T3 : Mouse Calvaria Preosteoblast - cellules préostéoblastiques de souris

Na⁺K⁺ ATPase : Transporteur actif membranaire de sodium/potassium

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1. Contexte socio-économique

Depuis 1981, l'industrie chimique constitue des fiches de sécurité destinées aux renseignements des substances et à leurs conditions optimales de manipulation. Sur 100 000 substances chimiques en circulation, 10 500 seulement sont répertoriées en toxicologie, écotoxicologie et physico-chimie. Les nombreuses substances non répertoriées représentent potentiellement un risque pour la santé et l'environnement.

En 2003, l'annonce de la mise en application européenne de la réglementation REACH (Registron, Evaluation and Autorisation of Chemicals) au 1^{er} juin 2007 a quelque peu bouleversé la communauté industrielle. Cette nouvelle directive requiert que les substances chimiques nouvelles ou déjà existantes soient maintenant enregistrées et testées pour prévenir d'un éventuel risque sur l'Homme, l'animal ou l'environnement. Le plan prévoit de tester en priorité 30 000 substances chimiques en circulation jusqu'à 2018. Cela nécessite un gros effort d'adaptation de la part de l'industrie chimique à qui revient cette tâche¹. Le Conseil Européen des Industries Chimiques (CEFIC) a alors montré que pour répondre à cette nouvelle législation, il serait nécessaire de développer de nouveaux outils de criblage, plus efficaces et plus rapides.

Traditionnellement, l'évaluation toxicologique d'une substance se fait par l'utilisation de plusieurs types de modèles expérimentaux. On distingue : les cultures de cellules (*in vitro*), les explants tissulaires (*ex vivo*) et l'animal (*in vivo*). L'apparition récente de la modélisation informatique (*in silico*) permet aujourd'hui de prédire les interactions biochimiques entre l'organisme et une substance chimique. Ces modèles contribuent également à l'identification de nouveaux candidats thérapeutiques dans l'industrie pharmaceutique. La mise en place de ces modèles a permis jusqu'à aujourd'hui d'identifier et de caractériser les paramètres physiologiques (Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion – A.D.M.E) qui interviennent dans le devenir d'une substance chimique au sein de l'organisme. Cependant, la mise en place de modèles expérimentaux est coûteuse et parfois longue, nécessitant une lourde phase de validation.

Bien que l'utilisation des modèles *in vitro* soit de plus en plus fréquente, un complément expérimental *in vivo* est souvent requis, nécessitant le sacrifice d'un nombre important d'animaux. Des pressions à la fois économiques et éthiques apparaissent au niveau international pour proposer des alternatives à l'expérimentation animale suivant la ligne directrice des 3R. Elaborée et revue en 1959 et 1995 par Russell et Burch, la règle des 3R pour « Réduire le nombre d'animaux utilisés, Raffiner les tests et Remplacer par des modèles non-animaux autant que possible » est progressivement adoptée².

L'ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods_ <http://ecvam.jrc.it>), créé depuis 1991 par la Commission Européenne, coordonne la mise en place de nouvelles méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Son comité scientifique ou ESAC (European Scientific Advisory Committee) est en charge de valider et de répertorier les nouveaux protocoles. Depuis une vingtaine d'années, les progrès en culture cellulaire et l'ingénierie tissulaire ont permis de développer des techniques *in vitro* régulièrement utilisées par l'industrie pharmaceutique, cosmétique (COLIPA : European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association) et par les laboratoires de recherche pour le pré-criblage d'agents actifs.

Ainsi, les modèles *in vitro* sont de plus en plus utilisés pour la recherche, le développement et/ou l'évaluation de la sécurité d'un cosmétique ou médicament. De nombreuses méthodes substitutives sont déjà reconnues au niveau européen et mondial par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) telles que le test d'Ames (TG471, B13/B14), les tests d'aberration chromosomique (TG473, B10) et de mutation génique (TG476, B17) sur cellules de mammifère ... Le développement en matière d'ingénierie tissulaire a permis très récemment de valider également un tissu bio-artificiel de peau permettant de remplacer le test d'irritation cutané de Draize (TG404) réalisé sur le lapin. Validée par l'ECVAM le 27 avril 2007, cette approche ouvre la voie vers de nouveaux modèles *in vitro* plus complexes.

L'apparition de nouvelles technologies issues de la microélectronique comme la microfabrication appliquée à la biologie permet de répondre aux besoins d'évolution des systèmes de culture *in vitro*. Tout d'abord, la miniaturisation permet de paralléliser plusieurs systèmes pour le criblage à haut débit³. Ensuite, le contrôle à l'échelle micrométrique des biomatériaux et de la fluidique offre des perspectives nouvelles dans la pertinence des modèles cellulaires mis en place. La maîtrise simultanée des paramètres cellulaires tels que l'arrangement et l'organisation en 3D, les cisaillements et phénomènes de transport dans des bioréacteurs appelés aussi puces à cellules ou biopuce, favorise la reconstruction et le maintien des caractéristiques tissulaires *in vitro*.

2. Objectifs de la thèse

Face aux limites éthiques et méthodologiques des études sur l'Homme et l'animal, il est nécessaire de développer de nouveaux outils alternatifs aux modèles *in vivo*. Nous proposons de mettre au point et de caractériser une nouvelle biopuce. Ce dispositif doit permettre la culture cellulaire et/ou tissulaire *in vitro*, dans un environnement proche des conditions dynamiques et physiologiques rencontrées dans l'organisme. A terme, le développement de cette biopuce doit offrir la possibilité de réaliser le criblage d'agents potentiellement toxiques, d'identifier des agents actifs d'intérêt thérapeutique et d'apporter de nouvelles données aux modèles de pharmacocinétique.

Dans la première partie du manuscrit, nous présenterons une étude bibliographique décrivant le devenir des substances dans l'organisme et les principes des modèles de toxicité cellulaire *in vitro* associés. Puis nous introduirons différents progrès technologiques liés à l'ingénierie tissulaire qui ont permis de faire évoluer la complexité de ces modèles. Enfin nous montrerons comment ces progrès peuvent se coupler avec les avancées dans le domaine des microtechnologies pour le développement des biopuces.

La seconde partie du manuscrit présentera la fabrication de la biopuce et de l'environnement microfluidique tridimensionnel associé. Puis nous introduirons les techniques de cultures et d'analyses utilisées dans nos travaux.

La troisième partie traitera des résultats obtenus sur une lignée cellulaire hépatique (C3A) et une lignée cellulaire rénale (MDCK). Les cultures seront soumises à différentes conditions dynamiques et chargements chimiques. La caractérisation du système biologique (biopuce et culture cellulaire) sera réalisée par le suivi de l'activité cellulaire en termes de proliférations, de productions et dégradations métaboliques spécifiques.

Enfin, nous discuterons nos résultats par rapport aux méthodes classiques de culture cellulaire *in vitro*. Cette discussion sera étendue à notre but de fournir un nouvel outil de criblage aux industriels et à la nécessité de réduction de l'expérimentation animale.

CHAPITRE II : BIBLIOGRAPHIE

1. Toxicité et pharmacocinétique

« Toute substance est un poison ... la dose adéquate fait la différence entre un poison et un remède. » Paracelse, (1493-1541)

1.1 Généralités

Lorsqu'un organisme humain est exposé à un produit chimique, différentes phases d'Absorption, de Distribution, de Métabolisme et d'Excrétion (A.D.M.E) se succèdent (figure 1). Les effets observables ainsi que les concentrations présentent dans les organes cibles sont alors dépendant de la dose administrée durant l'exposition. Deux grands domaines que sont la Toxicologie et la Pharmacologie s'intéressent particulièrement à ces 4 phases.

Le rôle de la toxicologie est d'étudier les effets que peuvent avoir certaines substances rencontrées dans les processus industriels, les additifs alimentaires, en agriculture ... afin de prévenir d'éventuels risques pour la santé de l'Homme. La pharmacologie quant à elle, a pour objectif de concevoir, développer et comprendre l'action de principes actifs sur l'organisme.

Ainsi, les substances toxiques et médicamenteuses répondent aux même types d'interactions avec l'organisme et leur devenir est lié au caractère « accidentel ou intentionnel » d'absorber la substance.

1.2 Les différentes voies d'absorption, distribution, métabolisme et excrétion (A.D.M.E)

1.2.1 L'absorption

C'est la voie que prend une substance pour pénétrer dans l'organisme et dans la circulation sanguine générale. Il est commun de classer les différents modes d'administration en deux voies : la voie entérale et la voie parentérale. La voie entérale passe par le tube digestif qui est constitué de la bouche, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle, du gros intestin et du rectum. L'absorption se fait théoriquement à tous les niveaux mais est principalement réalisée dans l'intestin grêle. Au niveau de cet organe, l'irrigation sanguine est importante (500 mL/minute) et la surface d'échange est la plus grande de tout le tube digestif (200 à 300 m²). Les nombreuses villosités⁴ présentes dans l'intestin grêle permettent l'absorption de la majorité des médicaments⁵. Le pH alcalin de 6-8 facilite la diffusion des bases faibles. L'absorption au niveau digestif est influencée par la vidange gastrique qui est elle-même en relation avec la mobilité du sujet et son alimentation⁴. C'est pourquoi il est souvent recommandé de prendre les médicaments entre les repas pour maximiser l'absorption intestinale. La particularité de l'absorption digestive est le métabolisme dit « de premier passage ». La substance,

absorbée au niveau du tube digestif, passe par le foie où elle est biotransformée en grande partie avant d'entrer dans la circulation générale de l'organisme (figure 1). Il apparaît également que l'intestin joue un rôle important dans le métabolisme de premier passage avec la présence d'enzymes tels que les cytochrome-P450 (CYP450) et des enzymes de conjugaison⁵. Cette biotransformation constitue une protection efficace de l'organisme face aux xénobiotiques (médicaments, substances chimiques ...) mais représente une barrière biochimique qu'il faut prévoir lors de la conception d'un médicament oral. On parle alors de Prodrogues^{6,7}.

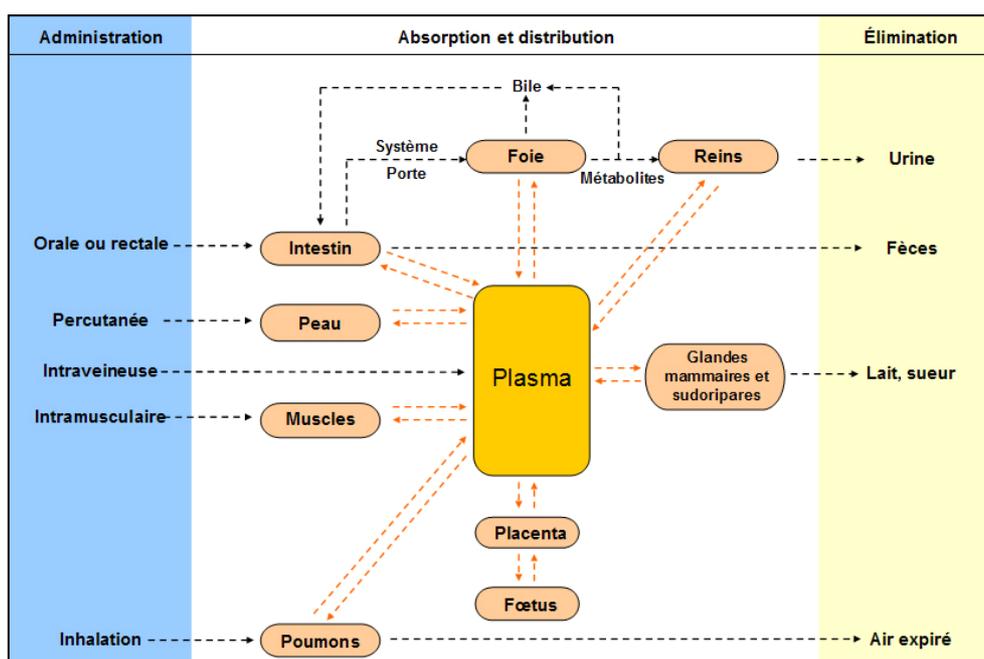


Figure 1 : Représentation graphique des principales voies d'absorption, distribution, métabolisme et élimination.

Le métabolisme n'est ici représenté qu'au niveau du foie pour plus de clarté (figure adaptée)⁷.

Afin de contourner le métabolisme de premier passage, certains médicaments sont administrés par voie parentérale. Il s'agit d'introduire une substance qui après absorption sera peu transformée et sera prise en charge directement par la circulation générale pour être distribuée aux organes d'intérêt. La voie parentérale se caractérise par un grand nombre de modes d'administration qui utilisent les muqueuses riches en vaisseaux sanguins⁸ (muqueuses buccale^{7,9-11}, rectale^{7,8,12-15}, nasale^{7,8,16}, pulmonaire⁷⁻⁹ et vaginale¹⁷⁻¹⁹), la diffusion à travers la peau^{7-9,20} et l'injection locale ou générale (intraveineuse) d'une substance dans l'organisme⁷.

Une fois que la substance est au contact de l'une des voies d'entrée, elle doit traverser différents compartiments. Ces compartiments sont généralement séparés par des barrières tissulaires de type épithélium ou endothélium vasculaire²¹.

1.2.1.a) Les barrières tissulaires

L'organisme est isolé de l'environnement extérieur et composé de plusieurs compartiments. Ceci est matérialisé par différentes barrières tissulaires que sont l'épithélium et l'endothélium²². L'épithélium et l'endothélium sont constitués de plusieurs types de cellules en contact les unes contre les autres. Certaines jonctions cellulaires (Gap junctions) forment des micro-pores et permettent une communication intercellulaire par le transfert d'ions ou de petites molécules²³. D'autres jonctions, dites serrées (tight junctions), forment un réseau complexe et une barrière plus ou moins perméable²⁴. Ce réseau relie les cytosquelettes^{24,25} entre eux, permettant ainsi des mouvements cellulaires collectifs²⁶. Les barrières ainsi formées n'ont pas l'unique rôle de séparer des compartiments, elles sécrètent et réabsorbent également des solutés d'un compartiment à l'autre pour créer des gradients de concentration²⁵.

De nombreux épithélium sont présents dans l'organisme tels que la peau²⁷, les muqueuses (buccale^{27,28}, vaginale¹⁷⁻¹⁹, rectale¹⁹ ...), le système respiratoire^{16,29-32}, l'intestin grêle^{19,33}, la vessie²⁵, les glandes mammaires³⁴... Les épithélium sont constitués de cellules polarisées qui présentent différentes zones spécialisées. On distingue : la zone apicale (munie de microvillosités, cils ou flagelles)²¹, la zone basale (connectée au tissu par une membrane riche en collagène IV, héparane-sulfate, laminine et fibronectine)²¹ et la zone latérale (maintenant la structure organisée de l'épithélium grâce aux jonctions cellulaires). Deux types de structures sont possibles : l'épithélium simple qui est une monocouche de cellules polarisées et l'épithélium stratifié qui présente un empilement de plusieurs couches cellulaires moins polarisées²². Pour chacune, il est possible de rencontrer différentes formes cellulaires : aplatie, cubique ou cylindrique. Ceci constitue une variété d'épithélium remplissant différentes fonctions dans l'organisme tels que la protection mécanique contre l'abrasion ou la friction (la peau, le pharynx, le mésothélium de la plèvre, le péritoine, le péricarde et les synoviales), la perte de fluide (la peau), l'invasion de substances ou organismes (la peau), l'échange d'ions et de métabolites (les muqueuses de l'estomac, l'intestin, les poumons et le tubule rénal), la sécrétion glandulaire (les glandes sudorales et mammaires et la thyroïde), la réception sensorielle^{7,21,21,25,33} ... Certains épithélium simples à cellules aplaties bordant la surface interne des vaisseaux sanguins et des capillaires lymphatiques sont plus communément appelés endothélium²¹.

Les vaisseaux sanguins ont des tailles différentes permettant d'acheminer l'oxygène, les nutriments, les sécrétions d'hormones, les médicaments ... dans tout l'organisme²¹. Ils sont tapissés, suivant les régions de l'organisme, par trois types d'endothélium : continus, fenêtrés et discontinus²¹.

Ces endothélium sont capables de réaliser avec les tissus des échanges de petites et grosses molécules très rapidement en fonction des modifications environnementales³⁵. La plupart des macromolécules passent dans les micro vaisseaux par diffusion³⁵. Il existe cependant des paramètres sélectifs tels que la taille et la charge des molécules en transit^{9,35}.

Lorsque la substance ne peut pas passer entre les cellules, elle doit alors traverser les membranes cellulaires. Constituée d'une bicouche lipidique et de protéines, cette enveloppe forme une barrière sélective contre toute invasion extérieure. Il existe cependant plusieurs types de transports cellulaires permettant à une molécule de transiter d'un compartiment à l'autre.

1.2.1.b) L'absorption cellulaire

Deux phénomènes entrent en jeu dans l'absorption cellulaire : le transfert passif et le transport actif.

Le transfert passif consiste en une diffusion simple, ou filtration osmotique dans lequel aucun apport d'énergie ou assistance cellulaire n'est nécessaire. Les molécules passent d'une région à forte concentration vers une région à faible concentration pour rétablir l'équilibre. Les substances à forte solubilité lipidique diffusent à travers la membrane de phospholipides avec facilité⁷. Les petites molécules hydrosolubles de 100 à 200 Daltons passent à travers les membranes par des pores de 4Å qui régulent le flux intracellulaire en H₂O. A l'exception des capillaires sanguins, généralement discontinus ou fenêtrés et des glomérules du rein qui offrent des tailles de pore de 40Å pour le passage de molécules de 50 kDaltons, les grosses molécules hydrosolubles doivent passer par la portion lipidique de la membrane, ce qui rend le transport de ces molécules difficile et lent. De grosses protéines trans-membranaires rentrent alors en jeu pour assurer et faciliter le passage.

On distingue trois grandes familles de transport actif: la diffusion facilitée, la diffusion active et l'endocytose. La diffusion facilitée est assurée par des transporteurs membranaires qui, par un changement de conformation et sans consommation d'énergie, font pénétrer de grosses molécules hydrosolubles dans la cellule^{7,9}. Le résultat global est quasiment identique à la diffusion passive, les molécules suivent un gradient de concentration.

La diffusion active permet aux substances qui ne peuvent pas utiliser les modes de diffusion précédemment cités ou qui doivent aller contre un gradient de concentration^{7,9}. Ce phénomène très présent dans des organes comme le foie, les reins et l'intestin^{7,36,37} utilise alors de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP)⁹. On le retrouve pour le fonctionnement des pompes sodium-potassium qui assurent la balance des électrolytes ou par exemple l'absorption de la thyroxine pour les traitements de l'hypothyroïdie⁹.

L'endocytose existe pour les très petites comme pour les grosses molécules, mais semble vraiment importante lors du transport de particules et macromolécules (1 kDaltons) comme les cytokines, les hormones, les facteurs de croissance et les immunoglobulines. Ce phénomène se produit en trois étapes : Après un contact entre le substrat et le récepteur membranaire, la membrane enveloppe ce complexe par invagination pour le faire pénétrer dans le cytoplasme sous forme de vésicule⁹. Les macromolécules sont ainsi détruites ou transportées à travers la cellule sans modifier l'équilibre du cytoplasme³⁵.

Ces modes de transport permettent ainsi de réaliser plus ou moins rapidement l'absorption de substances dans les tissus. Il est clairement établi aujourd'hui qu'il existe des différences d'absorption selon l'espèce, le sexe et l'individu modifiant parfois de manière importante la pharmacocinétique des substances^{36,37}. La vitesse d'absorption dépend également du type de barrière rencontrée (cellules stratifiées ou simples). De plus, le transport par diffusion est directement lié à la circulation locale. Certaines zones de la peau par exemple sont plus irriguées que d'autres permettant une meilleure absorption⁹. En effet, plus la circulation est élevée plus les gradients de concentration sont importants. En revanche, ceci n'est pas valable pour les transports actifs qui risquent de saturer à de fortes concentrations⁷. Il est même possible d'avoir une compétition inhibitrice d'un transport actif arrivant à saturation en présence de deux substances (co-exposition) de même nature. L'absorption du produit ne se fait alors plus de la même manière.

Tous ces paramètres d'absorption permettent d'expliquer les différents profils de biodisponibilité plasmatique observés pour un même produit en fonction des voies d'administrations. Par exemple, en intraveineuse, la biodisponibilité de la cocaïne est maximale et quasiment immédiate car aucune barrière n'est présente. La voie pulmonaire est également très rapide³⁸. Au contraire, par voie orale, il faut attendre plusieurs dizaines de minutes avant de déceler le passage de cette substance dans la circulation générale. Malgré une quantité plus importante administrée par voie orale, le maximum plasmatique atteint par cette voie est inférieur à celui de l'intraveineuse, caractéristique de l'effet du métabolisme de premier passage dans le foie (figure 2).

Cette première étape d'absorption est très importante car une fois dans la circulation générale, la substance est distribuée aux différents organes. La distribution se fait alors en fonction du profil de biodisponibilité.

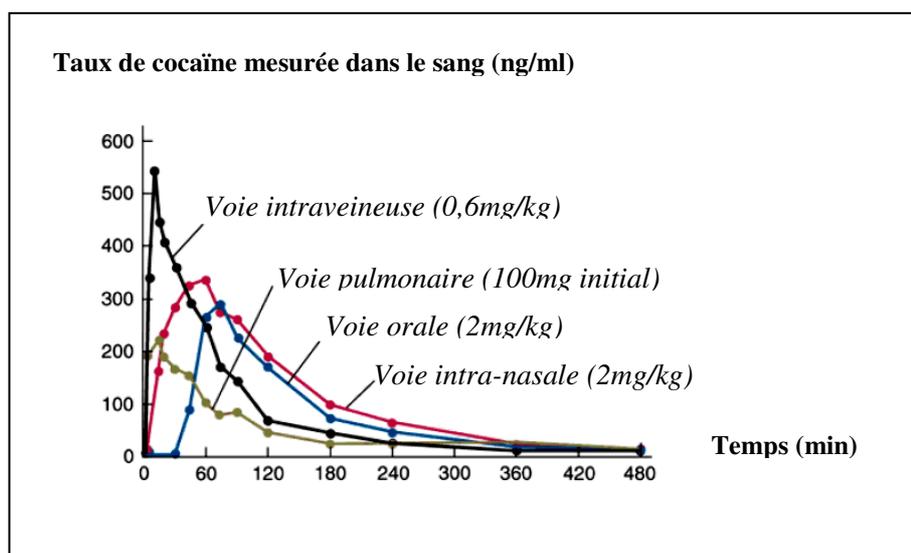


Figure 2 : Taux plasmatique de cocaïne (ng/ml) à différents temps après absorption (expérience réalisée sur 10 sujets)³⁸.

1.2.2 La distribution

La distribution est le processus par lequel une substance absorbée se déplace de son site d'absorption vers les autres parties de l'organisme que l'on ordonne traditionnellement en compartiments. Ces compartiments peuvent être classés en fonction de leur flux sanguin. Ainsi, on distingue le compartiment central dans lequel, les organes tels que le cœur, le foie, le cerveau et les reins reçoivent la plus grande partie d'une substance quelques minutes après son administration. Le compartiment périphérique est constitué du tissu adipeux, des muscles et de la peau. Ces organes sont moins bien perfusés et les substances mettent du temps avant de s'équilibrer. Le dernier compartiment regroupe le système nerveux central (SNC) et le liquide céphalorachidien qui, malgré une excellente irrigation, est protégé par une barrière très sélective.

Le flux sanguin n'est pas le seul paramètre entrant dans la distribution d'une substance. Dans la circulation générale, la substance se trouve sous deux formes : une fraction libre et une fraction liée aux protéines plasmatiques. Le plasma humain compte environ 60 protéines. Avec une concentration de $650\mu\text{M}$ (35mg/ml), l'albumine est majoritaire et est responsable de la plupart des liaisons avec les substances acides. Les substances basiques se lient préférentiellement à l' $\alpha 1$ -glycoprotéine-acide ($\alpha 1$ -GPA)^{6,7}. Seule la fraction libre peut pénétrer dans les cellules et est alors considérée comme active. La fraction liée est considérée comme un stock temporaire et peut être libérée rapidement afin de rétablir un équilibre de concentrations dans l'organisme⁶. Ce phénomène de liaison aux protéines plasmatiques

est non spécifique et compétitif. C'est à dire qu'une deuxième substance peut se lier aux protéines à la place de la première. La fraction libre de la première substance en circulation devient alors plus importante^{6,7,9}.

D'autres paramètres sont également à prendre en compte. L'état de santé^{7,39} (infections, rhumatismes, néphrites) et l'âge⁴⁰ sont des facteurs qui augmentent la concentration plasmatique de l' α 1-GPA et par conséquent la quantité de substance liée dans le plasma⁶. A contrario, la concentration d'albumine plasmatique peut descendre à des valeurs faibles (10mg/mL) lors d'un syndrome néphrétique (Amylose, Néphropathie diabétique, Lupus érythémateux disséminé, Purpura rhumatoïde, Glomérulonéphrite extra membranaire)⁶. Des changements structuraux modifiant les sites de liaison en présence de résidus ou des mutations génétiques peuvent également faire varier les taux de liaison⁶.

Il est également possible de retrouver une substance localement liée à des protéines cellulaires qui s'accumule dans le tissu⁷. Le tissu adipeux est un réservoir pour les médicaments lipidiques comme le thiopental, l'os est un réservoir potentiel d'agents toxiques tels que la tétracycline ou les métaux lourds⁷. D'autres substances peuvent également s'accumuler dans le fluide intercellulaire après avoir franchi une barrière épithéliale. Il est alors nécessaire de faciliter leur élimination de l'organisme. Des systèmes enzymatiques vont métaboliser ou convertir les substances en composés chimiques plus hydrophiles⁴¹.

1.2.3 Le métabolisme

Le métabolisme se décompose en deux phases : une phase I de fonctionnalisation faite de réactions d'oxydoréduction et d'hydrolyse et une phase II de conjugaison qui catalyse les réactions de transfert généralement après la phase de fonctionnalisation.

Le but du métabolisme de phase I est de faire apparaître sur les molécules des fonctions chimiques soit en créant une fonction, soit en modifiant une fonction existante. Cette phase I est assurée à 90% par des enzymes. On peut citer les amidases, les epoxide-hydrolases et les estérases qui catalysent les réactions d'hydrolyse ; les réductases catalysent les réactions de réduction ; les flavines mono oxygénases, les monoamines oxydases et les cytochromes P450 (CYP450) sont responsables de l'oxydation des substances. Les CYP450 sont les principales enzymes intervenant dans les réactions d'oxydation^{42,43}. Ils sont localisés sur les membranes des réticulum endoplasmiques (RE) ou des mitochondries des cellules⁴⁴. La fixation du CYP450 sur la membrane se fait par une région très riche en acides aminés hydrophobes⁴¹. Le rôle du CYP450 est de catalyser l'oxydation d'un atome de carbone ou d'azote d'une substance, grâce à une molécule de dioxygène (O₂) fixée par le fer hémique qu'il contient⁴¹. Les électrons nécessaires à la réaction sont apportés par la Nicotinamide

Adénine Dinucléotide Phosphate (NADP)-réductase ou la ferredoxine suivant que le CYP450 est situé dans le RE ou dans la mitochondrie⁴¹. Le produit d'oxydation est ensuite re-largué dans le cytoplasme avec une molécule d'eau. Disponibles dans tous les tissus, les CYP450 sont présents en grande quantité dans le foie, l'intestin, les poumons et la peau^{41,44}.

Les cytochromes P450 participent au métabolisme d'un grand nombre de substances chimiques avec des spécificités plus ou moins grandes. On retrouve en effet 57 formes différentes de CYP450 classés en 17 familles chez l'Homme^{41,44}. Les familles 1, 2 et 3 sont impliquées dans le métabolisme des médicaments et xénobiotiques alors que les autres présentent essentiellement des fonctions endogènes (figure 3)⁴⁴. L'une des caractéristiques de ces enzymes est leur faible expression basale qui peut être induite fortement en présence de substrats spécifiques⁴⁴. La modulation se fait sur les récepteurs nucléaires (PXR, PPAR, CAR, AhR) activés par des xénobiotiques⁴⁴⁻⁴⁷. Certains récepteurs modulent non seulement les facteurs transcriptionnels des CYP450 mais également les facteurs de certaines protéines de transport MDR (Multi Drug Resistance proteins)³⁷ et d'enzymes de phase II⁴¹.

La phase II du métabolisme a pour objectif de conjuguer certains métabolites de phase I qui ont été fonctionnalisés ou des fonctions déjà existantes avec des substrats très hydrophiles pour faciliter l'élimination dans l'organisme. Les principales enzymes de conjugaison participant à cette phase sont des transférases. On peut citer les UDP-glycosyl-transférases (UGT), les sulfotransférases, les méthyl-transférases, les N-acétyltransférases et les Glutathion-S-transférases (GST)⁴⁶.

Les UGT, localisées dans le RE sont les enzymes qui catalysent la glucuroconjugaison, la plus courante et la plus importante des formes de conjugaison^{42,48,49}. Elles sont classées en deux familles. Les UGT1 sont encodées par un gène complexe de 16 exons localisé sur le chromosome 2 tandis que les UGT2 sont encodés par des gènes indépendants du chromosome 4^{42,48,49}. Les UGT catalysent la réaction de glucuroconjugaison pour un grand nombre de groupements fonctionnels tels que -OH, -COOH, -CO, -NH₂, -SH et C-C⁴².

Les GST sont des enzymes cytosoliques dimériques. Elles représentent une famille importante d'iso-enzymes polymorphes classées en cinq sous unités chez les mammifères⁵⁰. Leur rôle est de catalyser la conjugaison du glutathion sur différents substrats électrophiles activés en phase I^{50,51}.

Ces systèmes enzymatiques sont présents dans de nombreux organes tels que le foie, le tube digestif, les poumons, le cerveau, la peau et les reins^{42,48,51}. Inductibles par différents substrats, ils présentent plus ou moins d'activité selon les espèces^{6,47,52,53}, les hormones sexuelles^{6,36} les individus et les maladies⁵⁴. Par exemple, l'adjonction de flavones stimule l'hydroxylation du benzo[a]pyrene dans des microsomes de lapins, hamsters ou humains alors qu'ils n'ont aucun effet sur l'activité des microsomes de rat et de cochon d'inde⁵⁵. L'activité des CYP3A4 est 1,4 fois plus élevée chez la

femme tandis que la glucoronoconjugaison du paracétamol est plus importante chez l'homme³⁶. Il est également reconnu qu'une grossesse peut accroître le métabolisme des CYP2D6⁵⁶.

Les cinétiques métaboliques peuvent également être différentes d'un individu à l'autre en raison de mutations génétiques. On rencontre en effet de nombreux polymorphismes des enzymes du métabolisme^{6,42,49,51,57} plus fréquents chez certains groupes ethniques. Ainsi, 5 à 10% de la population caucasienne métabolise mal les substrats du CYP2D6 pour seulement 1 à 2% de la population d'origine asiatique⁶. A l'inverse, les substrats du CYP2C19 sont mal métabolisés à 18-22% chez les Asiatiques pour seulement 2-6% pour les Caucasiens^{47,56,58}. Certains polymorphismes n'ont pas d'incidence clinique tandis que d'autres sont susceptibles de provoquer une pathologie ou une toxicité sévère^{43,51,57}. Un polymorphisme sur UGT1A1 qui conduit à un syndrome de Gilbert, peut par exemple produire un métabolite actif de l'anticancéreux irinotécan⁵⁹.

Cytochrome P450	Fonctions métaboliques
CYP1	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP2	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP3	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP4	Métabolisme des acides gras, eicosanoïdes, acide arachidonique et médicaments
CYP5	Thromboxane A2 synthase
CYP7	Synthèse des acides biliaires
CYP8	Synthèse des acides biliaires, prostacycline synthase
CYP11	Stéroïdogénèse
CYP17	Stéroïde 17-alpha hydroxylase
CYP19	Aromatase (synthèse des œstrogènes)
CYP21	Stéroïdogénèse, stéroïde 21-hydroxylase
CYP24	Dégradation de la vitamine D, vitamine D-24 hydroxylase
CYP26	Hydroxylation de l'acide rétinolique
CYP27	Synthèse des acides biliaires, hydroxylations de la vitamine D3
CYP39	7α-hydroxylation du 24S-hydroxycholestérol
CYP46	Cholestérol 24S-hydroxylase
CYP51	Lanostérol 14-alpha déméthylase (biosynthèse du cholestérol)

Figure 3 : Fonctions métaboliques des différentes familles de Cytochromes P450 (CYP450) chez l'Homme⁴¹.

Les fonctions métaboliques des xénobiotiques sont essentiellement assurées par les trois premières familles.

D'autres facteurs, cette fois environnementaux, rentrent également en interaction avec l'activité des enzymes du métabolisme. Ainsi, les habitudes de vie telles que les consommations de drogues, d'alcool ou de tabac sont inductrices ou inhibitrices de certains CYP450^{54,56,60}. L'alimentation est également un facteur du métabolisme puisque le jus de pamplemousse renferme de puissants inhibiteurs du CYP3A4 au niveau de la muqueuse intestinale^{56,61}, les légumes crucifères (chou de

Bruxelles, chou et chou-fleur) et les hydrocarbures présents dans les viandes grillées au charbon de bois peuvent induire le CYP1A2^{6,56}. L'interaction médicamenteuse est également un problème pour l'efficacité de certains médicaments. Dans le cas d'une co-administration de médicaments, il existe un risque d'interaction si deux substances utilisent la même voie enzymatique ou si l'une des deux affecte le métabolisme de l'autre^{54,56}. A l'inverse, une substance peut être métabolisée par des voies distinctes produisant des composés inactifs et parfois un composé actif. Celui-ci, ne pouvant être excrété, s'accumule dans les tissus et présente alors une toxicité sévère pour l'organisme^{6,48,51,62}.

Ces enzymes de phase I et II sont présentes dans de nombreux tissus et surtout dans le foie qui se révèle comme étant l'organe de la détoxification⁶³. Les hépatocytes constituent le type cellulaire le plus important du foie. Ces cellules très actives remplissent une gamme très large de fonctions²¹. On compte plus de 500 fonctions vitales identifiées dans le foie. Par exemple, les hépatocytes jouent un rôle majeur dans le métabolisme et le stockage des glucides, graisses et protéines²¹. Ils participent activement dans le métabolisme des acides aminés conduisant à la formation d'urée et synthétisent des protéines comme le fibrinogène, la prothrombine et l'albumine^{21,64,65}. Ces cellules, riches en systèmes enzymatiques de phase I et II assurent la biotransformation de nombreuses substances endogènes et exogènes^{21,64-66}.

L'unité structurale et fonctionnelle du foie est le lobule hépatique. De structure hexagonale, le lobule est traversé en son centre par une veine dirigée dans l'axe longitudinal²¹. Un espace interlobulaire, situé à chacun des 6 coins d'un lobule, présente une artère, une veine porte et un conduit biliaire (figure 4)²¹. La veine porte amène le sang riche en nutriments des viscères digestifs. La circulation sanguine se fait de la périphérie vers le centre du lobule tandis que la circulation biliaire se fait de l'intérieur vers l'extérieur²¹. Le tissu hépatique n'est donc pas irrigué de manière homogène, c'est la zonation. Trois zones dans lesquelles les hépatocytes ne remplissent pas tout à fait les mêmes fonctions sont définies⁶⁵. Ainsi, les hépatocytes proches de l'espace interlobulaire reçoivent un sang riche en oxygène et en nutriments contrairement aux cellules qui se situent dans la zone centrale du lobule⁶⁵. Il est alors rapporté que le glycogène et les protéines sont plutôt synthétisés en périphérie du lobule tandis que l'activité enzymatique des biotransformations se réalise au centre du lobule⁶⁵. Le noyau des hépatocytes est large, rond et occupe généralement le centre de la cellule. Il arrive que certaines cellules soient bi-nucléées^{21,66}. Le cytoplasme est riche en organelles. De larges réticulum endoplasmiques, mitochondries, complexes de Golgi ... reflètent une activité de synthèse intense^{21,65}. De nature épithéliale, les hépatocytes s'organisent en épithélium simple. Le domaine basal ou sinusoidal, est au contact de l'espace de Disse, une matrice riche en laminine, collagènes I, III et IV synthétisés par les cellules étoilées ou cellules de Ito⁶⁴. Cet espace relie l'hépatocyte au sinusoïde sanguin par lequel de nombreux échanges ont lieu⁶⁷. Les microvillosités, localisées sur la surface basale, augmentent le rendement de ces échanges²¹. Le sinusoïde abrite des macrophages résidents ou

cellules de Kupffer dont le rôle est d'épurer le sang des impuretés non arrêtées par la barrière intestinale et de moduler la réponse du foie à l'inflammation par la sécrétion de bio facteurs actifs⁶⁴.

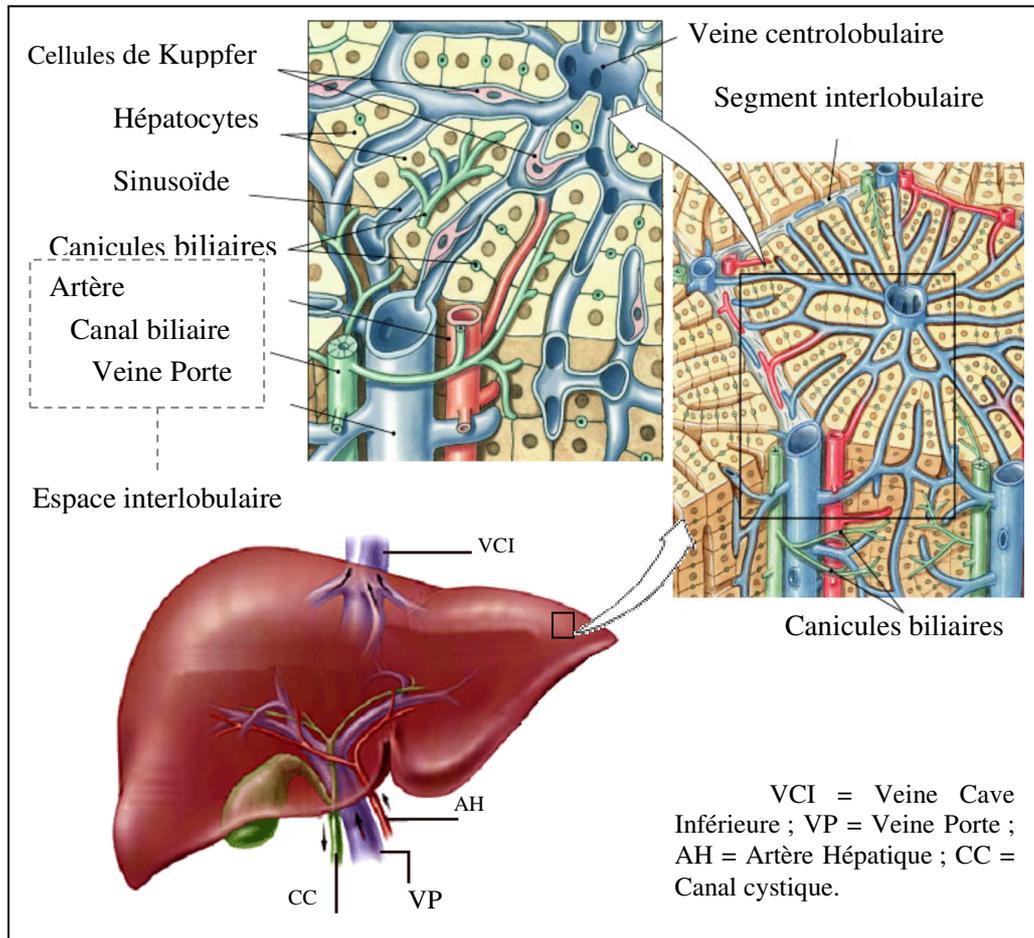


Figure 4 : Représentation graphique de la structure du lobule hépatique.

L'irrigation vasculaire est importante et se fait dans le sens opposé de la circulation biliaire (photos adaptées de <http://hopkins-gi.nts.jhu.edu> et *Human Anatomy Website, James W. Clack Indiana University - Purdue University* <http://iupucbio2.iupui.edu>)

1.2.4 L'excrétion

L'excrétion permet l'élimination des substances exogènes et endogènes de l'organisme. Les médicaments et leurs métabolites sont principalement excrétés par les reins, le tube digestif et les poumons⁶⁸. L'excrétion pulmonaire concerne principalement les substances volatiles (1.2.1.b)⁶⁸. D'autres voies d'élimination, telles que les glandes mammaires et la sudation participent de manière beaucoup plus marginale à cette phase⁶⁸. L'excrétion de la substance se fait soit sous forme inchangée, soit sous forme de métabolites ou encore sous les deux formes. On quantifie cette élimination par la clairance⁶⁹.

Les sécrétions digestives se font tout au long du tube digestif par la salive, le liquide gastrique, la bile et les sécrétions intestinales. Elles sont soumises à des réabsorptions successives avant d'être éliminées définitivement dans les selles. Le volume salivaire peut atteindre 1 à 2 litres par jour et permet d'éliminer notamment les substances liposolubles^{21,68}. Certains médicaments à propriétés atropiniques inhibent la sécrétion salivaire et perturbent ainsi l'élimination réalisée par cette voie. Les sécrétions au niveau gastrique sont essentiellement basiques du fait de l'environnement acide (pH=2) qui règne dans l'estomac.

Les sécrétions biliaires résultent de deux types de distribution : la réabsorption digestive (ou recirculation entéro-hépatique) et l'absorption parentérale qui déversent respectivement dans le foie la totalité ou une partie de la dose administrée. Après les biotransformations de phase I et II, les molécules, dont la polarité et le poids moléculaire ont augmenté, sont excrétées par les canicules biliaires des hépatocytes^{64,66,70}. Le domaine apical des hépatocytes, riche en microvillosités forme un réseau de canicules biliaires⁶⁴. Un canicule est formé par dépression de deux hépatocytes voisins réunis grâce à des jonctions de type « occluding junctions » qui empêchent le passage de la bile dans l'espace intercellulaire²¹. Comprise entre 0,5 et 1,5 μm , la lumière des canicules biliaires est constituée de membranes plasmiques hépatocytaires spécialisées, qui résistent à l'action détergente de la bile⁶⁶. L'hépatocyte sécrète les sels biliaires à partir du cholestérol. La bile ainsi formée est drainée en continu dans les voies biliaires intra et extra hépatiques pour être emmagasinée dans la vésicule biliaire^{64,66}. Une fois concentrée, la bile est excrétée dans le duodénum. L'excrétion biliaire varie suivant les espèces. La souris, le rat et le chien sont de bons excréteurs biliaires au contraire du lapin, du singe et de l'Homme⁶. La bile est ensuite déversée dans l'intestin par lequel certaines formes liposolubles sont réabsorbées pour être à nouveau retraitées dans le foie (figure 5)⁶⁸. Cette recirculation entéro-hépatique, permet de prolonger le temps d'activité d'un médicament⁷¹. L'intestin présente une surface d'absorption très importante (200m²) constituée principalement de muqueuses. L'épithélium qui borde la lumière de l'intestin est une population cellulaire hétérogène dont le

principal type est l'entérocyte²¹. Cette cellule cylindrique présente de nombreuses microvillosités recouvertes d'un gel glycoprotéique protecteur contre les agressions digestives des enzymes pancréatiques et des sels biliaires²¹. Les entérocytes ont pour rôle d'absorber l'eau, les peptides, les acides aminés, les sucres, les vitamines solubles et les lipides²¹. Au total, le volume absorbé par jour est de 6 à 7 litres²¹.

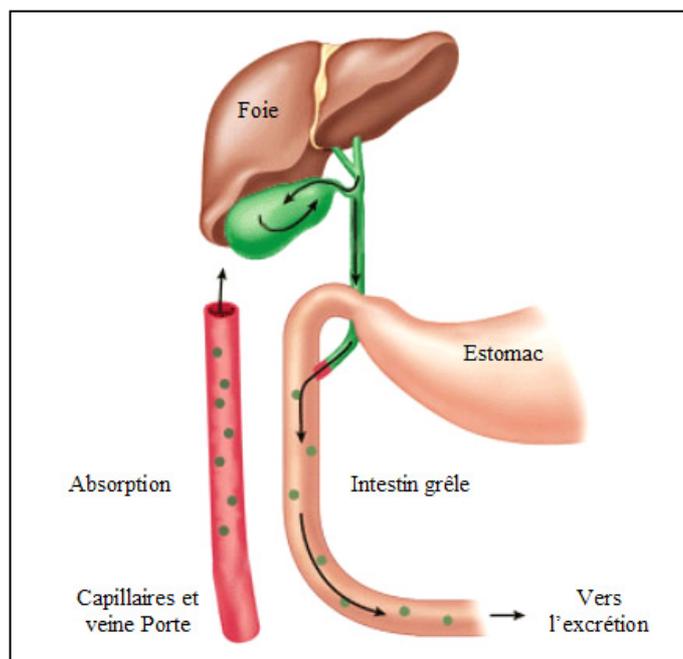


Figure 5 : Représentation graphique de la recirculation entéro-hépatique.

La bile contenant certains métabolites est déchargée dans l'intestin grêle. Elle est en partie réabsorbée par la muqueuse intestinale et retourne vers le foie par la circulation sanguine (photo adaptée)⁷¹.

Ce phénomène de réabsorption n'est pas unique dans l'organisme, il est également présent au niveau du rein (figure 6a), juste après la filtration glomérulaire. Le rein, organe majeur de l'élimination des médicaments et métabolites reçoit du cœur environ 1 L/minute de sang. Cette filtration se réalise à l'entrée du néphron, l'unité de base du rein, au niveau du glomérule. Le glomérule est constitué de capillaires sanguins et d'une capsule de Bowman, jouant le rôle d'interface de filtration entre le tubule et la circulation générale. Le long du tubule rénal, différentes substances endogènes telles que l'eau, le sodium, le potassium, le calcium, les bicarbonates, le chlore, le glucose et l'urée sont réabsorbés. L'excédant, les déchets ou les médicaments et métabolites sont concentrés en urine pour être finalement excrétés (figure 6b)⁶⁸. La part réabsorbée en 24 heures contient environ 180 litres d'eau pour une part excrétée de 1,5 litres, ce qui confère au rein des propriétés de concentration très importantes. Le liquide tubulaire est de plus en plus concentré au fur et à mesure que l'eau est

réabsorbée et cela dès le tubule proximal dans lequel 60 à 70% de l'eau retourne vers l'organisme. Pour une substance non réabsorbée, le filtrat initial de 125 ml/min est réduit à 44 ml/min correspondant environ à un triplement de la concentration. L'urée devient ainsi beaucoup plus concentrée dans le tubule que dans les capillaires péri tubulaires, et diffuse alors passivement du tubule vers le sang. Du fait de la faible perméabilité à l'urée de la paroi tubulaire, seulement 50% est réabsorbé de manière passive⁷². Le rein joue ainsi un important rôle dans la régulation du fluide extracellulaire en maintenant le volume, l'osmolalité et la concentration en potassium. Le maintien du pH plasmatique entre 7.38 et 7.42 est également une de ces fonctions. Ceci se traduit en permanence par un ajustement de l'excrétion acide générée par les processus métaboliques cellulaires. L'oxydation métabolique produit une large quantité de dioxyde de carbone (CO₂) qui participe, en présence de l'enzyme carbonique anhydrase, à la formation de l'acide carbonique (H₂CO₃) et du bicarbonate (HCO₃⁻) suivant la réaction :

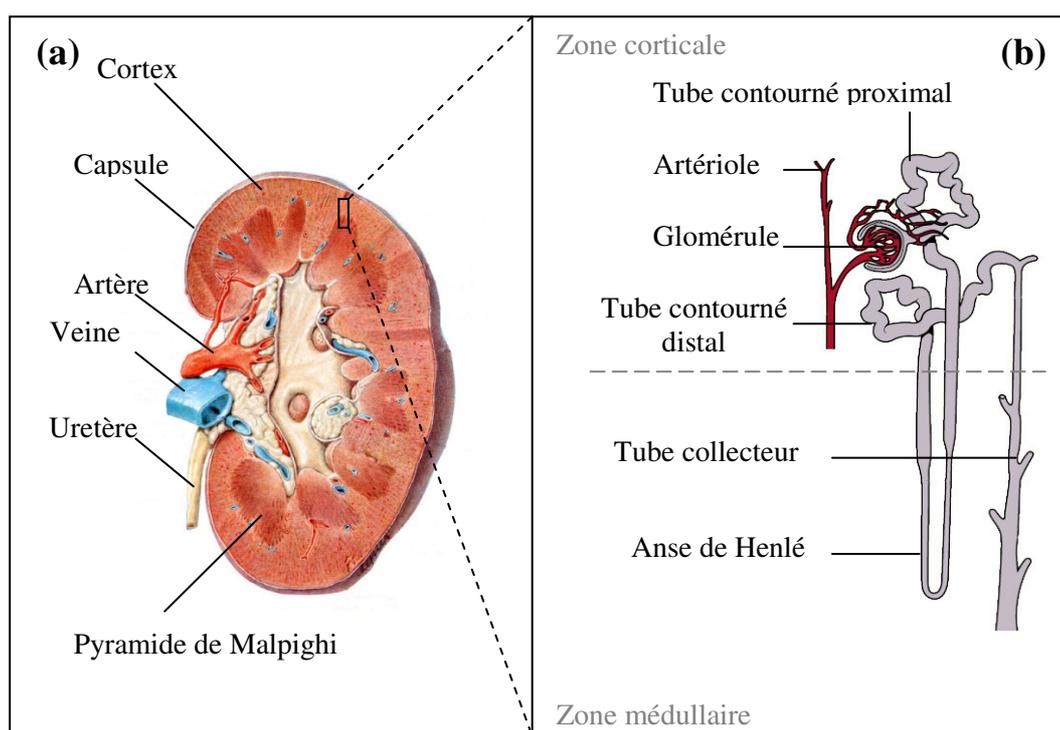


Figure 6 : Représentation graphique d'un rein et d'un néphron situé dans les zones corticale et médullaire.

Le sang provenant de l'artériole est filtré par le glomérule. Une partie du filtrat est réabsorbée dans un tube constitué du tubule proximal, de l'anse de Henlé et du tubule distal. La partie non réabsorbée est déversée dans le tube collecteur vers la vessie (photo adaptée)⁶⁸.

Dans l'organisme, le mécanisme de régulation du pH est essentiellement assuré par le couple tampon acide carbonique/bicarbonate. Le bicarbonate étant fortement concentré (24 mMol/L) dans le fluide extracellulaire, il est nécessaire d'assurer un contrôle strict des composants. Aussi, le CO₂ est pris en charge par les poumons. Le bicarbonate, quant à lui, est contrôlé par les reins. Il est principalement réabsorbé par le tubule proximal. Lors d'une acidose respiratoire ou métabolique chronique, le taux de bicarbonate réabsorbé augmente afin de prendre en charge les ions hydrogènes présents dans le fluide extracellulaire. Parallèlement, le rein évacue les ions H⁺. H⁺ est susceptible de se coupler avec des espèces chimiques filtrées tel que le phosphate mono-hydrogène (HPO₄²⁻) ou l'ammoniaque (NH₃) directement issue de la dégradation de la glutamine par les cellules du tubule proximal qui contiennent l'enzyme glutaminase.

Les paramètres d'A.D.M.E décrits ici se juxtaposent. Pour une substance donnée, dès qu'une fraction est absorbée, elle subit différentes phases telles que la distribution, le métabolisme et peut également être éliminée avant que toute la quantité administrée ne soit complètement absorbée. Ceci explique en partie la complexité de mise au point d'un médicament ou la prédiction de toxicité d'une substance sur l'organisme humain. La modélisation prend alors tout son sens. Un certain nombre de modèles *in vivo*, *in vitro* et *in silico* sont mis en place afin de réaliser un pré criblage ou un contrôle d'innocuité d'espèces chimiques. Ces modèles permettent par exemple aux industries pharmaceutiques d'écarter de leur circuit de développement ou de modifier les molécules qui ne répondent pas aux caractéristiques souhaitées⁷³. Ils permettent aussi de déterminer des quantités à risque en toxicologie.

1.3 Modélisation de l'A.D.M.E

1.3.1 Les modèles *in vivo* et *ex vivo*

L'expérimentation animale est le modèle d'étude physiologique présentant toute la complexité des voies métaboliques⁶³. Les modèles *in vivo* se déclinent en plusieurs familles : les vertébrés non mammifères (poissons, grenouilles), les mammifères non primates (souris, rats), les primates non humains (babouins). La toxicité est généralement surveillée sur deux espèces animales différentes avec un contrôle sur les changements cliniques, les paramètres sériques et histopathologiques⁷⁴. Du fait des différences entre espèces observées pour les phases d'A.D.M.E, les informations recueillies sur les modèles animaux sont limitées pour une application sur l'Homme^{54,56,75,76}. Afin de créer des modèles animaux plus proches de la réalité humaine, des animaux transgéniques sont étudiés. La manipulation génétique est réalisée par l'insertion ciblée d'un gène dans des cellules souches embryonnaires de souris qui sont reconnues pour leur stabilité⁷. Ces cellules souches modifiées sont ensuite introduites dans un blastocyte qui est implanté dans une souris en gestation (figure7a)⁷. Il est alors possible d'exprimer des gènes humains codant par exemple pour les différentes formes de CYP450⁷⁷⁻⁷⁹ et de les visualiser par introduction de gènes codant pour des protéines fluorescentes ou des enzymes bioluminescences telles que la GFP (figure7b)⁷⁷ ou la luciférase⁷⁹. Cela permet également de contrôler les réponses biologiques par inactivation, amplification ou mutation de gènes⁷. L'utilisation croissante de ces modèles en pharmacologie requière cependant de nombreuses validations préliminaires⁵⁶. Il arrive en effet parfois que les réponses attendues des modèles trans-géniques ne soient pas en accord avec l'existant chez l'Homme⁷.

D'autres études rapportent l'utilisation d'organes perfusés de rats ou malgré des difficultés d'approvisionnement, de tissus humains pour la compréhension du métabolisme, de l'élimination ou de l'absorption. Différents types de tissus comme les vaisseaux sanguins, les fibres cardiaques, les voies respiratoires, le cerveau, le muscle utérin, la muqueuse intestinale, la peau, le tissu adipeux, le foie, les reins ... sont alors utilisés. De nombreux tissus doivent alors être manipulés avec précaution pour éviter tout endommagement. Certains types de tests *ex vivo* requièrent des systèmes de perfusion complexes et coûteux telles que les chambres de Ussing, des capteurs de forces ultrasensibles (micro Newton) ... pour de petites séries d'échantillons qui nécessitent un complément expérimental *in vitro*^{75,80,81}.

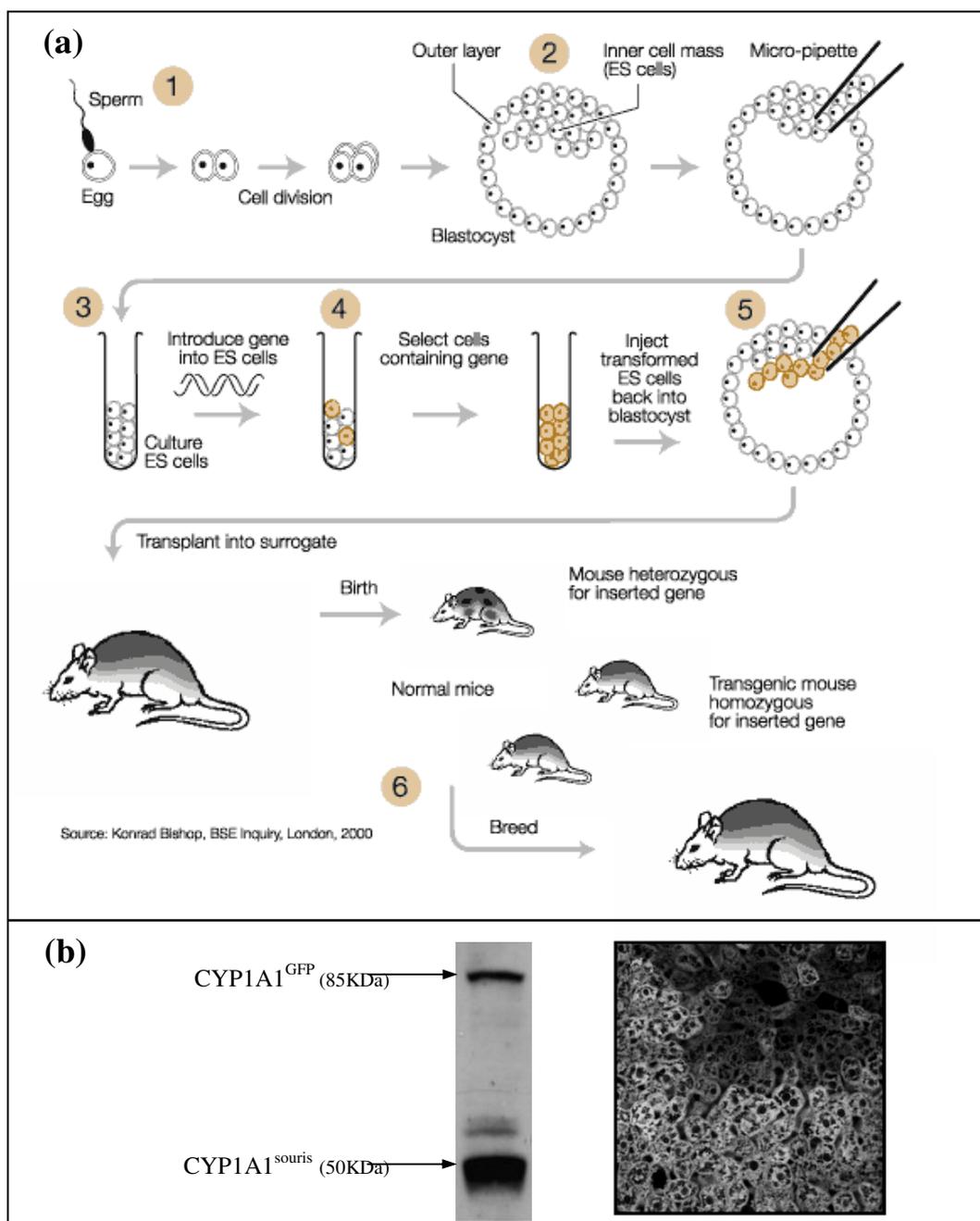


Figure 7 : Principe de conception d'un animal transgénique (a) et visualisation de l'expression d'un gène humain du CYP1A1 par GFP chez une souris génétiquement modifiée.

Après transfection du gène d'intérêt dans les cellules souches, celles-ci sont introduites dans un blastocyte d'une souris en gestation (a) (www.bseinquiry.gov.uk). Expression du CYP1A1 de souris (50KDa) et du CYP1A1 humain marqué à la GFP (85KDa) chez une souris transfectée. La localisation du CYP1A1 marqué à la GFP est visualisable par fluorescence sur des coupes de foie de la souris (photos adaptées)⁷⁷.

1.3.2 Les modèles *in vitro*

Le métabolisme est reconnu comme étant un facteur critique dans la mise au point d'une substance thérapeutique car il conduit à la détoxification et à l'excrétion, mais également à la bioactivation des substances⁸⁰. Il est essentiellement caractérisé par des tissus riches en enzymes du métabolisme provenant du foie et des hépatocytes^{63,82}. Cependant, d'autres types d'organes sont également utilisés pour observer le métabolisme non hépatique. De nombreuses études portent sur des modèles cellulaires animaux. Or l'extrapolation de l'animal à l'Homme reste délicate et il est parfois préférable d'utiliser du tissu humain issu de biopsies pour réaliser des tests⁸²⁻⁸⁴. La principale source de tissu hépatique humain consiste par exemple en une lobectomie ou une résection d'un fragment de foie lors d'une intervention chirurgicale pour raisons médicales (tumeur, métastases, adénome, angiome ...) ⁸⁴⁻⁸⁶.

Les fractions cellulaires tels que les microsomes et supersomes® (cellule d'insecte vectorisée par un baculovirus modifié pour exprimer des enzymes humaines du métabolisme) sont à l'heure actuelle très utilisées pour explorer les effets et la stabilité d'un nouveau médicament et obtenir des données préliminaires sur les voies métaboliques et interactions possibles avec d'autres substances^{63,80,83}. Elles présentent l'avantage de conserver certains systèmes enzymatiques de phase I et II pour ces préparations simples, reproductibles et de bonne conservation^{80,87,88}. Cependant, il est à noter que les enzymes de phase II solubles telles que les GST sont absentes. De plus, l'intégrité cellulaire perdue conduit à une décroissance rapide de l'activité enzymatique, qu'il est nécessaire de compenser par l'adjonction de co-facteurs^{63,80,87}.

Les études sur tranches d'organes bénéficient de progrès technologiques réalisés sur la mise au point de microtomes de précision, réalisant des découpes inférieures à 250µm⁸⁰. Les polarités cellulaires, les relations cellules-cellules ou cellule-matrice ainsi que les différents types de cellules sont conservés permettant l'observation des changements morphologiques au sein même du tissu⁸⁹. Appliqués sur de nombreux types d'organes tels que le foie, les reins, l'intestin et les poumons, ces systèmes permettent de réaliser des comparatifs métaboliques entre organes et espèces^{87,89}. La faible diffusion des nutriments et de l'oxygène dans le tissu limite cependant la conservation des coupes⁹⁰. Elles sont généralement stockées durant 48 heures, à 4°C, dans un soluté initialement mis au point pour la conservation d'organes prélevés avant transplantation^{80,89}. Devant la faible disponibilité de tissu humain^{63,75,84}, la congélation des échantillons semble être primordiale pour réaliser des études pharmacologiques à grande échelle. Malheureusement, la formation de cristaux de glace, la toxicité des cryoprotecteurs, les chocs thermiques et osmotiques restent des difficultés à surmonter pour

conserver à un niveau acceptable d'activité chaque type d'organe^{91,92}. Des études de protection des tissus par vitrification sont actuellement en cours⁹³.

La culture de cellule primaire conserve également l'intégrité de la membrane cellulaire avec notamment la présence des voies métaboliques et des transporteurs membranaires qui participent aux différentes phases d'ADME^{80,83,88}. L'isolation des hépatocytes pour les cultures primaires est une étape délicate basée sur la perfusion de collagénase initialement mise au point *in situ* sur des foies de rat⁸³. Aujourd'hui adaptées pour des explants humains, la qualité et la rapidité de la perfusion sont des paramètres importants afin d'isoler une population d'hépatocytes qui présente une bonne viabilité^{84,86}. Les cultures de cellules primaires sont très utilisées pour diverses applications de recherche en biotechnologies telles que l'ingénierie tissulaire et la pharmacologie. Elles contiennent en effet l'ensemble des systèmes enzymatiques et notamment ceux de phase I et II utiles pour l'étude du métabolisme⁵⁶. Mais leur extrême sensibilité aux facteurs environnementaux pose des problèmes de stabilité dans le temps^{83,94}.

En suspension, ces cultures présentent une limitation de quelques heures d'incubation⁸³ mais permet sur cette courte période de tester rapidement la stabilité métabolique et l'identification de la plupart des métabolites d'une substance. Pour augmenter les temps expérimentaux, il est préférable d'utiliser des systèmes favorisant l'adhésion cellulaire. Les cellules sont cultivées sur quelques jours. Cependant, il est reconnu que l'activité de certains CYP450 tels que 1A2 et 3A4 diminue de 50% par jour de culture⁸³. Cette décroissance d'activité est attribuée aux conditions de cultures tels que les facteurs solubles, la composition de la matrice extracellulaire et les interactions cellules/cellules⁹⁴. Il est également reconnu que certains types cellulaires fraîchement isolés comme les hépatocytes n'ont pas la possibilité de subir plusieurs passages (sous cultures) *in vitro*⁵⁶.

La congélation des hépatocytes humains permet de conserver les cellules durant plusieurs années avec une bonne viabilité (supérieure à 90%) ce qui rend possible l'organisation, la répétitivité des expérimentations et la commercialisation. Cependant, durant la congélation, l'activité de certaines enzymes semble être altérée ce qui peut accroître la sensibilité du système de culture et rend difficile la comparaison avec la situation physiologique^{83,95}.

Un autre modèle cellulaire plus stable dans le temps peut alors être utilisé. Il s'agit de lignées cellulaires commercialement disponibles. Ces cellules proviennent de tumeurs ou sont rendues immortelles par transfection d'un gène d'immortalisation⁹⁶. Les lignées cellulaires sont stables et prolifèrent théoriquement à l'infini tant que l'expérimentateur les entretient régulièrement. Par contre, il est également reconnu que ces lignées n'expriment qu'une partie, et en faible quantité, les enzymes du métabolisme des xéno-biotiques ce qui réduit leur application en pharmacologie^{96,97}. Cependant, les progrès en génie génétique permettent aujourd'hui d'introduire au sein de ces cellules les gènes codant pour différentes iso formes de CYP450, GST, N-acétyl-transférases (NAT). Les cellules utilisées sont

généralement dépourvues d'activité enzymatique des CYP450 mais doivent présenter entre autre, l'activité associée NADPH-CYP450 réductase⁹⁷. La lignée V79 (fibroblastes de poumon d'hamster chinois) exprime cette réductase ce qui explique son intensive utilisation⁹⁷ et commercialisation (www.genpharmtox.com). Ces systèmes cellulaires permettent de caractériser le comportement d'une seule enzyme isolée ou l'influence des polymorphismes sur différentes substances⁹⁸. Bien que l'introduction de plusieurs gènes codant soit réalisable⁹⁷, ce système reste avant tout un modèle complémentaire à l'arsenal des tests *in vitro* mis en place dans le criblage pharmacologique. La découverte de la lignée cellulaire HepaRG capable d'exprimer de nombreuses enzymes du métabolisme apporte aujourd'hui un modèle humain prometteur^{99,100}. Provenant d'un carcinome hépatocellulaire, cette lignée est capable de proliférer dans un premier temps puis de se différencier avec notamment l'introduction dans le milieu de culture d'un agent tel que le DMSO (diméthylsulfoxyde) à 2%. L'activité cellulaire reste stable durant 3 à 4 semaines et permet d'identifier les inducteurs et inhibiteurs de l'activité métabolique¹⁰⁰.

L'utilisation de cellules souches comme modèle cellulaire retient l'attention de nombreux groupes de recherche aussi bien au niveau de l'intérêt scientifique qu'au niveau de la controverse bioéthique déclenchée. Les cellules souches sont issues de différentes sources telles que l'embryon, le fœtus et son cordon ombilical ou l'individu né. Les cellules souches issues de ce dernier sont appelées cellules souches adultes et constituent pour l'instant une source d'approvisionnement sans réserve. Elles sont présentes dans pratiquement tout l'organisme (moelle osseuse, cerveau, foie, peau, tissu adipeux, muscles squelettiques et sang) et prolifèrent *in vitro*¹⁰¹. Les caractéristiques indifférenciées des cellules souches sont maintenues après de nombreux passages grâce à des conditions de culture particulières (sérum et densité cellulaire)¹⁰¹. Ceci permet, comme pour la culture de lignées cellulaires, une amplification du nombre de cellules avant différenciation et utilisation. Les cellules souches adultes étant multipotentes, elles sont déjà orientées vers le type de tissu auxquelles elles appartiennent. Cependant il est aujourd'hui démontré que dans des conditions précises *in vivo* ou de culture cellulaire, contrôlées par l'ajout de facteurs de croissances, elles ont la capacité de se différencier en d'autres types cellulaires. Aussi, des adipocytes montrent une capacité de différenciation en cellules osseuses ou nerveuses¹⁰², des cellules souches de moelle osseuse se différencient en cellules proches d'hépatocytes¹⁰³. La différenciation en hépatocytes n'est malheureusement pas complète, c'est à dire que toutes les caractéristiques attendues ne sont pas ou faiblement exprimées^{101,103}. Cependant, il peut être espéré que les progrès en génie cellulaire conduisent à l'utilisation de cette source pour réaliser des criblages pharmacologiques¹⁰⁴. De récentes études rapportent que des fibroblastes de souris retrouvent les caractéristiques pluripotentes des cellules souches embryonnaires grâce à la transfection de quatre gènes¹⁰⁵. Cette pluripotence permettant la différenciation en divers tissus pourrait apporter une réponse positive face aux problèmes éthiques rencontrés dans l'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines. En

attendant de transférer cette technique à l'Homme¹⁰⁵, le prélèvement, la collecte, la conservation, le transport et la manipulation de tissus humains sont soumis aux obligations réglementaires de bioéthique^{106,107}. A cela s'ajoutent des complications au niveau des coûts, du temps et de la logistique⁷⁴. Malgré l'apparition de quelques sociétés (www.celsis.com, www.iiam.org, www.biopredic.com, www.promocell.com, www.cascadebio.com, www.bdbiosciences.com) proposant la vente de cellules ou tissus humains, la mise en place de réseaux fournisseurs/utilisateurs semble difficile^{74,75}.

1.3.3 Les modèles *in silico*

Le début de la pharmacologie *in silico* peut être attribué vers les années 60 lorsque, grâce à des moyens informatiques, des relations moléculaires entre structures chimiques ont été établies. Ces relations appelées Q.S.A.R (Quantitative Structure-Activity Relationships) sont aujourd'hui indispensables dans le développement de nouvelles molécules. Durant près de 40 ans, de nombreuses relations ont été étudiées expérimentalement. Elles sont maintenant collectées dans des bases de données pour construire des modèles complexes permettant d'extrapoler des résultats biologiques sur de nouvelles entités chimiques sans expérimentation. La mise en place d'algorithmes fiables et la visualisation des résultats prédits restent très difficiles et font actuellement partie d'une recherche active dans le domaine de la pharmacologie⁷³. Parallèlement aux études Q.S.A.R, des modèles mathématiques ont été développés pour décrire la bio-distribution d'une substance à travers un organisme. Ces modèles physiologiques de pharmacocinétique ou P.B.P.K (Physiologically-Based Pharmacokinetic) rendent compte des phases d'A.D.M.E que subit une substance à travers les différents organes ou compartiments de l'organisme (figure 8)⁷⁴. Chaque compartiment est décrit par son volume, la concentration de la substance, le flux sanguin et un coefficient de partage qui correspond aux paramètres biochimiques de la substance étudiée. Le métabolisme de la substance est généralement décrit par les équations de type Michaelis-Menten, qui tiennent compte de la quantité d'enzymes présente dans l'organe ainsi que de l'affinité entre la substance et les enzymes. Les paramètres mathématiques du test P.B.P.K sont la dose, la concentration, et le temps d'exposition de la substance à étudier. D'autres paramètres traitant du sujet modélisé tels que l'âge, la taille, le poids ... peuvent également être pris en compte. L'intérêt de ces modèles réside dans la possibilité d'extrapoler les résultats en fonction des voies d'administration, des durées et des doses. Il est également possible de faire évoluer le modèle vers une espèce différente ou d'étudier des différences inter et intra-individu^{69,74}.

De nouvelles informations relatives à l'A.D.M.E sont incorporées en continu dans les bases de données des industries pharmaceutiques permettant ainsi d'enrichir les modèles. Il est cependant nécessaire de rester prudent quant au traitement et à l'analyse de ces données qui sont recueillies grâce

à des tests réalisés expérimentalement. Les conditions expérimentales et les modèles mathématiques diffèrent d'un laboratoire à l'autre, ce qui peut amener des dérives dans les résultats lorsque les données sont réutilisées de manière non appropriée^{73,81}. L'uniformisation des conditions expérimentales par l'utilisation de standards devrait permettre d'éliminer toutes erreurs liées aux conditions chirurgicales ou aux conditions de cryopréservations lors de l'utilisation de tissus humains pour la mise en place de ces modèles⁷⁴. Cette uniformisation devrait également permettre de meilleures comparaisons et complémentarités entre laboratoires^{74,81}. Ceci reste cependant très difficile à réaliser devant la quantité de modèles *in vivo* et *in vitro* existants et à venir. Il existe en effet de nombreux modèles animaux et cellulaires bénéficiant chacun d'avantages et d'inconvénients différents qu'il est nécessaire d'identifier et de raffiner⁷⁴. A cela s'ajoutent les progrès technologiques en génie tissulaire qui permettent aujourd'hui de produire un nombre encore plus important de modèles et d'informations à implémenter dans les bases de données.

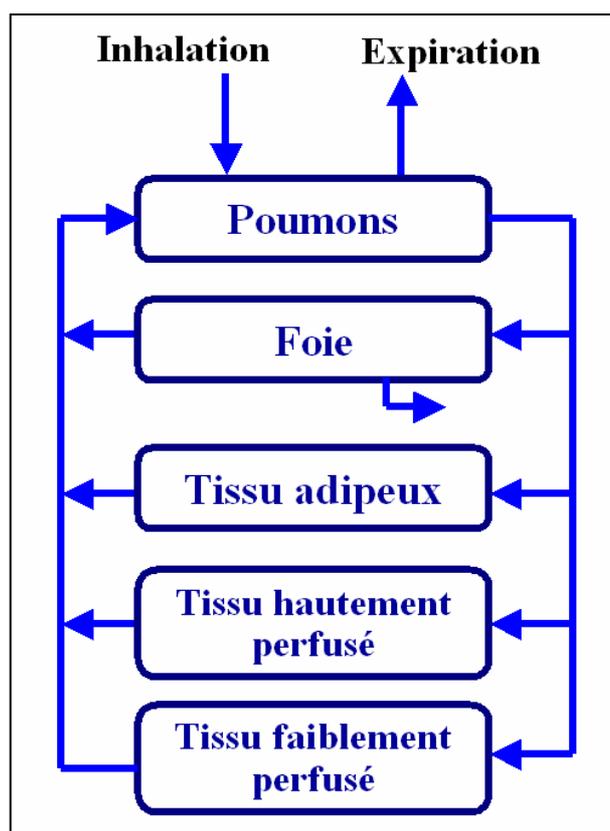


Figure 8 : Représentation graphique d'un modèle PBPK pour une substance inhalée.

2. Ingénierie des systèmes de cultures cellulaires *in vitro*

La problématique à l'utilisation *in vitro* de cellules et tissus humains ne s'arrête pas seulement à l'éthique et à la logistique. De nombreux scientifiques sont insatisfaits des résultats recueillis lors de tests réalisés sur les différents modèles cellulaires. L'une des principales causes de ces échecs vient probablement de la modification du phénotype constaté en système de culture *in vitro*¹⁰⁸. Le phénotype d'une cellule est intimement lié à l'environnement cellulaire. Les facteurs solubles du milieu sont très importants comme cela a été mentionné précédemment avec la différenciation des cellules souches. Un milieu de culture à faible concentration de calcium (0,09 mM), riche en acides aminés et EGF (Epidermal Growth Factor) favorise par exemple la prolifération et le maintien des fonctions hépatiques sur plusieurs semaines⁸². L'oxygénation de la culture cellulaire doit également être contrôlée comme cela a été vu avec la zonation du foie. Ceci implique que le milieu de culture soit en permanence renouvelé, identifiant la nécessité de mettre en place des cultures cellulaires en conditions dynamiques. Il apparaît également que d'autres facteurs environnementaux soient d'une grande importance : forme des cellules, matrice extracellulaire, contacts cellulaires homo/hétéro typiques, forces mécaniques (pression et cisaillement) et densité cellulaire¹⁰⁸. L'ingénierie tissulaire propose alors de nouveaux systèmes de culture pour contrôler ces paramètres environnementaux.

2.1 La matrice extracellulaire

Aujourd'hui la culture cellulaire se fait en boîte de polystyrène cristal ou TCPS (« Tissue Culture Polystyrène ») sur des surfaces de 10 à 500 cm² traitées spécialement pour faciliter l'adhésion et la prolifération des cellules. Au contact de ces surfaces, de nombreux modèles cellulaires atteignent la confluence formant une monocouche tandis que d'autres, comme les hépatocytes primaires vont avoir tendance à se détacher et rentrer en apoptose au bout de 24 heures. Cette cellule est considérée aujourd'hui comme l'une des plus difficiles à maintenir *in vitro*. Pourtant son utilisation semble primordiale dans la compréhension et dans la modélisation des phénomènes liés au métabolisme. C'est pourquoi, de nombreuses équipes d'ingénierie tissulaire ont caractérisé et mis en place des systèmes de culture cellulaire apportant un environnement plus approprié au maintien et au développement cellulaire.

In vivo, les cellules reposent sur une matrice extracellulaire structurée. Ce réseau tridimensionnel de macromolécules constitue un support pour l'adhésion, la migration et la survie cellulaire. Constituée principalement de polysaccharides (glycosamino/protéoglycanes), de collagènes,

d'élastine, de glycoprotéines d'adhérence (fibronectine, laminine, entactine), cette matrice est synthétisée par les cellules du tissu conjonctif et les cellules épithéliales¹⁰⁹. Par exemple, les hépatocytes reposent sur l'espace de Disse, une matrice riche en macromolécules extracellulaires de collagènes I, III, IV, laminine et fibronectine dont la composition exacte reste encore à déterminer (figure 9)¹¹⁰.



Figure 9 : Visualisation de l'espace de Disse par immunomarquage à l'or colloïdal du collagène IV contenu dans la matrice basale¹¹⁰.

Le collagène IV est marqué uniquement dans l'espace de Disse (flèches). En effet, on peut remarquer l'absence de marquage intracellulaire aussi bien dans la cellule endothéliale (E) que dans l'hépatocyte (H) (photo adaptée).

L'adhésion cellulaire est un paramètre important d'activation intracellulaire qui se fait par les hémidesmosomes et les intégrines de surface. Cette activation est déclenchée par des processus de transduction qui modulent la sensibilité aux facteurs solubles, régulent la prolifération, induisent certains gènes et contrôlent la forme cellulaire^{109,111}. Ainsi, une cellule cultivée sur un gel souple de matrice extra-cellulaire ne peut pas s'étaler, limite sa prolifération mais conserve ses fonctions spécifiques. Par contre, la même matrice étendue sur une boîte de culture rigide, induit un étalement et une prolifération qui s'accompagne d'une perte des fonctions¹¹¹. C'est pourquoi les matrices à base de gel de collagène de type I et de laminine (MatrigelTM) sont préférentiellement utilisées pour la culture

in vitro des hépatocytes^{83,83,96,96,112}. Placées entre deux couches de matrice ou « sandwich », les hépatocytes maintiennent leur forme tridimensionnelle cuboïdale, survivent durant plusieurs semaines et conservent leur activité à un niveau plus élevé^{86,90,113}. La seconde couche de matrice est généralement appliquée 24 heures après ensemencement des cellules⁸⁶. Une étude a cependant montré qu'il est préférable de déposer cette couche secondaire juste après inoculation des cellules pour leur permettre ainsi de reconstituer les connections cellule-cellule, cellule-matrice, et retrouver une polarisation le plus rapidement possible¹¹⁴.

L'utilisation de matrices commerciales n'est cependant pas optimum pour conserver en culture les fonctions cellulaires. *In vivo*, la matrice extracellulaire forme en effet un réseau complexe de protéines d'adhésion hautement organisées. Quelques études proposent alors d'utiliser de fines tranches histologiques de tissus ou des matrices pré synthétisées par des cellules avant d'ensemencer les cellules d'intérêt^{109,115,116}. Les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire sont donc importantes pour recréer un environnement cellulaire favorable au développement des cultures.

Le maintien des fonctions cellulaires spécifiques *in vitro* est également régulé par les interactions cellules-cellules. Les communications inter cellules sont en effet impliquées dans la prolifération, l'apoptose, le remodelage du cytosquelette, le contrôle de la stabilité tissulaire...²⁴. Ces phénomènes de régulation entre cellules sont montrés grâce à la coculture.

2.2 La coculture

Dans le foie, les cellules endothéliales, de Kupffer et de Ito sont identifiées comme étant des acteurs participant à la survie, à la différenciation et à la médiation de la toxicité^{90,117}. La coculture *in vitro* n'est pas une tâche facile car elle nécessite une matrice et un milieu de culture en adéquation avec chaque type de cellules. Il apparaît cependant que les travaux réalisés sur des cocultures présentent des résultats intéressants par le maintien des fonctions, des sécrétions de matrice et des morphologies cellulaires au regard de la mono-culture^{90,118}. Par exemple, la culture d'hépatocytes en présence de cellules hépatocytaires biliaires montre une survie cellulaire et une activité hépatique durant 2 mois *in vitro*^{119,120}.

Différents principes de cocultures ont été étudiés. Ils sont présentés en figure 10(a-g). Certains d'entre eux modélisent les échanges entre cellules (échanges paracrines) qui régulent l'activité cellulaire (figure 10a, b, f). Ces échanges jouent par exemple un rôle important lors d'infections ou de traumatismes du foie. Les cellules endothéliales, de Kupffer et de Ito contrôlent l'inflammation hépatique en sécrétant des molécules de signalisation ou proinflammatoires telles que les cytokines, l'oxyde nitrique ...etc¹¹⁷.

D'autres principes de coculture favorisent la modélisation des interactions cellulaires homotypiques et hétérotypiques de manière aléatoire (figure 10c) ou contrôlée (figure 10d). Le contrôle des types cellulaires est fait sur une surface ou en couches superposées. Pour cela, il est mis en place des traitements de surface particuliers. Par exemple, des cellules sont cultivées à 37°C sur un revêtement thermo répondant tel que le PIPAAm (poly-N-isopropylacrylamide). En dessous de 32°C, la modification chimique du revêtement permet de détacher le tapis cellulaire sans aucune action enzymatique maintenant ainsi la matrice extracellulaire et les connexions intactes. Le tapis de cellules peut alors être déposé sur une autre monocouche cellulaire afin d'établir de nouvelles communications entre les couches (figure 10e)¹²¹⁻¹²⁴. Le contrôle de la répartition des types cellulaires est également réalisé en sphéroïdes (figure 10g). Les agrégats cellulaires d'un premier type cellulaire sont recouverts par un deuxième type. L'effet de cette configuration avec des hépatocytes primaires et des fibroblastes est intéressant. En effet, les sphéroïdes à double types maintiennent une synthèse d'albumine à 150µg/mL/j sur 14 jours tandis qu'en simple culture, la production ne cesse de diminuer. Malgré une diminution de l'activité des CYP450 suivie par la dééthylation de l'ethoxycoumarine (ECOD), celle-ci reste 1,5 fois plus élevée en coculture (figure 10h)¹²⁵. La culture cellulaire en agrégats ou en double couches apporte donc de nombreux avantages pour le maintien des fonctions spécifiques. Cependant, il est généralement constaté une hypoxie cellulaire au centre des agrégats à cause d'une trop faible diffusion de l'O₂.

L'utilisation d'insert à membrane dans des puits de culture est une technique aujourd'hui bien maîtrisée qui permet de cultiver deux types cellulaires différents, séparés physiquement l'un de l'autre (figure 10f). L'influence des sécrétions ou du métabolisme d'un type cellulaire sur un autre peut être identifiée^{117,126,127}. Les membranes servent également comme modèle d'absorption en pharmacologie. La barrière hémato-encéphalique est par exemple modélisée par la coculture de cellules endothéliales, d'astrocytes ou d'explant cérébral¹²⁸. D'autres modèles proposant de caractériser l'absorption à travers divers tissus tels que l'épithélium intestinal, l'endomètre, le derme sont mis en place et utilisés dans l'industrie pharmaceutique¹²⁹⁻¹³².

Les membranes ne sont pas uniquement des supports de culture, elles servent aussi d'oxygénateur lorsque le tissu est plus épais. Contrairement à une surface plastique de culture classique, l'oxygène diffuse par la membrane sous la culture cellulaire¹³³.

La mise en place de systèmes perfusés permet également d'apporter et de renouveler les nutriments et l'oxygène. On parle dans ce cas de bios réacteurs, systèmes dynamiques hébergeant des cellules permettant de reproduire certaines fonctions rencontrées *in vivo*.

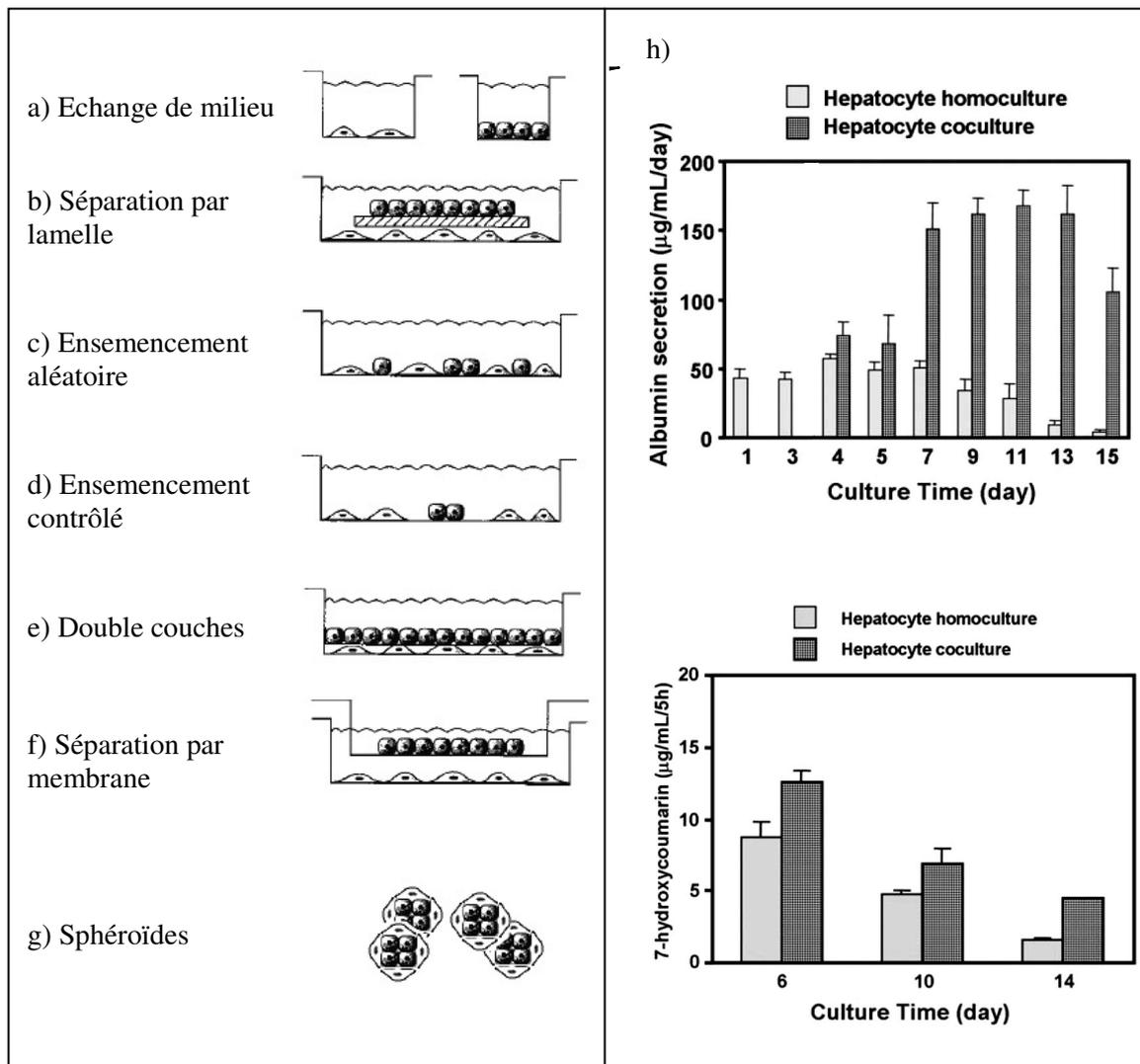


Figure 10 : Représentation des différentes techniques de coculture (A) (photo adaptée)¹¹⁸ et de l'effet associé sur la synthèse d'albumine et la dééthylation de l'éthoxycoumarine (B)¹²⁵.

2.3 Les bioréacteurs

Les membranes en fibre creuse font l'objet de nombreuses études. Initialement conçues pour la réalisation de modules de dialyse, les fibres creuses offrent une surface d'échange importante pour un encombrement minimum. En perfusion, les fibres forment un réseau de distribution d'oxygène et de nutriments similaire aux vaisseaux sanguins¹³⁴. La fibre protège aussi les cellules du cisaillement engendré par l'écoulement. Certaines études proposent également d'immobiliser les cellules dans des gels, capsules ou billes de polymères afin de conserver un environnement 3D en matrice poreuse^{134,135}. Les matériaux utilisés sont le poly-HEMA, le chitosan, le collagène, l'alginate^{113,134-137}... La porosité de ces matrices autorise les échanges de petites molécules entre l'intérieur et l'extérieur tout en protégeant les cellules du cisaillement engendré par le flux¹³⁵. Ces systèmes bio artificiels, une fois introduits dans un circuit extracorporel, ont pour objectif de suppléer les fonctions principales du foie lors d'une hépatite fulminante généralement fatale pour le patient¹³⁵. Ce type de bioréacteurs pourrait également à terme être utilisés en pharmacologie comme modèle d'organe perfusé^{56,87,94,138}.

Plusieurs systèmes mettant en jeu différents types cellulaires ont déjà été présentés pour modéliser grâce à la perfusion, les phases ADME de substances et métabolites entre plusieurs compartiments¹³⁹⁻¹⁴¹. On note par exemple un modèle foie-poumon au contact du naphthalène (figure 11a)¹⁴⁰ et un modèle d'absorption foie-intestin en présence du benzo[a]pyrène (figure 11b)^{139,141}.

Malgré un effort d'optimisation pour limiter les volumes morts au sein des bio réacteurs, la perfusion introduit un volume de liquide souvent important (tuyaux, connecteurs, pompes, réservoirs). Ceci conduit alors à une dilution des substances synthétisées par les cellules nécessitant des moyens de détection très sensibles⁹⁰.

Les nouvelles technologies comme les microtechnologies développées depuis une vingtaine d'années pour la microélectronique permettent de fabriquer des microbioréacteurs sur des surfaces de quelques centimètres carrés. De nouveaux processus de fabrication et matériaux biocompatibles facilitent la réalisation à l'échelle micrométrique de systèmes destinés aux applications biologiques. Cette miniaturisation permet notamment de réduire les coûts en diminuant les quantités de réactifs et les temps de réaction nécessaire. Ceci conduit alors à de meilleures sensibilités. De nombreuses applications biomédicales voient ainsi le jour avec par exemple la réalisation de systèmes d'analyses et de diagnostics portatifs, des implants pour le relargage contrôlé de substances thérapeutiques, des systèmes en parallèle pour le criblage à haut débit ou de nouveaux modèles de culture cellulaire comme les puces à cellules (cells on chip) que l'on appellera « biopuce » dans la suite du manuscrit¹⁴²⁻

¹⁴⁶...

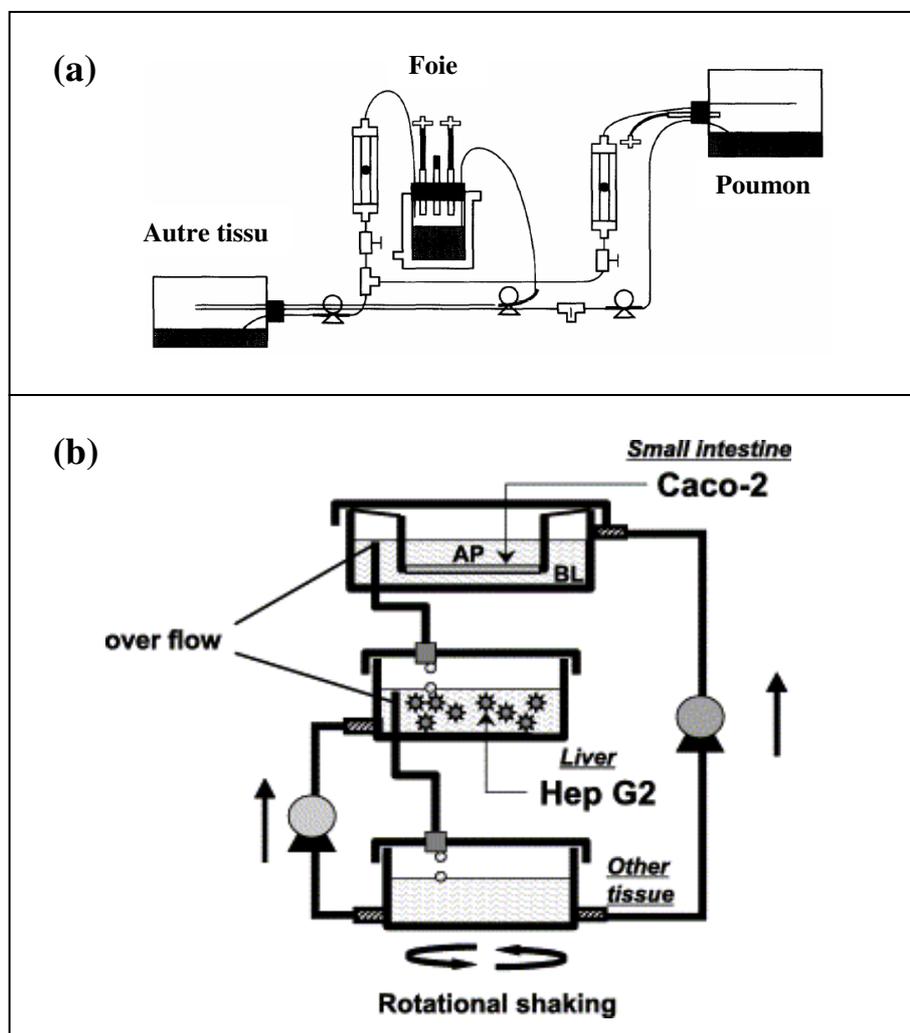


Figure 11 : Schémas de systèmes perfusés modélisant les phases ADME de substances et métabolites dans différents compartiments cellulaires¹³⁹⁻¹⁴¹.

3. Les nouveaux modèles cellulaires *in vitro* liés aux microtechnologies

Aujourd'hui, le couplage de plusieurs domaines autour des microtechnologies offre de nouvelles perspectives aux biologistes dans la construction de modèles cellulaires *in vitro* plus pertinents. Ainsi, la microfluidique, les sciences des matériaux et l'ingénierie tissulaire permettent conjointement de contrôler l'environnement à l'échelle cellulaire. L'objectif est de reproduire le plus fidèlement possible les paramètres rencontrés *in vivo* afin de conserver de manière optimale l'activité spécifique des cellules. Ceci conduit à la mise en place de nouveaux modèles de cultures cellulaires en biopuces dont l'une des applications est de tester l'effet de produits chimiques et pharmacologiques.

3.1 La microfluidique

La fabrication de microcanaux permet la manipulation de fluides dans des réseaux de canaux dont deux dimensions sont à l'échelle micrométrique. Cela a donné naissance à une nouvelle discipline qui est la microfluidique étudiant le comportement des fluides dans ces microgéométries.

Les petites dimensions imposent des écoulements laminaires (très faibles nombres de Reynolds) à l'intérieur des réseaux (figure 12a). Ceci permet d'éliminer les phénomènes complexes turbulents rencontrés à une plus grande échelle¹⁴⁷⁻¹⁵⁰. La miniaturisation du réseau fluide réduit de manière importante les volumes utilisés diminuant ainsi les coûts et réduisant les risques lors d'études sur des produits hautement toxiques. De plus, l'augmentation du ratio surface/volume^{150,151} permet d'accélérer les réactions chimiques. Suivant la configuration du réseau de distribution microfluidique, des opérations multiples de dilution, séparation et adressage sont réalisables dans des puces de quelques centimètres carrés^{152,153}. Des gradients de températures ou gradients de concentration (molécules, protéines, facteurs de croissances et substances chimiques) sont réalisables uniquement par cette technologie (figure 12b)¹⁵⁴.

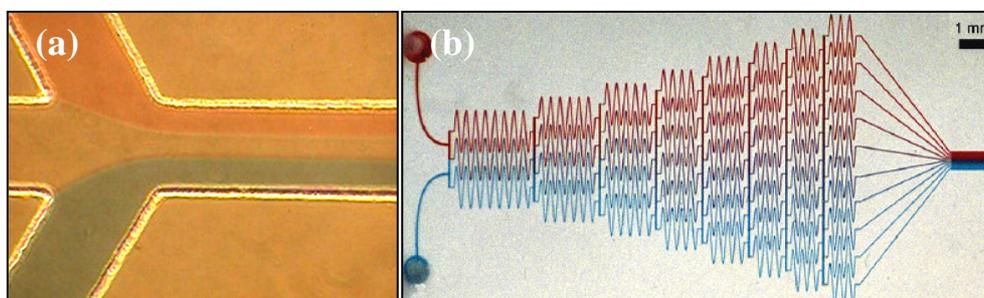


Figure 12 : Visualisation de l'écoulement laminaire dans un canal (a) et module de dilution (b)¹⁵³.

3.1.1 Phénomène de transport

Il est ainsi possible de reproduire des phénomènes de transport ou de consommation proche de la physiologie. La perfusion en volume restreint sur une culture de cellule permet de former des gradients de concentration d'espèces chimiques dans des bioréacteurs cellulaires miniatures ou biopuces. Les cinétiques chimiques sont évaluées par des coefficients comme le nombre de Péclet ou le nombre de Damköhler qui prennent en compte la vitesse de diffusion, la vitesse de réaction et le débit à l'intérieur de la chambre. L'oxygène est par exemple consommé graduellement par des hépatocytes entre l'entrée et la sortie de la chambre de culture créant une zonation comme dans le foie. Tout le long de ce gradient d'oxygène, les hépatocytes cultivés présentent des taux d'activité des CYP450 différents (figure 13)¹⁵⁵.

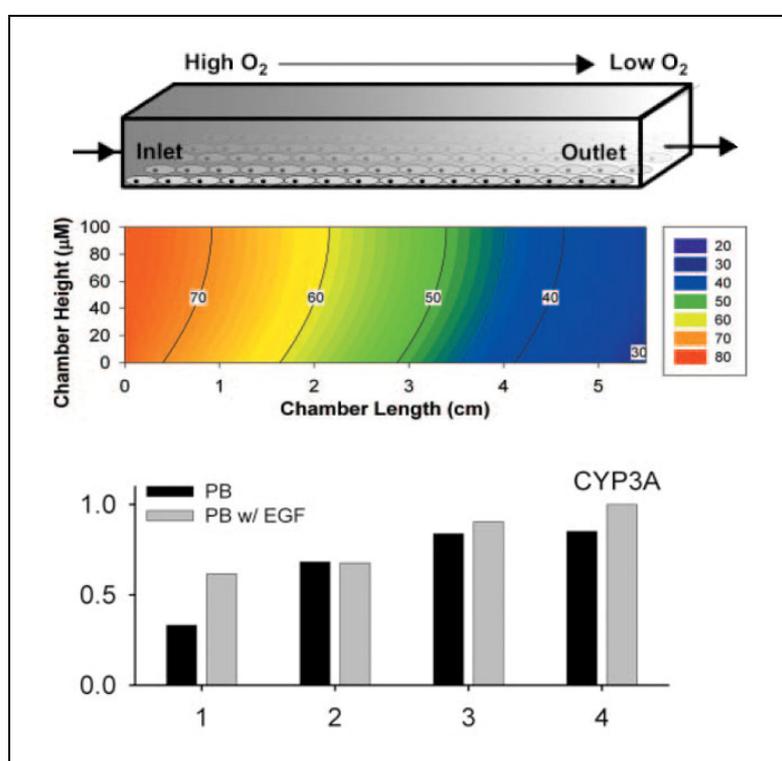


Figure 13 : Représentation du gradient d'oxygène dans une biopuce et activité des CYP3A4 associée au positionnement des hépatocytes.

La quantification des CYP3A4 est présentée en densité optique relative pour des western blot réalisés sur les cellules cultivées dans 4 zones différentes de la chambre (photo adaptée)¹⁵⁵.

La perfusion participe ainsi au remodelage et à l'organisation du tissu cultivé par le transport de nutriments aux cellules mais également par l'élimination des déchets cellulaire. Techniquement, la perfusion est réalisée à l'aide de pousse-seringues ou de pompes péristaltiques¹⁵⁶. Elle est effectuée en

circuit ouvert ou en boucle de recirculation. En circuit ouvert, le milieu de culture traverse la chambre de culture puis est éliminé ou collecté pour analyses. Les sécrétions et déchets cellulaires sont alors éliminés en permanence et la composition du milieu perfusé est constante. En boucle de recirculation, le milieu de culture circule plusieurs fois dans la chambre de culture. Les sécrétions et déchets sont dilués dans le réservoir de milieu avant d'être à nouveau au contact des cellules. La composition du milieu perfusé dépend du temps et de la vitesse de circulation ainsi que de l'activité cellulaire¹⁵⁶.

3.1.2 Stimulations mécaniques

La perfusion du fluide sur les cellules crée un cisaillement (chargement mécanique) qui déclenche des signaux de mécano-transduction de la membrane jusqu'au noyau. La morphologie, la structure cellulaire ainsi que l'expression de certains gènes sont modifiés. L'effet est différent selon les types cellulaires. Ainsi, le cisaillement est bénéfique pour les cellules endothéliales et participe au maintien de l'homéostasie vasculaire. De même, les hépatocytes en cultures dynamiques préservent leur activité pour des cisaillements inférieurs à 0,033 Pa. Par contre, les taux supérieurs à 0,5 Pa réduisent de manière importante leur sécrétion en albumine et urée¹⁵⁷. Le cisaillement peut également désorganiser le tissu. Ceci est montré avec des cellules de tubule rénal distal comme les MDCK qui se détachent rapidement pour des taux de cisaillement supérieurs à 0,002 Pa¹⁵⁸. Il est alors impératif de contrôler le flux afin de travailler dans des gammes de cisaillements acceptables pour les cellules utilisées.

Le milieu de culture étant la source principale de nutriments et d'oxygène, il est parfois nécessaire d'augmenter le débit de perfusion afin de subvenir aux besoins des cultures qui en se développant, nécessitent un apport croissant. Des études proposent alors d'intégrer des obstacles afin de protéger les cellules des cisaillements engendrés par la perfusion. Ces topographies de surface ou microstructures introduisent des espaces à faibles vitesses et permettent de contrôler les écoulements sur les tapis cellulaires^{156,157,159} (figure 14), tout en apportant les nutriments nécessaires à la consommation cellulaire. Un flux principal, relativement important circule au-dessus des microstructures, tandis qu'un flux secondaire, plus faible entre les microstructures, permet le développement des cultures sur la surface.

Le rôle des microstructures ne s'arrête pas uniquement à la conduction du flux. En effet, suivant la taille et la géométrie, des études montrent également une influence de cette topographie sur la réorganisation tissulaire.

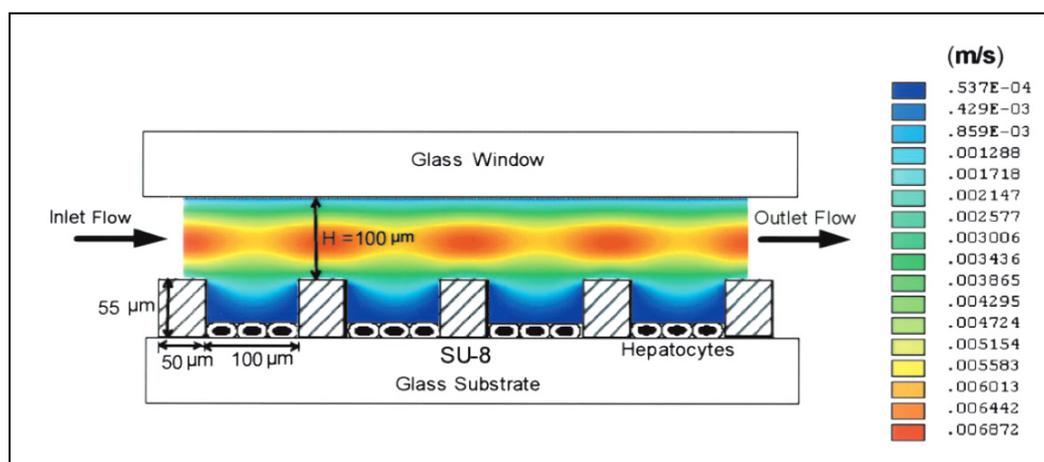


Figure 14 : Représentation graphique du profil de vitesse dans un bioréacteur plat microstructuré. Les microstructures délimitent des zones à faible vitesse protégeant les cellules des cisaillements¹⁵⁷.

3.2 Science des matériaux/biomatériaux et microfabrication

3.2.1 Topographie de surface

En plus de réduire les cisaillements sur la surface de culture, la littérature montre que les microstructures influencent la réorganisation tissulaire. Dans leur environnement, les cellules reposent sur une matrice extracellulaire accidentée faite de trous, de bosses et de fibres. Ces aspérités de surface sont reconnues depuis longtemps comme étant des acteurs influençant l'orientation, la migration et l'organisation du cytosquelette¹⁶⁰. Les études du comportement de cellules à l'intérieur de microstructures ont débuté sur des microsillons (V groove). Récemment, la microfabrication a permis d'étendre ces études à différentes formes de microcanaux (rectangulaires, circulaires, arc de cercle et micro-puits). L'organisation du cytosquelette et la morphologie cellulaire sont influencées par des structures de quelques microns. Par exemple, des cellules musculaires de cordon ombilical (HUVS-112D) cultivées sur des microstructures de 19 µm de large présentent un meilleur alignement des filaments d'actine (figure 15) au regard des plus grandes largeurs de microstructure (50 et 80 µm)¹⁶¹. Il apparaît également que l'adhésion et la production de matrice extracellulaire sont favorisées par la rugosité de surface¹⁶⁰. Ceci est retrouvé également par un remodelage de la fibronectine créant des interconnexions physiques entre les cellules HUVS-112D¹⁶¹.

Certaines dimensions de microstructures influencent la réorganisation et le développement embryonnaire. Ainsi, pour des cultures de foie d'embryons de poulets, une migration de plus de 12% de l'explant est observée durant 14 jours de culture, dans des microsillons rectangulaires de 150 x 135 µm¹⁶².

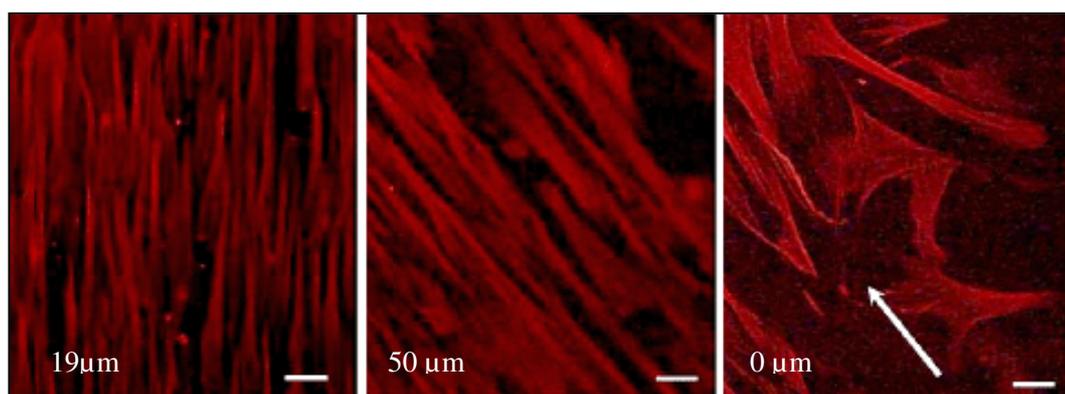


Figure 15 : Photos de cellules musculaires de cordon ombilical sur des topographies microstructurées. L'alignement des cellules se fait dans le sens des microstructures et est conservé à la confluence. Sans microstructures, les cellules adhèrent de manière désordonnée (photos adaptées)¹⁶¹.

3.2.2 Microfabrication et biomatériaux

L'application de la microfabrication en biologie se fait grâce à divers aspects fondamentaux qu'on en commun ces deux disciplines. L'utilisation de milieu aseptisé et la mise en place de scellements hermétiques sont des exemples¹⁶³. Traditionnellement, le verre et le silicium sont employés en microfabrication (figure 16a). Or, ces matériaux (silicium notamment) et les procédés de fabrication associés sont incompatibles avec le monde du vivant. Des techniques de fabrication, dites « douces » ou de prototypage rapide sont alors proposées¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ pour travailler sur des matériaux polymères biocompatibles et/ou biodégradables. Le principe de base consiste à mouler des polymères biocompatibles tels que le Poly-carbonate (PC) (figure 16b), le Poly-styrène (PS) (figure 16c), le Poly-diméthylsiloxane (PDMS) (figure 16d), le Poly-méthylméthacrylate (PMMA), l'Isobornyl-Acrylate (IA) et le Poly-imide (PI)¹⁶⁷. Le moulage de biomatériaux biodégradables comme par exemple le Poly-caprolactone-lactide est également proposé en vue d'une implantation chirurgicale¹⁶⁸. Les différentes formes physico-chimiques disponibles de ces polymères permettent de mieux contrôler l'interface matériau/tissu biologique¹⁶⁹. Certains de ces polymères comme le PDMS offrent une excellente transparence, permettant ainsi de visualiser *in situ*, les cultures cellulaires par microscopie optique. Ces nouvelles techniques de fabrication destinées à la culture cellulaires sont intégrables dans des puces utilisant des techniques verre/silicium pour le développement de biocapteurs comme les capteurs à pH, glucose ou oxygène. La complémentarité des matériaux associés aux techniques diverses de microfabrication permet ainsi de mettre au point des biopuces à contenance biologique et électronique. Des électrodes métalliques, incorporées dans les biopuces comme biocapteur (glucose, insuline, oxygène ...) permettent alors par mesure ampérométrique, de suivre en temps réel l'évolution et l'activité de la culture cellulaire (figure 16e 16f)¹⁶⁷. Les électrodes servent également au contrôle de

l'arrangement cellulaire¹⁷⁰. Ceci permet d'organiser différents types cellulaires les uns avec les autres afin de produire des systèmes de culture *in vitro* encore plus proche des conditions *in vivo*.

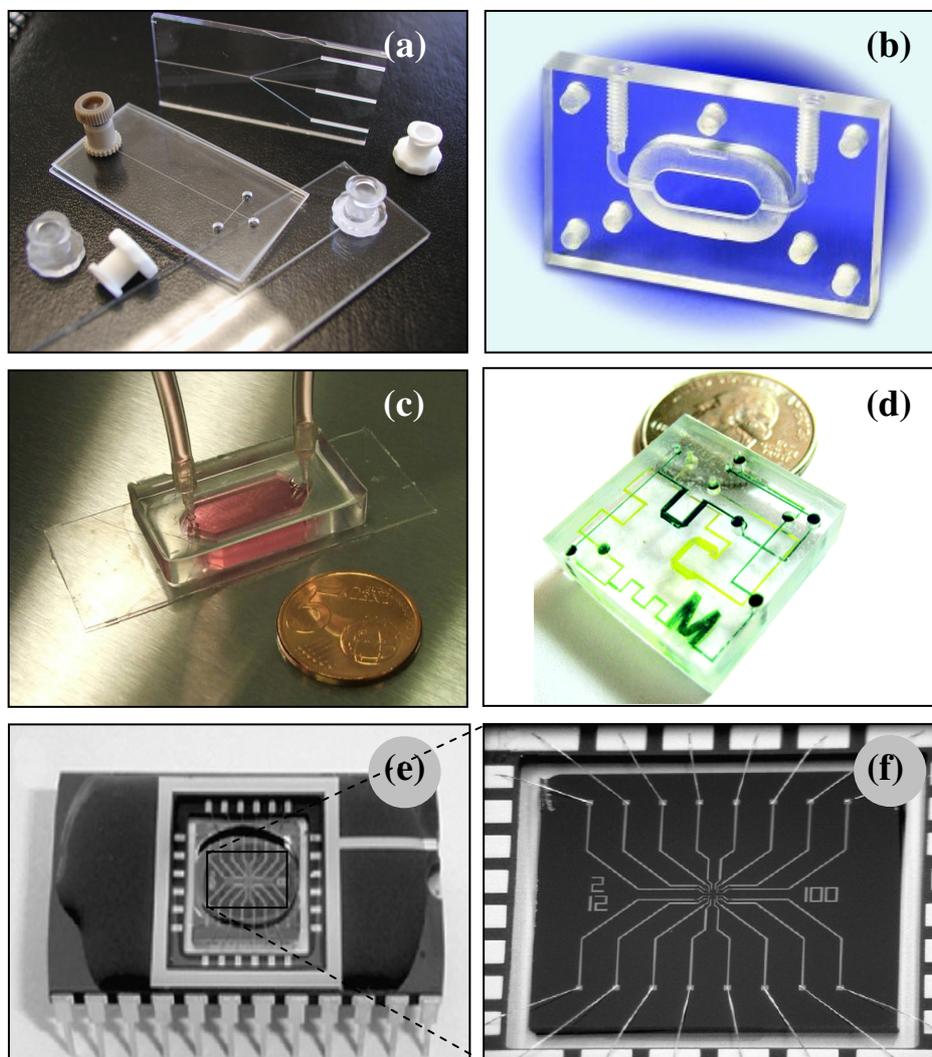


Figure 16 : Photos de biomatériaux transparents microfabriqués et électrodes intégrées.

(a) Pièce de Polycarbonate micro-usinée (www.designfax.net). (b) Réseaux microfluidiques gravés dans le verre (www.translume.com). (c) Réseau microfluidique fabriqué par superposition de feuilles de polystyrène thermoplastiques¹⁷¹. (d) Micro-chambre de PDMS sur lame de verre (www.isas.de). (e, f) Electrodes recouvertes de PDMS sur lequel des fibroblastes sont cultivés¹⁶⁷.

3.3 Ingénierie tissulaire et microtechnologie

L'ingénierie tissulaire reproduit *in vitro* un certains nombres de paramètres physiologiques. Nous avons vu que les modèles de coculture en boîte de Pétri standard apportent de bons résultats avec par exemple le maintien des fonctions cellulaires *in vitro*. Aussi, le positionnement cellulaire fait l'objet de nombreuses études. En effet, le contrôle de l'organisation de plusieurs types cellulaires permet de reconstruire des tissus de plus en plus complexes. Les nouvelles technologies permettent de contrôler l'arrangement des cellules sur une surface. Pour cela, des techniques de préparation de surface par dépôts de protéines d'adhésion ont été mises au point.

3.3.1 Contrôle de l'adhésion et de l'arrangement cellulaire sur une surface

Les techniques de lithographie douce permettent de déposer localement une matrice extracellulaire sur une surface bien définie. Ceci conduit à la délimitation de zones d'adhésion préférentielles et à la mise en place de cultures cellulaires organisées sur une échelle de 10 à 300 μm . Cette technique est communément appelée le micropatterning. L'organisation des cultures cellulaires se fait par la mise en œuvre de pièces microstructurées utilisées comme micro tampon (figure 17a). Ces pièces servent à délimiter les zones sur lesquelles des molécules d'intérêts ou des protéines de la matrice extracellulaire sont déposées¹⁷²⁻¹⁷⁵.

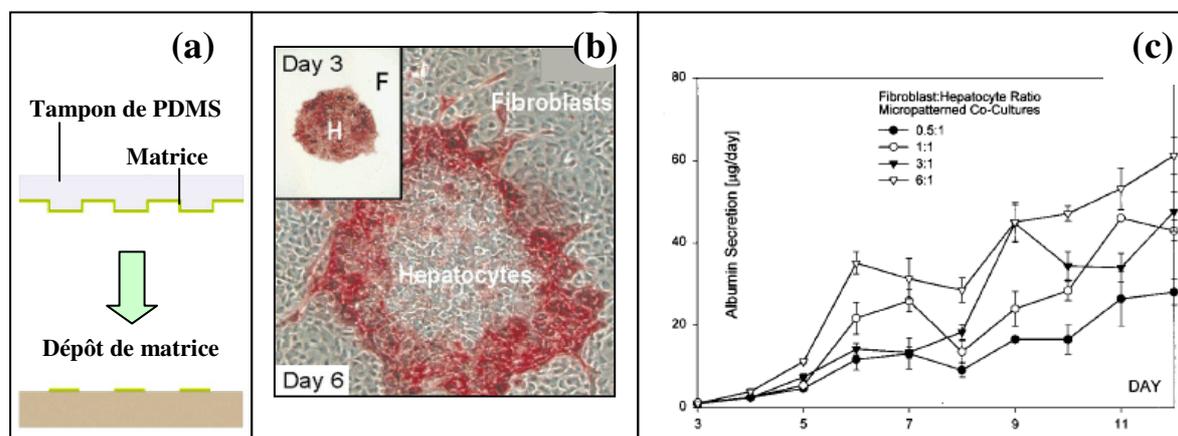


Figure 17 : Principe de dépôt de matrice extracellulaire par tampon de PDMS (a) et exemple de culture d'hépatocytes et de fibroblastes (photo adaptée)^{175,176}.

Différents types cellulaires sont ainsi cultivés sur une même surface (figure 17b). Le contrôle des interactions hétérotypiques est réalisé par les quantités de cellules de chaque type en contact^{175,177}. Ainsi, il est montré que les performances d'une coculture de fibroblastes et d'hépatocytes sont directement liées au nombre de fibroblastes. Les quantités d'urée et d'albumine synthétisées par les

hépatocytes sont plus importantes pour un ratio fibroblastes/hépatocytes de 6/1 en comparaison des synthèses réalisées au ratio 0,5/1 (figure 17c)^{176,178}.

La délimitation des zones d'adsorption des protéines d'adhésion peut être également réalisée avec des pochoirs ou des réseaux de canaux^{172,173}. Dans ce cas, les puits du pochoir ou les canaux du réseau microfluidique sont remplis de la solution protéique. Après adsorption des protéines sur la surface, le pochoir ou réseau est enlevé de la surface sur laquelle les cellules sontensemencées. Les tampons, pochoirs et réseaux sont utilisés comme outils de préparation à la surface de culture. Différentes combinaisons sont réalisables sur les surfaces afin de travailler avec des contacts cellulaires différents.

La mise en œuvre des techniques par tampon et pochoir est incompatible en biopuce fermée car il est impossible d'atteindre la surface d'adhésion. La préparation de la surface de culture est alors réalisée par perfusion/adsorption de matériels ou protéines d'intérêts ce qui permet de contrôler l'adhésion cellulaire.

3.3.2 Contrôle de l'adhésion et de l'arrangement cellulaire en biopuce

L'adhésion cellulaire est contrôlée en biopuce par le dépôt de protéines de la matrice extracellulaire. Les dépôts sont réalisés de manière statique (sans perfusion) ou de manière dynamique (avec perfusion). L'objectif de ces dépôts est d'immobiliser des cellules dans une zone prédéfinie de la biopuce.

3.3.2.a) Dépôt statique de protéines

Le dépôt de protéines en biopuce se fait par le remplissage des canaux microfluidiques d'une solution contenant une ou plusieurs protéines d'intérêts. La solution est alors incubée durant plusieurs minutes afin de permettre aux protéines de s'adsorber sur les parois. Dans le cas d'un réseau temporaire, la surface utilisée est recouverte uniquement à l'endroit des canaux (figure 18a). Dans le cas d'un réseau permanent, la protéine s'adsorbe sur toutes les parois des canaux. L'adhésion des cellules se fait sur la surface par sédimentation, de manière aléatoire. De nombreuses matrices telles que le collagène, la laminine, la fibronectine ou la poly-L-lysine sont aujourd'hui utilisées avec succès. Cette technique permet de recouvrir entièrement la surface interne des biopuces et facilite la mise en culture. Le contrôle du dépôt de protéines d'adhésion dans une région spécifique est réalisé en dynamique.

3.3.2.b) Dépôt et arrangement cellulaire utilisant la dynamique

Les techniques précédemment décrites dans la partie 3.1 concernant la microfluidique sont utilisées. Les propriétés d'écoulement des fluides en microcanaux sont exploitées pour contrôler le dépôt de matrices extracellulaires ou la polymérisation de matrices *in situ*. Ces techniques font appel à des canaux multiple-entrées qui permettent de faire circuler de manière laminaire plusieurs fluides.

Afin de contrôler l'arrangement cellulaire, l'un des fluides perfusé est chargé avec une protéine. La protéine s'adsorbe sur la surface, le long du chemin de circulation du fluide dans lequel elle est diluée. Après rinçage des produits de perfusion, les cellules sont ensemencées. La protéine d'adhésion étant adsorbée que dans une partie du canal, les cellules adhèrent préférentiellement dans cette même partie, ce qui permet de créer le patterning. Le même principe de circulation laminaire est également utilisé pour polymériser une matrice de manière non uniforme dans un canal.

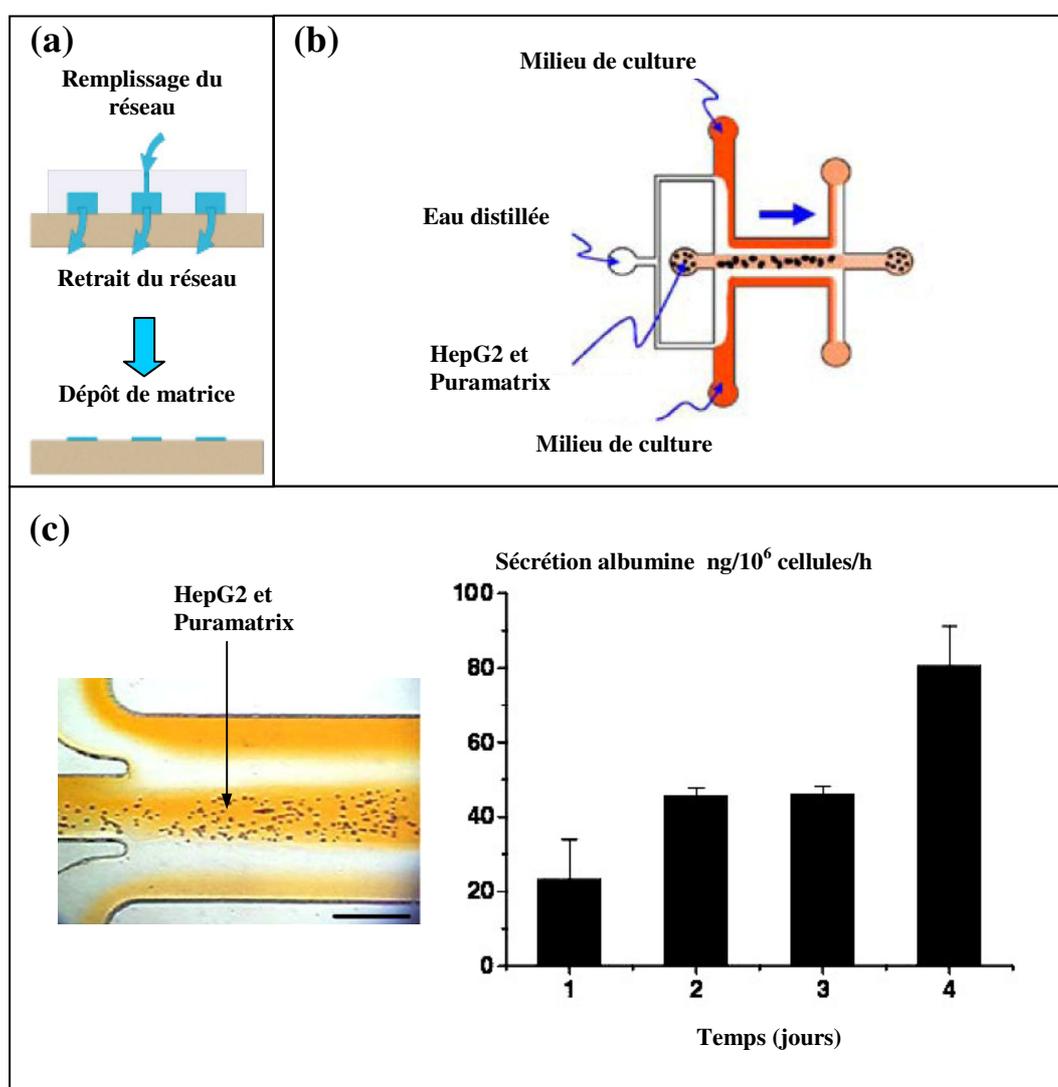


Figure 18 : Dépôt de matrice (a) et encapsulation de cellules dans un réseau micro-fluidique (b) avec synthèse d'albumine (c) (photos adaptées)^{175,179}.

Les fluides mis en circulation dans le canal multi-entrées sont le polymère en solution et un agent réticulant. Une fois que les fluides circulent parallèlement dans le canal, la perfusion est arrêtée ce qui permet à l'agent réticulant de diffuser dans le polymère et de le réticuler. La matrice formée est ainsi localisée sur le chemin de circulation¹⁷². Cette technique est par exemple appliquée à la polymérisation d'hydrogels comme le Poly-Ethylène-Glycol (PEG) ou de matrices peptidiques (Puramatrix) contenant des cellules (figure 18b)^{179,180}. Les cellules sont ainsi encapsulées et cultivées en amas dans la biopuce. Avec cette configuration, la synthèse d'albumine est multipliée par 4 en comparaison des cultures en boîte de Pétri (figure 18c).

Le couplage d'un canal multi-entrée précédé d'un module de dilutions successives permet de réaliser des gradients de concentrations dans le canal. Le dépôt d'une matrice protéique est mis en place dans un canal de manière graduelle. Il est également possible de réaliser des gradients opposés de plusieurs protéines à l'intérieur du micro-canal. Ces techniques de gradients protéiques permettent par exemple d'évaluer de manière rapide quel ratio protéique optimum convient le mieux à la culture cellulaire *in vitro* sur double matrice. L'application de ce procédé est également de recréer certains aspects rencontrés *in vivo* : des gradients de concentrations opposées de laminine et de collagène I sont par exemple utilisés pour déposer une matrice mimant la crypte intestinale (figure 19). L'expression de marqueurs protéiques du cycle cellulaire tels que p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor) et PCNA (proliferating cell nuclear antigen) sont alors exprimés différemment par les cellules suivant la zone dans laquelle elles sont cultivées¹⁸¹.

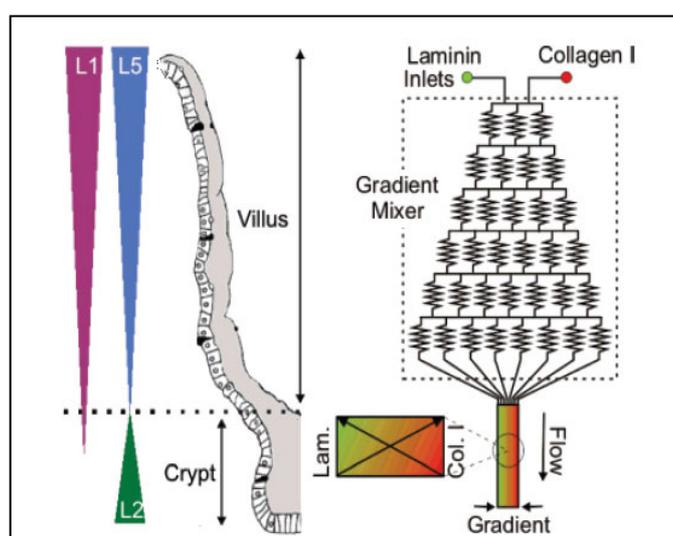


Figure 19 : Modélisation du gradient protéique de la crypte intestinale par module de dilution (photo adaptée)¹⁸¹.

Ces différentes techniques statiques et dynamiques permettent de contrôler l'arrangement cellulaire en biopuce. L'adhésion et l'arrangement cellulaire sont alors réalisés dans des zones d'écoulement. Le patterning cellulaire pour des motifs complexes est cependant difficilement réalisable avec ces techniques. Un contrôle extérieur est alors nécessaire ce qui donne lieu à de nouveaux procédés de patterning *in situ*.

3.3.2.c) Arrangement cellulaire par contrôle externe

Classiquement, les cellulesensemencées sans contrôle extérieur adhèrent sur la surface de manière aléatoire¹⁸². Le contrôle du positionnement cellulaire avant adhésion peut alors être réalisé par centrifugation-hydrodynamisme¹⁸², compression¹⁸³ ou magnétisme¹⁷⁰.

La centrifugation met le fluide en mouvement (hydrodynamisme) entraînant les cellules vers les parois par les écoulements. Des espaces ménagés dans les parois retiennent les cellules comme un filtre^{184,185}. Lorsque la centrifugation est arrêtée, le fluide s'immobilise. Les cellules tombent alors sur la surface et adhèrent. Ceci permet par exemple de positionner des cellules le long d'une paroi (figure 20a)¹⁸².

Après ensemencement cellulaire d'une première couche cellulaire, une compression appliquée sur le tapis cellulaire de manière localisée par des micro-piliers induit une mort cellulaire localisée. Les zones comprimées peuvent être alors débarrassées des cellules laissant des surfaces disponibles pour un second ensemencement avec un deuxième type cellulaire (figure 20b). La taille et la forme des micro-piliers sont variables, laissant le choix de la complexité du motif¹⁸³.

L'application d'une force extérieure facilite le contrôle de l'arrangement cellulaire *in situ*. Ceci permet de déplacer dans des zones distinctes une population cellulaire avant adhésion. Ce contrôle est également réalisable sur cellule unique.

L'utilisation d'un champ électrique pour positionner des cellules permet d'atteindre des résolutions plus fines. De plus, les cellules ne subissent pas de dommages physiques et de déformation membranaire. Quelques exemples de faisabilité sont présentés dans la littérature. Des cellules HepG2 et HUVEC sont par exemple positionnées de manière à mimer le motif trabéculaire du foie en biopuce (figure 20c)¹⁷⁰. L'application d'un champ électrique dans un gel de PEG permet également le contrôle de la position spatiale des cellules avant polymérisation¹⁸⁶.

Le positionnement des cellules en micro-environnement est aussi réalisé par la polymérisation de gels. Bien que cette technique soit applicable avec plusieurs types cellulaires¹⁸⁷⁻¹⁸⁹, les contacts hétérotypiques ne sont cependant pas rétablis. Un greffage sélectif de protéines sur microstructures laisse cependant envisager d'une possibilité de patterning cellulaire sur une surface topographiée¹⁹⁰.

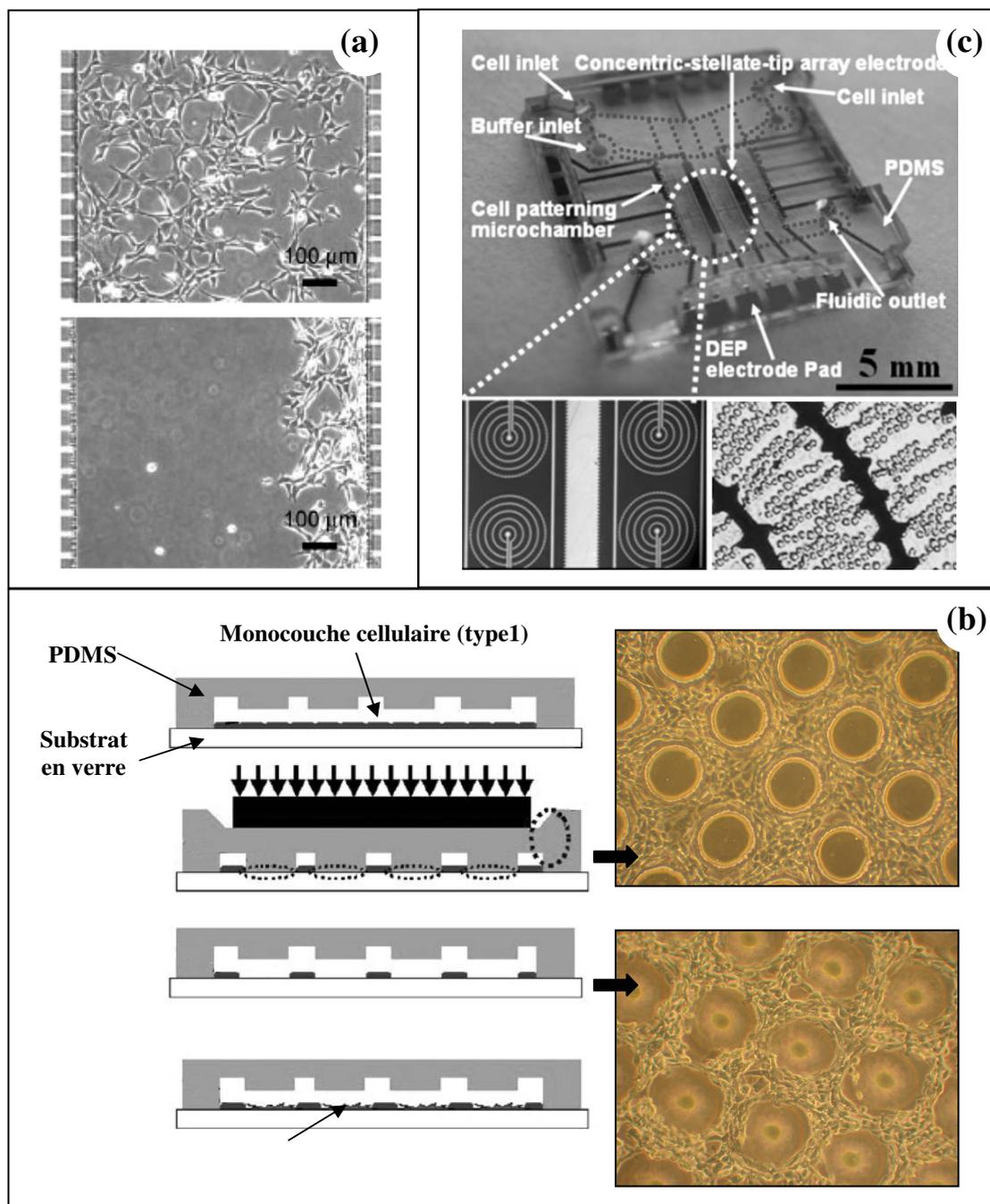


Figure 20 : Positionnement de cellules dans une biopuce par centrifugation-hydrodynamisme (a), compression (b) et champ électromagnétique (c) (photos adaptées)^{170,182,183}.

Les nouveaux modèles cellulaires *in vitro* en biopuce font appel à différentes disciplines telles que la microfluidique, le domaine des matériaux et l'ingénierie tissulaire. Ces domaines participent conjointement à la conception, au design, à la fabrication et à la mise en œuvre des biopuces. Les nombreux travaux réalisés dans ces domaines démontrent la faisabilité de ces techniques permettant la culture de cellules en biopuces. Certains travaux présentent la miniaturisation de processus fonctionnant déjà à l'échelle macroscopique (perfusions, cocultures, arrangements cellulaires ...). Cette réduction d'échelle sert par exemple à paralléliser plusieurs chambres de culture pour réaliser différents tests simultanément. D'autres études par contre développent de nouveaux aspects grâce à la réduction d'échelle (gradients de concentrations, gradients surfaciques ...). La combinaison de ces aspects d'ingénierie pourrait rapidement conduire à la mise en place de systèmes de cultures performants pour diverses applications telles que la toxicité, la reconstruction de tissus...

3.4 Les biopuces

3.4.1 Vers de nouveaux outils de screening

Les microtechnologies, de part la miniaturisation, permettent le suivi de l'activité cellulaire et métabolique électrochimiquement ou/et optiquement *in situ* des cultures sans causer de dommages ou de perturbation au tissu. Grâce aux nombreux biocapteurs développés ou à l'aide de sondes fluorescentes aujourd'hui disponibles sur le marché, le suivi peut être réalisé de manière ciblée¹⁹¹ et en temps réel^{167,192-194}. La viabilité des cellules cultivées au centre d'un microcanal est ainsi suivie à l'aide de la calcein AM¹⁹¹. Des cinétiques d'activité des facteurs de transcription par la GFP (Green Fluorescent Protein) sont récoltées durant la culture. Ces systèmes permettent d'économiser les nombreux mois nécessaires à la culture et à l'obtention des résultats par les techniques cellulaires et moléculaires conventionnelles¹⁹⁵. En effet, l'activité étant suivie *in situ*, sans lyse cellulaire ou détachement enzymatique, il est alors possible de réutiliser plusieurs fois le système de culture pour réaliser différentes études. Ceci permet par exemple de réaliser un criblage de plusieurs concentrations d'intérêts¹⁹³.

La parallélisation de microchambres en biopuce apporte également de nouvelles perspectives dans le criblage de molécules à haut débit (figure 21a)¹⁹⁶. Actuellement, le criblage est réalisé avec des plaques 96 et 384 puits. Ceci implique une attention toute particulière de l'expérimentateur lorsque le travail est réalisé manuellement ou un investissement onéreux en robotique. De plus, l'évolution vers des plaques contenant un plus grand nombre de puits paraît actuellement difficile à cause d'une évaporation incontrôlée¹⁹⁷. L'évaporation existe également en biopuce¹⁵⁶, mais la rapidité et la reproductibilité de manipulation des petits volumes sont des atouts. Egalement, le développement de micro-actionneurs tels que des pompes¹⁹⁸, des valves^{166,199,199}, des micro-mélangeurs^{147,148} ... amène a

réaliser de nombreuses actions sur les fluides et les cellules pour la mise en place de laboratoires intégrés sur puce (Lab on chip) (figure 21b)^{142,143,200}. Par l'utilisation d'un réseau microfluidique, plusieurs chambres de culture cellulaire sont ainsi connectées les unes avec les autres en série et en parallèle. Différentes études montrent la faisabilité de coupler des modules de dilution sur des puces multi-entrées pour tester des gammes de concentrations d'une substance sur un ou plusieurs types cellulaires^{146,154,192,194-197}. L'utilisation de plusieurs types cellulaires dans des chambres de culture en série peut amener à une interaction d'un type de cellules sur un autre.

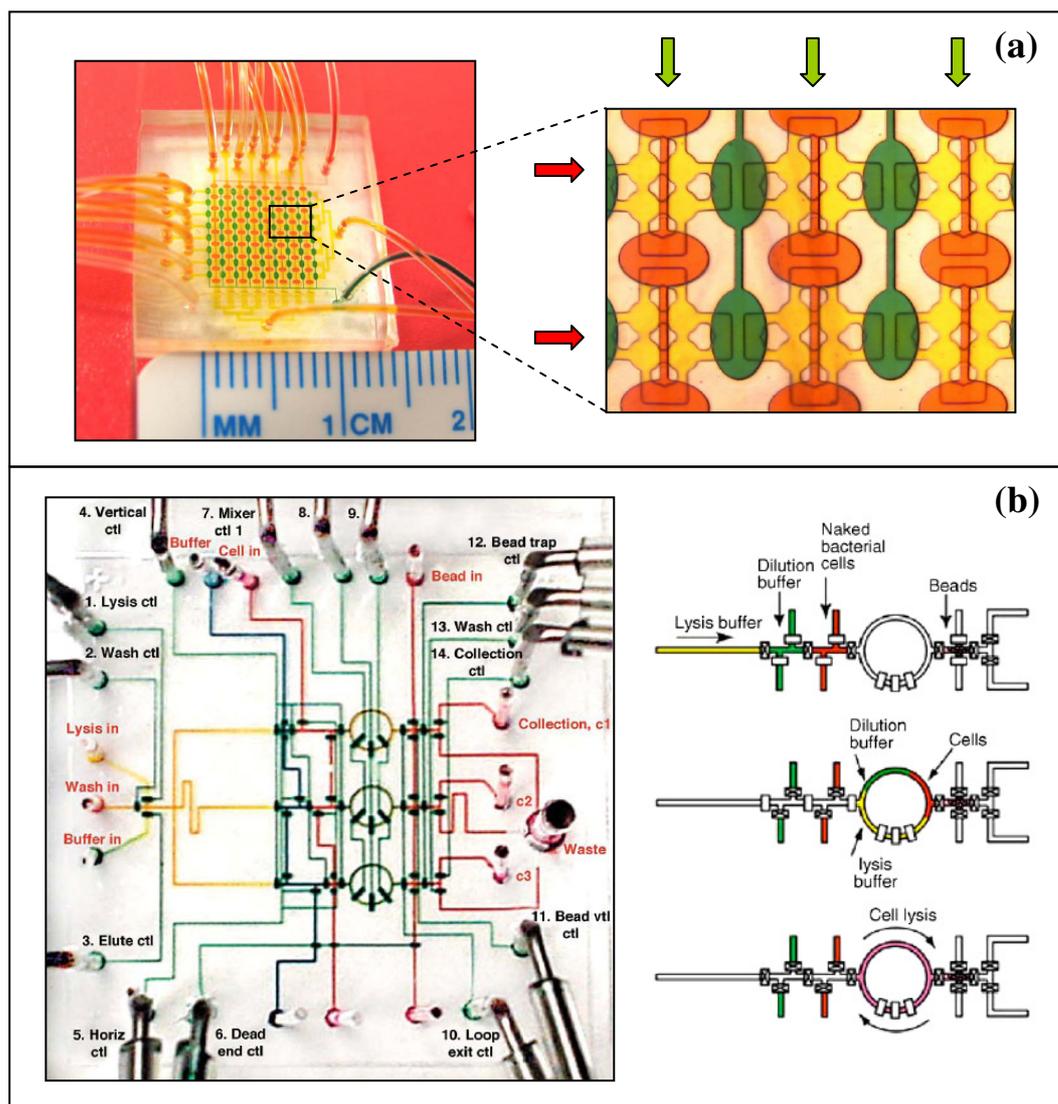


Figure 21 : Photo d'une biopuce multi-chambres de screening à haut débit¹⁹⁵ et d'un laboratoire sur puce de purification d'ADN²⁰⁰.

(a) Un adressage spécifique est réalisé par des valves (rouges et vertes) qui dirigent l'écoulement. Il est ainsi possible d'ensemencer plusieurs types cellulaires en même temps dans des colonnes voisines sans contamination d'une colonne à l'autre grâce à ce dispositif d'actionneurs. (b) Muni de pompes et de valves, ce laboratoire sur puce collecte, lyse les cellules pour extraire l'ADN.

Le concept « animal/human on chip » propose alors de recréer les interactions métaboliques et cinétiques rencontrées dans un organisme entre des chambres de culture interconnectées. Les paramètres de distribution, les temps de résidence du milieu circulant sont pris en compte comme dans un modèle PBPK (figure 22)²⁰¹. L'extrapolation des modèles d'une espèce à l'autre peut alors être évitée par la mise en culture des cellules directement liées à l'espèce étudiée. Le contrôle de tout les paramètres sur la puce offre également l'opportunité de raffiner les modèles PBPK existant, de mieux cibler le criblage pharmaceutique, conduisant *in fine* à la réduction importante des modèles *in vivo*²⁰². La mise en œuvre de ces dispositifs est en réalité difficile et requiert beaucoup d'attention. Chaque type cellulaire nécessite des soins particuliers. Les adipocytes 3T3-L1 utilisés pour cette étude doivent par exemple êtreensemencés deux jours avant les cellules pulmonaires L2 et les hépatomes HepG2/C3A afin de se différencier et d'accumuler des lipides intracellulaires. L'ensemencement doit également être réalisé avec la plus grande attention afin qu'aucune cellule d'un type cellulaire ne vienne contaminer la chambre d'un second type^{197,202}. Le développement de micro-actionneurs microfluidiques qui se fait actuellement en parallèle des cultures cellulaires en biopuce pourrait rapidement apporter des solutions techniques à la bonne réalisation de ces puces multi-compartimentées¹⁹⁶.

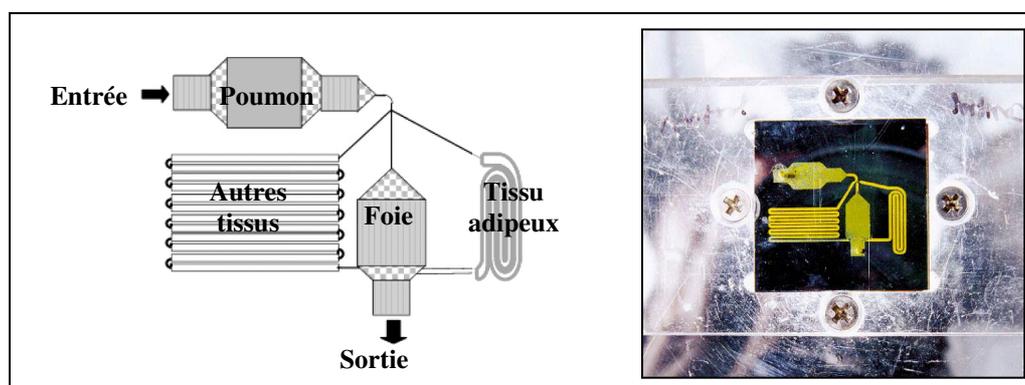


Figure 22 : Représentation et photo de la biopuce Human on Chip.

Le réseau est mis en valeur avec une encre jaune. Cette puce est utilisée pour modéliser des étapes de bioaccumulation, biotransformation et biodistribution du Naphtalène dans 3 chambres de culture cellulaire simulant différents organes tels que le foie, les poumons, le tissu adipeux. La 4^{ème} chambre étant pour cette étude un compartiment de micro-écoulements (photo adaptée)²⁰².

3.4.2 Vers de nouveaux bioréacteurs

In vivo, la densité cellulaire est très élevée. On estime seulement à $2,5 \cdot 10^6$ cellules/cm³ la densité cellulaire en boîte de culture standard. De nombreuses études présentent des problèmes liés à l'oxygénation du tissu dès qu'il est tenté de faire de la culture à haute densité. Aussi, sous forme d'agrégats, il est observé que les cellules au centre de l'amas ne reçoivent pas assez d'oxygène et présentent une hypoxie. L'apport de nutriments et d'oxygène *in vitro* peut donc être considéré comme limitant pour le développement de cultures cellulaires à forte densité. Considérant la répartition des hépatocytes au sein du foie, il peut être remarqué que chaque travée hépatocyttaire est bordée de vaisseaux sanguins, nécessaires à la bonne irrigation des $3 \cdot 10^8$ cellules/cm³. L'utilisation d'oxygénateurs, de matériaux perméables à l'oxygène tels que le PDMS ou de flux secondaires sont alors préconisés pour permettre à la culture cellulaire de se développer (figure 23a)^{203-206,206,207}.

L'étude de ces biopuces de quelques centimètres carrés dans lesquelles tous les paramètres ont été définis et contrôlés pourrait également amener à la mise en place de bioréacteurs multi-compartimentés. L'empilement de plusieurs de ces biopuces reliées les unes avec les autres peut aujourd'hui conduire au développement de bioréacteurs macroscopiques dont l'architecture de base est définie de manière microscopique^{205,208}. Une étude présente en effet la faisabilité d'empiler dans un carter de fluidisation, plusieurs substrats microstructurés préalablement développés en biopuce. Le concept de ce bioréacteur rappelle un lobule hépatique. La fluidisation est plus proche de la physiologie en se faisant de l'extérieur vers l'intérieur sur chaque surface de culture (figure 23b)²⁰⁸. Un autre concept consiste également à empiler plusieurs fois la même biopuce afin d'augmenter la quantité de cellules. Une fluidisation supplémentaire accroît l'apport d'oxygène à travers les parois perméables de PDMS²⁰⁵.

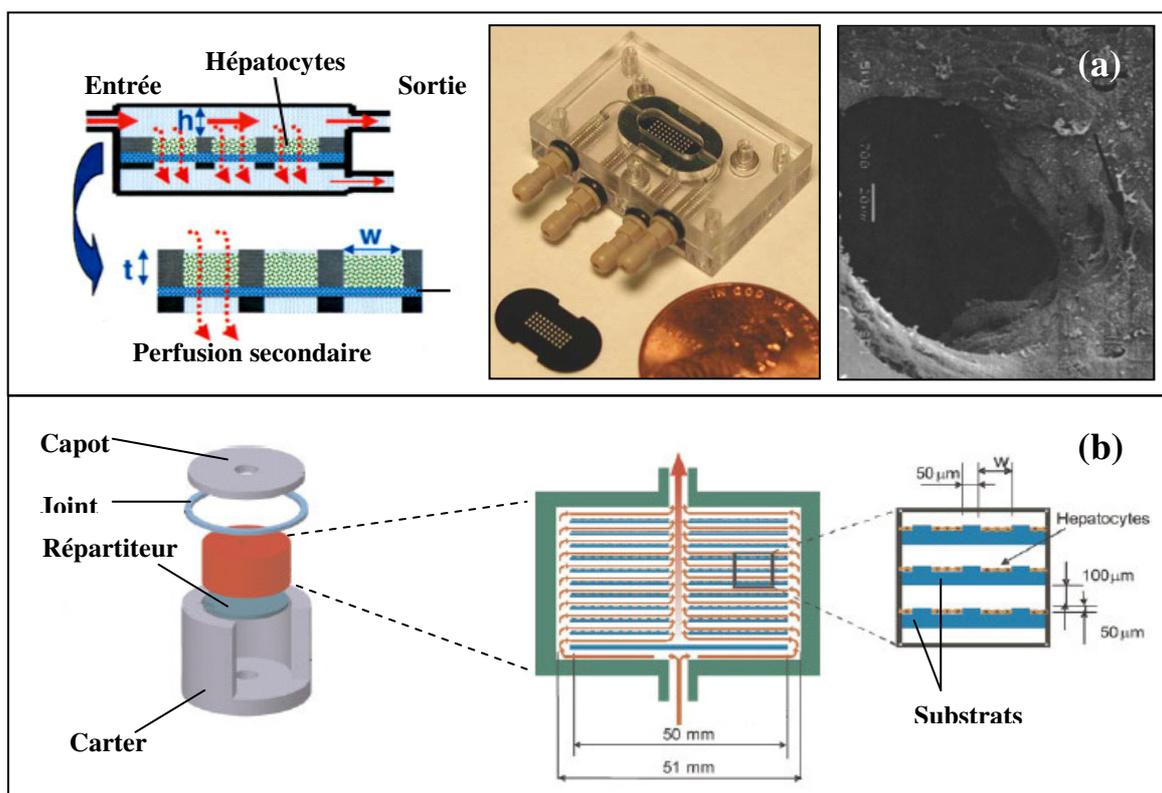


Figure 23 : Représentations d'un microréacteur hépatique en polycarbonate (a) et d'un bioréacteur constitué de l'empilement de substrats microstructurés en verre(b)²⁰⁸.

(a) Le système intérieur de culture cellulaire est constitué d'une membrane (représentée en bleue) qui retient les hépatocytes au fond des micro-puits. Un flux secondaire traversant la membrane permet l'oxygénation des amas cellulaires en leur centre (photo adaptée)^{206,207}.

Ces concepts de bioréacteurs utilisent généralement les cellules adhérentes aux parois^{196,207,209,210}. Par contre, d'autres microréacteurs maintiennent des C3A ou des cellules primaires hépatiques en piégeant les cellules à forte densité dans des puits micro-perforés^{184,211}. Les cellules perfusées dans ces puits sont alors piégées par hydrodynamisme et s'agrègent les unes contre les autres (figure 24a). La taille de l'agrégat est contrôlée par la largeur (50 μm) et la hauteur (30 μm) du puits. La faible épaisseur (30 μm) et les perforations fréquentes dans les parois offrent une diffusion rapide (<1s) des nutriments dans tout le tissu. Cette technique de répartition et de distribution du milieu de culture est également utilisée en chambre de culture. Ceci permet une perfusion uniforme sur l'ensemble de la culture^{196,209,210}.

L'un des objectifs de la culture cellulaire sous perfusion est de maintenir les caractéristiques du tissu le plus longtemps possible. Le développement de biopuces pour le criblage de substances chimiques et pharmaceutiques rejoint complètement cette ligne directrice car de nombreux tests chroniques sont à modéliser. Les tests d'expositions chroniques sont réalisés sur des périodes de quelques mois à plusieurs années *in vivo*. La modélisation *in vitro* de ces tests serait alors adéquate sur des périodes allant dans un premier temps de quelques semaines à plusieurs mois. Les études ici présentées montrent la faisabilité de maintenir les biopuces entre 1 et 2 semaines. Ceci nécessite alors de préserver de bonnes conditions de culture qui sont la température, le pH, le CO₂ en atmosphère humide, le renouvellement régulier du milieu de culture ... Généralement, ces dispositions sont mises en œuvre par l'intégration des microréacteurs dans les incubateurs classiques de culture cellulaire¹⁵⁶. Sous un microscope, la biopuce est généralement placée dans une chambre thermostatée ou sur un diffuseur de chaleur transparent à l'oxyde d'indium-étain (ITO)¹⁹⁶. Cependant, l'utilisation de matériaux peu perméables comme le polycarbonate nécessite par exemple d'intégrer des systèmes automatisés de sondes à pH et O₂^{206,207}.

Dans de bonnes conditions de culture, la viabilité des cellules cultivées en biopuce est maintenue. Certaines études montrent également une prolifération cellulaire importante en 2D ou 3D suivant les topographies de surfaces (figure 24b)^{209,210}. Cela dépend du type cellulaire étudié. Ainsi, des cellules cancéreuses auront une prolifération supérieure aux cultures réalisées avec des cellules primaires. Le contrôle de l'activité cellulaire permet alors de déterminer l'état de la culture en biopuce¹⁵⁶. Des prélèvements du milieu de culture sont par exemple dosés pour déterminer la consommation de glucose, les synthèses d'albumine et d'urée pour les hépatocytes^{204,210,211}. Reconnue comme diminuant très rapidement *in vitro*, l'activité métabolique de phase I et II est également suivie afin de valider les conditions de culture et la possibilité de tester différentes substances dans les microréacteurs. Cette activité est suivie par des sondes fluorescentes couplées à la résorufine. Elle est également quantifiée par la détection, dans le milieu de culture, de certains métabolites dérivés de la testostérone et de la coumarine grâce à l'HPLC⁶⁴. Enfin, il est également possible de suivre l'activité de synthèse des enzymes du métabolisme ou des ARNs codant pour ces enzymes par Western-blot ou PCR quantitative. Ainsi, certains microréacteurs ont montré une stabilisation de l'activité métabolique (CYP 1A) du tissu cultivé après 7 jours, amenant à de possibles tests métaboliques²⁰⁶.

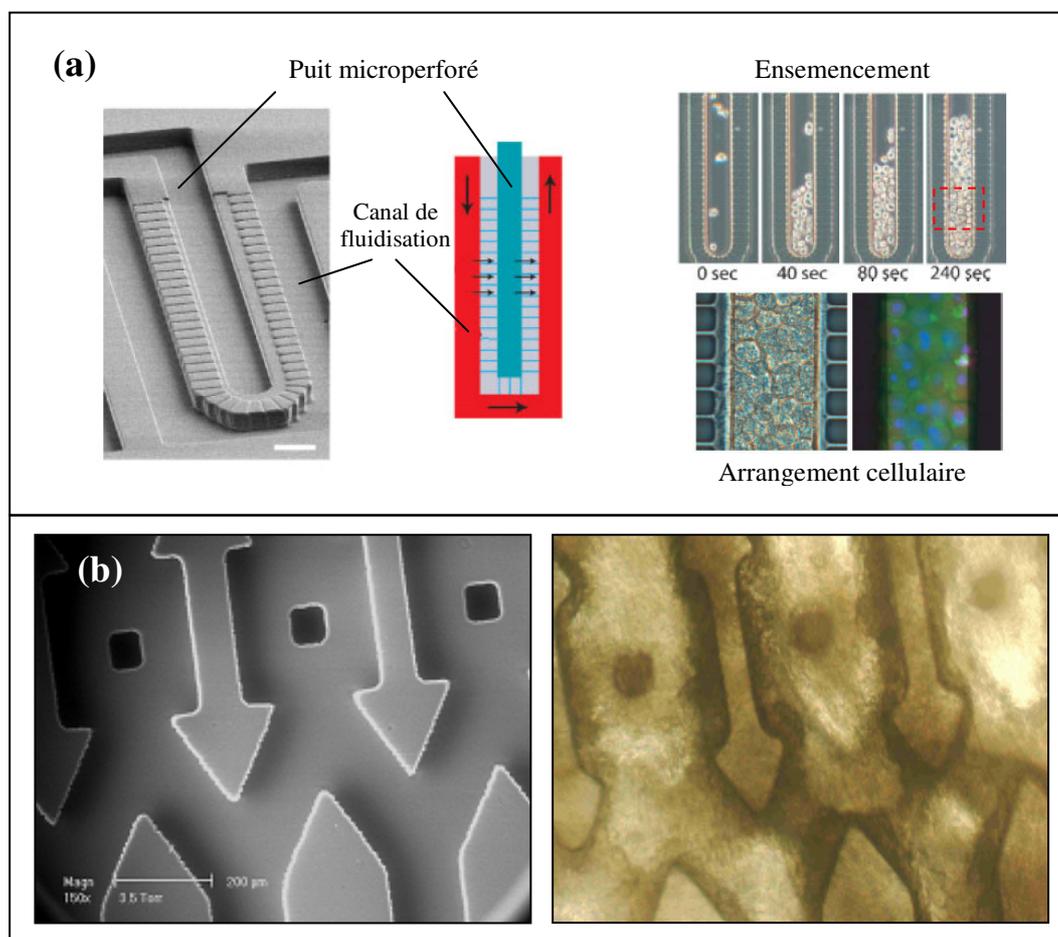


Figure 24: Photos du puits perforé permettant la culture d'hépatocytes à forte densité¹⁸⁴ et de microstructures avant et après colonisation cellulaire²¹⁰.

(a) Les parois perforées retiennent les cellules qui s'agglutinent au fond du puits. Ces mêmes perforations servent à alimenter les cellules en milieu nutritif. (b) Dans cette biopuce en PDMS, les microstructures sont positionnées dans le sens du flux. En 10 jours, les cellules fœtales hépatiques ont complètement colonisé les microstructures dans les trois dimensions, atteignant 3.10^7 cellules/cm³ (photos adaptées)^{184,210}.

4. Conclusion et introduction du sujet

De nombreux paramètres interviennent dans le devenir d'une substance au sein d'un organisme. Depuis l'absorption, jusqu'à l'élimination, une cascade d'événements biochimiques est susceptible de provoquer des effets secondaires ou de rendre une substance toxique. Malgré les difficultés liées aux conditions environnementales, l'utilisation de modèles tissulaires a permis d'identifier et de caractériser de nombreux paramètres impliqués dans les processus de toxicité. Cependant, il est aujourd'hui reconnu que ces modèles doivent évoluer afin de raffiner les résultats. Une des évolutions possibles identifiée par l'ingénierie tissulaire est de reproduire un environnement « physiologique » plus favorable au développement des cellules. Les microtechnologies, notamment avec le développement de la microfluidique et des techniques de microfabrication, permettent aujourd'hui de faire évoluer ces modèles par le contrôle simultané à l'échelle cellulaire de plusieurs paramètres. Des systèmes de culture beaucoup plus pertinents, possédant des caractéristiques proches de la physiologie sont actuellement en cours de développement afin de réaliser des criblages de substances chimiques ou médicamenteuses. Le maintien *in vitro* des fonctions cellulaires est lié à de nombreux paramètres tels que l'organisation du tissu dans les trois dimensions, l'apport homogène d'oxygène et de nutriments, les stimulations chimiques et physiques ...

L'équipe « organes artificiels » de l'Unité Mixte de Recherche CNRS 6600 de l'Université de Compiègne développe actuellement une biopuce de PDMS dans laquelle sont cultivées des cellules. Ces cultures *in vitro* sont réalisées dans des conditions de perfusion et présentent des résultats encourageant en termes de prolifération, réorganisation tissulaire et activité métabolique. Au delà d'utiliser ce concept comme système de reconstruction tissulaire, il semble aujourd'hui intéressant de développer cette biopuce comme un micro-organe pour réaliser des tests de toxicité sur substances chimiques ou pharmaceutiques.

Une étude de caractérisation de la biopuce comme modèle cellulaire *in vitro* de toxicité est présentée dans la suite de notre manuscrit. Pour cela, différentes conditions de cultures sont mises en œuvre : sur deux types cellulaires provenant du foie et du rein, trois débits (0, 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$) et trois chargements de chlorure d'ammonium (0, 5 et 10 mM) sont testés. En suivant le comportement de la biopuce pour ces différentes conditions de culture, il sera établi la faisabilité d'utiliser la biopuce comme un modèle *in vitro* pertinent.

Le travail décrit dans la suite du manuscrit est réalisé en plusieurs étapes.

La première étape consiste à valider une méthode de préparation du matériau de fabrication de la biopuce pour la culture cellulaire. Le matériau est alors dans un premier temps recouvert de protéine d'adhésion et testé de manière standard avec les deux types cellulaires choisis.

La seconde étape consiste à définir les concentrations de chlorure d'ammonium intéressantes pour notre modèle de culture *in vitro*. Ces tests de chargements sont réalisés avec plusieurs concentrations sur les deux types cellulaires dans des conditions standards de culture sur boîte de Pétri.

Après validation de la méthode de préparation du support et détermination des concentrations de NH_4Cl utiles pour notre étude, les biopuces sont fabriquées par un procédé de microfabrication que nous décrirons dans le chapitre « matériels et méthodes ».

La culture de cellules en biopuce est alors réalisée. 27 conditions de culture différentes sont testées expérimentalement pour chaque type cellulaire. Trois conditions de débits (0, 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$) sont étudiées avec trois densités cellulaires d'ensemencement pour trois chargements de NH_4Cl (0, 5 et 10mM). Durant cette phase expérimentale, les morphologies cellulaires sont observées, les cellules sont comptées afin de déterminer les taux de prolifération et des prélèvements de milieu sont effectués pour analyse biochimique. L'analyse des milieux de culture permet de suivre le métabolisme cellulaire et les variations de l'activité cellulaire pour les différentes conditions de culture.

Ainsi, l'activité des cellules hépatiques (C3A) est suivie au niveau de la consommation de glucose et glutamine, de la production d'ammoniac et albumine. L'activité des CYP1A2 est également déterminée. Le suivie d'activité des cellules rénales (MDCK) est suivie par la consommation de glucose et la production d'ammoniac. Les différentes techniques biochimiques de dosage sont décrites dans le chapitre III : Matériels et méthodes.

Les taux d'activités déterminés par les dosages des milieux de culture seront présentés et comparés dans le chapitre IV : Résultats. Pour chaque type cellulaire, des tableaux et graphiques comparent l'activité cellulaire pour les différentes conditions de culture, ce qui nous permet de caractériser et décrire le comportement de la biopuce.

La réponse de la biopuce sous les différentes conditions sera discutée au chapitre V et des enseignements seront tirés afin de faire évoluer notre biopuce vers un modèle *in vitro* adéquat pour la réalisation de tests de toxicité.

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

1. Microfabrication de la biopuce

Les étapes de fabrication de la biopuce sont présentées sur la figure 25. Il est décrit la fabrication des moules, le moulage et assemblage des répliques de PDMS.

1.1 Le Poly-diméthylsiloxane

La biopuce est fabriquée avec un polymère de poly-diméthylsiloxane (PDMS, Dow Corning, Sylgard 184). Ce silicone, très utilisé en micro-fabrication, permet de construire rapidement des pièces micro-structurées à l'échelle du micron²¹²⁻²¹⁴.

La faible énergie de surface et l'élasticité de ce silicone permettent un démoulage facile sans détérioration du moule ou de la pièce moulée. Les atomes de silicium et groupements méthyles qui constituent sa formulation chimique lui permettent un collage (bonding) réversible ou irréversible sur lui-même, le verre et le silicium²¹⁵. Le collage irréversible nécessite au préalable une activation de surface par plasma à oxygène¹⁶⁴. Stable entre -115°C et 350°C , le PDMS est stérilisé par autoclave. Transparent et perméable à l'oxygène, il est idéal pour produire des outils et biopuces appliqués à la biologie. La flexibilité, la mobilité de la chaîne siloxane et les très faibles interactions moléculaires font du PDMS un matériau souple diminuant ainsi le stress tissulaire. Cependant, la faible tension de surface (24mN/m) ou forte hydrophobicité (110°) diminuent l'adhésion moléculaire et cellulaire²¹⁶. Ceci est généralement contourné avec un traitement de surface par dépôt de matrice extra-cellulaire.

La première étape de fabrication de la biopuce consiste en la fabrication d'un moule réutilisable plusieurs fois¹⁶⁶.

1.2 Procédé de fabrication du moule

La géométrie de la future pièce est préalablement conçue par ordinateur et transcrite sur un papier transparent utilisé comme photomasque dans l'étape de photolithographie (figure 25).

Une résine photosensible SU8 2100 est étendue uniformément sur un substrat en Silicium (wafer) par tournette (spin-coater) à vitesse et durée contrôlées afin d'obtenir une épaisseur choisie. L'ensemble est ensuite placé sur une plaque chauffante (Prebake) à 65°C pendant 10 minutes afin de relâcher les contraintes d'étalement à l'intérieur de la résine. Une période d'évaporation élimine les solvants contenus dans la résine sur une plaque chauffante à 95°C pendant 30 minutes.

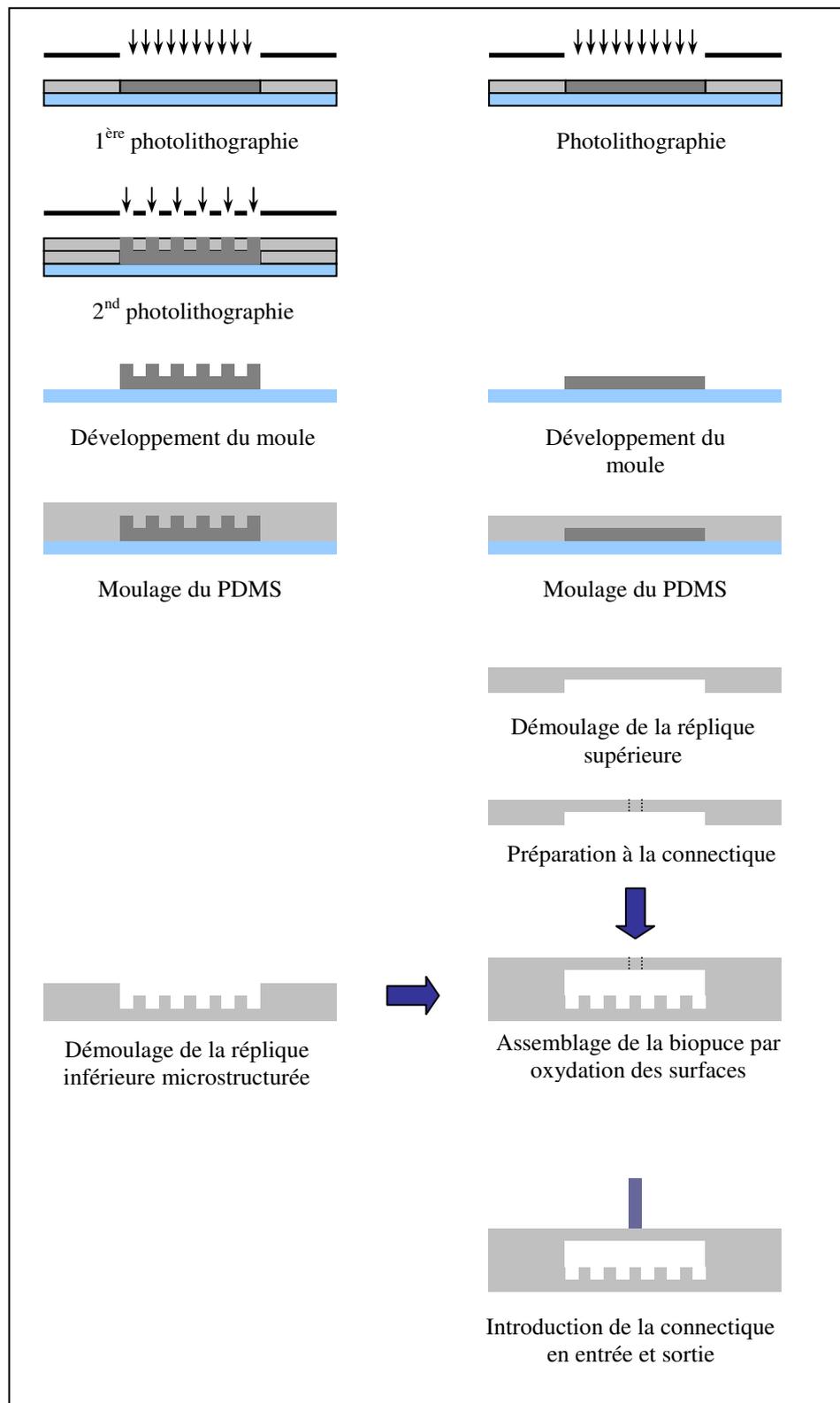


Figure 25 : Procédé de fabrication de la biopuce.

Les moules des répliques supérieure et inférieure (microstructurée) sont fabriqués par photolithographie. Deux photolithographies successives sont nécessaires à la réalisation du moule de la réplique inférieure. L'assemblage hermétique de la biopuce est réalisé par activation des surfaces.

Le photomasque est alors disposé au dessus du substrat. Une insolation, par rayonnements ultraviolets (10,1 mJ/cm², 365 nm) sur les zones transparentes du photomasque durant 55 secondes est réalisée. La polymérisation de la résine insolée est accélérée par une cuisson (Postbake) de 5 minutes à 65°C et 15 minutes à 95°C sur plaque chauffante. Un bain de 15-20 minutes de développeur (PM acétate) sous agitation permet de dissoudre la partie de la résine non polymérisée. Un rinçage par jet d'acétone et d'éthanol permet d'enlever les résidus. Le moule ainsi réalisé est ensuite séché à l'azote et recouvert d'une fine couche de PDMS qui le protège des poussières et agressions extérieures.

Cette étape de fabrication du moule est réalisée dans l'Unité Mixte de Recherche CNRS-SATIE/BIOMIS de Ker Lann par Laurent Griscom.

1.3 Description et assemblage de la biopuce

La construction d'une biopuce met en jeu deux couches de PDMS moulées, appelées communément répliques (figure 25). La réplique inférieure, micro-structurée (figure 26a) sert de surface d'adhésion aux cellules. Une vue 3D réalisée par ordinateur permet de se rendre compte du relief (figure 26b). D'une profondeur de 200 µm, elle contient des microchambres de 300x300x100 µm et des micro-canaux de 400x115x100 µm (figure 26c). L'espace destiné à la culture de cellules présente ainsi des hauteurs de 200 et 300 µm. La surface est de 1,2 cm². En tenant compte des microstructures, cela représente une surface d'adhésion cellulaire d'environ 2 cm² pour un volume de 30 µL environ.

Le moulage est réalisé avec du PDMS liquide mélangé à un agent curant dans un rapport 10 : 1 en masse. Après dégazage sous une cloche à vide durant quelques minutes, l'ensemble est alors répandu sur les moules. Après une cuisson de 2 heures à 80°C dans un four, chaque réplique est détournée avec un scalpel avant d'être démoulée. Des trous sont réalisés à l'aide d'un emporte-pièce à l'entrée et à la sortie de la réplique supérieure afin de ménager un espace pour la future connectique.

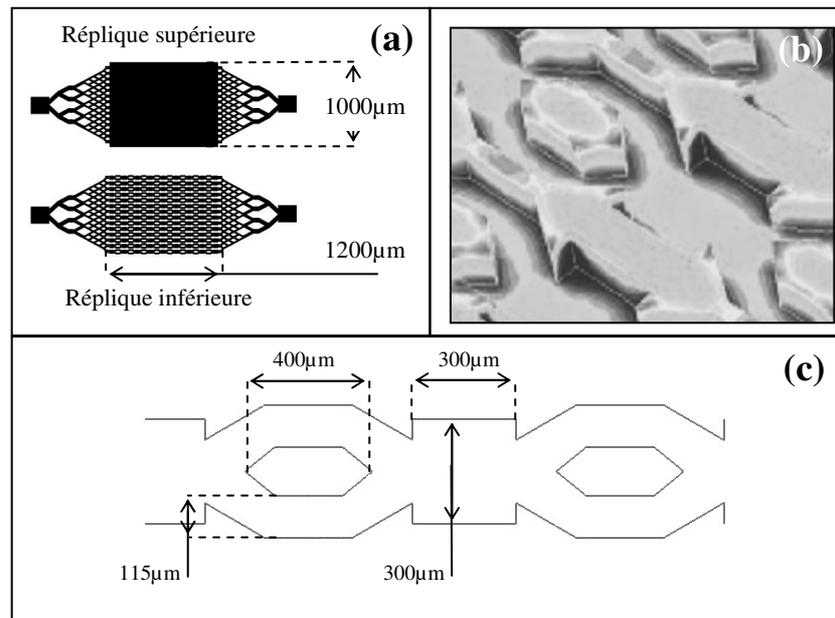


Figure 26 : Représentation et dimensionnement des répliques et microstructures de la biopuce.

Représentation des deux masques utilisés pour la photolithographie (a). Les deux empreintes ont les mêmes dimensions. L’empreinte en haut sert à la fabrication de la réplique supérieure de la biopuce. L’empreinte en dessous sert de masque pour la fabrication de la réplique inférieure, microstructurée. (b)

L’assemblage de la biopuce est réalisé par superposition de la réplique supérieure dépourvue de microstructures sur la réplique inférieure tel un couvercle (figure 25). Le scellement hermétique des deux répliques se fait par un collage définitif (activation par oxydation des surfaces au plasma d’air de 30 secondes).

Deux tuyaux en silicone de 2 cm de long sont introduits dans les trous d’entrée et sortie (figure 25). Le scellement de ces tuyaux se fait par une goutte de PDMS qui assure une fermeture hermétique après cuisson. Dans chaque tuyau d’entrée et sortie sont ensuite introduits, des connecteurs en polypropylène (raccord Luer femelle Bioblock, \varnothing 1,6 mm) utilisés comme interface avec une seringue de 1mL ou un circuit de perfusion.

Les figures 27 et 28 présentent différentes vues des microstructures et de la biopuce après fabrication.

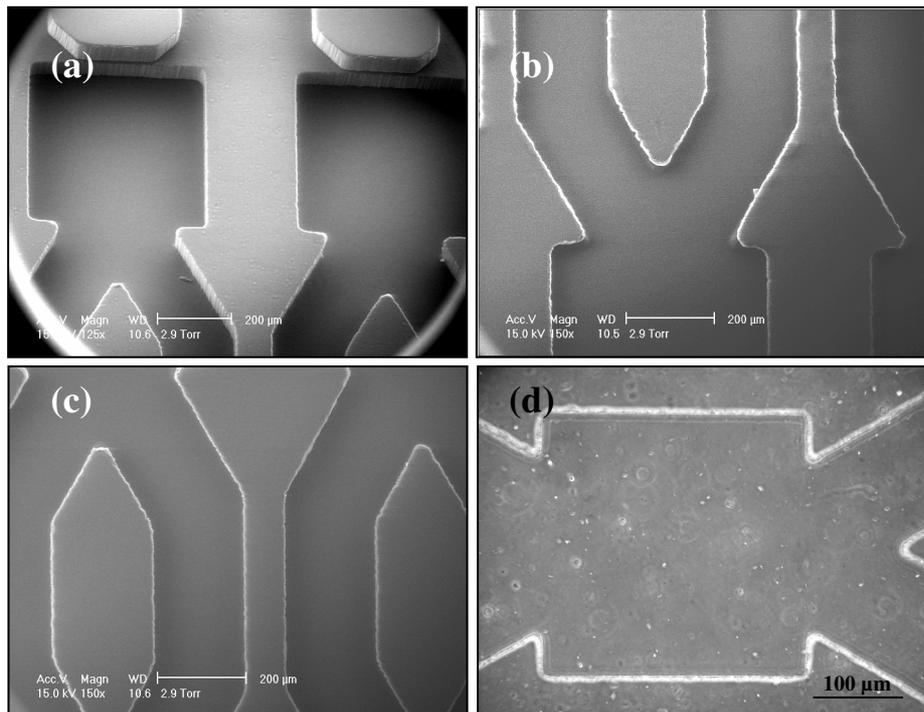


Figure 27 : Photos au microscope électronique à balayage de l'entrée de la chambre (a) et des microstructures (b,c). Photo au microscope optique (X10) des microstructures avant ensemencement cellulaire (d).

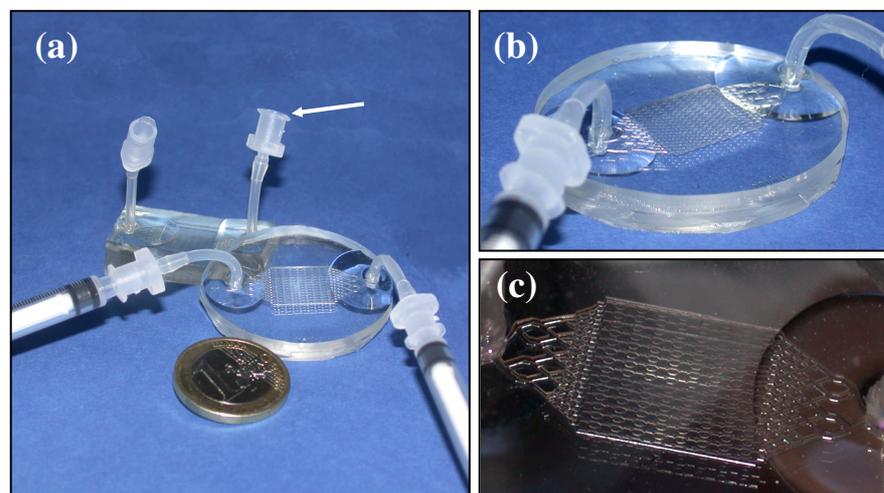


Figure 28 : Photos de la biopuce et des microstructures après assemblage.

Vue de deux biopuces avec et sans seringue 1 mL (a). La flèche montre un connecteur Luer femelle introduit dans une connectique et servant d'interface avec une seringue ou un circuit de perfusion. Photo d'une biopuce avec le réseau de microstructures (b). Vue des microstructures à travers le PDMS. Les canaux d'entrée permettent une distribution homogène du milieu sur les cultures cellulaires (c).

2. Culture cellulaire

2.1 Choix des cellules

Le foie et le rein sont deux organes qui jouent un rôle essentiel dans les phases de métabolisme et d'élimination des xénobiotiques. Du fait d'une importante vascularisation, ils sont soumis rapidement après absorption à de fortes concentrations en substances chimiques. Il nous apparaît donc essentiel de réaliser des biopuces sur ces deux types d'organe afin de modéliser *in vitro* les réponses cellulaires pour différents chargements chimiques. Notre choix cellulaire s'est porté dans un premier temps vers deux lignées cellulaires, proliférant rapidement et nécessitant le même milieu de culture afin de caractériser le comportement de la biopuce.

2.2 La lignée HepG2/C3A

Les HepG2/C3A ou C3A (ATCC-CRL-10741) sont des clones dérivant de la lignée cellulaire HepG2 sélectionnés pour leur production élevée d'albumine et d'alpha foeto-protéine. Leur morphologie est de type épithélial. Ces cellules adhérentes possèdent une forte inhibition de contact et sont capables de proliférer dans un milieu sans glucose. Elles sont régulièrement utilisées pour la mise en place de systèmes de suppléance hépatique²¹⁷. Des études récentes en sphéroïde présentent une morphologie proche de l'hépatocyte primaire avec la présence de canicules biliaires et de polarisation cellulaire. Il est également montrée dans cette étude une production stable d'urée et d'albumine sur 10 à 20 jours^{217,218}. Une activité enzymatique de phase I (CYP 1A, 2B6, 3A4)²¹⁹ et de phase II (UGT) supérieure à la monocouche est également illustrée²¹⁸.

2.3 La lignée MDCK

La lignée MDCK (Madin Darby Canine Kidney, ATCC-CCL-34) est la lignée cellulaire épithéliale la plus souvent utilisée pour l'étude *in vitro* de la prolifération et du métabolisme cellulaire. Dérivant d'un rein normal de femelle Cocker, elle est utilisée depuis les années 90 comme modèle d'étude des mécanismes de transport dans l'épithélium rénal. Les cellules MDCK se différencient en un épithélium à colonne formant des jonctions serrées (tight junctions TJ) proche de la surface apicale lorsqu'elles sont cultivées sur une membrane semi-perméable. Elles servent également de modèle pour l'absorption intestinale. Bien caractérisées (morphologie, résistance électrique, polarisation), elles fournissent un bon modèle *in vitro* pour l'étude du transport et des interactions entre médicaments. La polarisation en monocouche et les formations des TJ sont suivies grâce à la résistance électrique trans-épithéliale. Des clones existent montrant des résistances de 4000 Ωcm^2 et 200-300 Ωcm^2 . Du fait de sa ressemblance avec les cellules épithéliales de l'intestin, le clone possédant des résistances de 200-

300 Ωcm^2 est utilisé comme modèle cellulaire dans l'étude de l'absorption intestinale. Conservant des propriétés de prolifération rapide, la formation des jonctions cellulaires se fait dès le premier jour de culture. Ces cellules sont alors utilisables une semaine après la mise en culture. Cette rapidité de mise en place de la polarisation et de différenciation en fait un excellent modèle au regard des 3 semaines nécessaires pour la lignée intestinale Caco-2⁵⁶.

2.4 Entretien des lignées cellulaires

Les lignées C3A et MDCK sont cultivées dans des boîtes de culture cellulaire d'une surface de 75 cm^2 (T75), d'après les recommandations de l'ATCC. Le milieu de culture est constitué d'une base Minimal Essential Medium (MEM, Gibco), 2mM de L-glutamine (Gibco), 1mM de pyruvate de sodium (Gibco), 0,1mM d'acides aminés non essentiels (Gibco), 1% HEPES (Gibco) et 1,5g/L de sodium bicarbonate. Le milieu est enrichi de 10% de sérum de veau Fœtal. L'ensemble des cultures cellulaires en boîte et bio-puce sont réalisées dans un incubateur à 37°C, 5% de CO_2 . Les cellules sont détachées avec de la trypsine-EDTA (0,25%/0,53mM, Gibco) 7 jours après pour être utilisées expérimentalement ou sous cultivées dans une nouvelle boîte (ensemencement à 5 Millions/T75). Les cellules sont utilisées pour les expériences entre les passages 10 et 30. Une banque réserve est constituée dans des cryotubes. La conservation des cellules se fait en azote liquide dans du milieu de culture standard enrichie de 5% de DMSO (Sigma).

2.5 Milieu de culture enrichi en Chlorure d'ammonium (NH_4Cl)

Le chlorure d'ammonium est reconnu dans la littérature pour diminuer la prolifération cellulaire de manière importante. De plus, les ions NH_4^+ qui le composent sont physiologiquement en contact avec le foie et le rein (paragraphes 1.2.3. et 1.2.4. du chapitre II). L'objectif de ce premier modèle est de caractériser la réponse de la biopuce en sa présence avec les lignées C3A et MDCK.

Le chlorure d'ammonium (NH_4Cl) est préparé en solution stock de 100 mM dans de l'eau déionisée. Etant très volatile, le chlorure d'ammonium est conditionné en aliquotes de 15 mL, fermées et filmées. Il est conservé à 4°C. Le chlorure d'ammonium est mélangé dans le milieu de culture complet au moment de l'expérience.

2.6 Culture cellulaire en puits

Les tests préliminaires sont réalisés dans des plaques 12 puits (3,8 cm²/puits) en Polystyrène (Tissue Culture PolyStyrène : TCPS). Quatre revêtements ont été testés dans un premier temps pour caractériser l'adhésion des cellules : le fond de puits brut noté TCPS, le fond de puits avec un dépôt de fibronectine noté TCPS + FN, le fond de puits recouvert de PDMS noté PDMS et le fond de puits recouvert de PDMS et d'un dépôt de fibronectine noté PDMS + FN.

Les tests réalisés dans un second temps avec des chargements en chlorure d'ammonium sont effectués sur des puits recouverts de PDMS et de fibronectine (PDMS + FN).

Le protocole de préparation des puits PDMS + FN est décrit ci-dessous. La préparation des puits recouverts de PDMS uniquement se fait de la même manière en omettant l'étape de dépôt de fibronectine.

Le PDMS liquide est mélangé à l'agent curant dans un rapport 10 : 1 en masse. Après dégazage sous une cloche à vide durant quelques minutes, l'ensemble est alors répandu dans chaque puits à raison de $0,5 \pm 0,1$ g/puits. Après une cuisson de 2 heures à 80°C dans un four, les plaques multi-puits sont refermées avec leur couvercle.

La stérilisation de la surface est réalisée par éthanol 70% (15 minutes). Après 3 rinçages au PBS (Phosphate Buffer Saline), la surface de PDMS est préparée à la culture de cellules sur fibronectine. Les puits sont remplis avec 10 µg/mL de fibronectine (Roche). Après une incubation de 1 heure à 37°C, chaque puits est rincé avec du PBS. Les cellules sont alors introduites avec 2 mL de milieu complet dans chaque puits. L'adhésion est faite durant une nuit en incubateur 37°C, 5% CO₂.

3. Culture cellulaire en biopuce

3.1 Organisation temporelle de l'expérimentation

L'expérimentation se déroule sur une semaine. Chaque expérience peut être séparée en deux phases qui sont la préparation des biopuces et la phase de l'expérience. La figure 29 présente la répartition temporelle de ces phases ainsi que les différentes tâches qui les composent.

La phase de préparation permet d'entamer la phase expérimentale dans de bonnes conditions avec le nettoyage, la stérilisation, le dépôt de matrice extracellulaire, l'ensemencement et l'adhésion cellulaire (gris clair sur la figure 29).

Il est possible de distinguer en gris foncé, la phase expérimentale qui comprend le comptage initial et final des cellules, les prélèvements et changements de milieu de culture ainsi que la mise en condition des biopuces (statique, dynamique, chargement en chlorure d'ammonium ...) dont la durée est de 72 heures. L'expérimentation est clôturée par un nettoyage immédiat des biopuces.

Les différentes tâches qui constituent ces deux phases sont décrites dans la suite du manuscrit.

3.2 Préparation de la biopuce

La biopuce est stérilisée par autoclave à chaleur humide (121°C, 20 minutes, surpression de 100 Kpa). Après un séchage de 30 à 40 minutes dans un four à 80°C, 300 µL de fibronectine à 10 µg/mL sont perfusés dans la biopuce à l'aide de deux seringues de 1mL. Après une incubation de 1 heure à 37°C, un rinçage est fait par perfusion de milieu de culture. Les cellules préalablement amplifiées en boîte de culture T75 sont détachées par traitement enzymatique à la trypsine-EDTA. Après comptage sur lame de Malassez, les cellules sont suspendues dans du milieu de culture à une concentration comprise entre 2 et 9 millions/mL fonction de la densité cellulaire souhaitée (tableau 1).

Concentration cellulaire (10 ⁶ cellules/mL)	Quantité ensemencée (10 ⁶ cellules/biopuce)
2	0,1 - 0,3
5	0,4 - 0,6
9	0,7 - 1,1

Tableau 1 : Relation entre la concentration cellulaire inoculée et la quantité cellulaire ensemencée dans la biopuce.

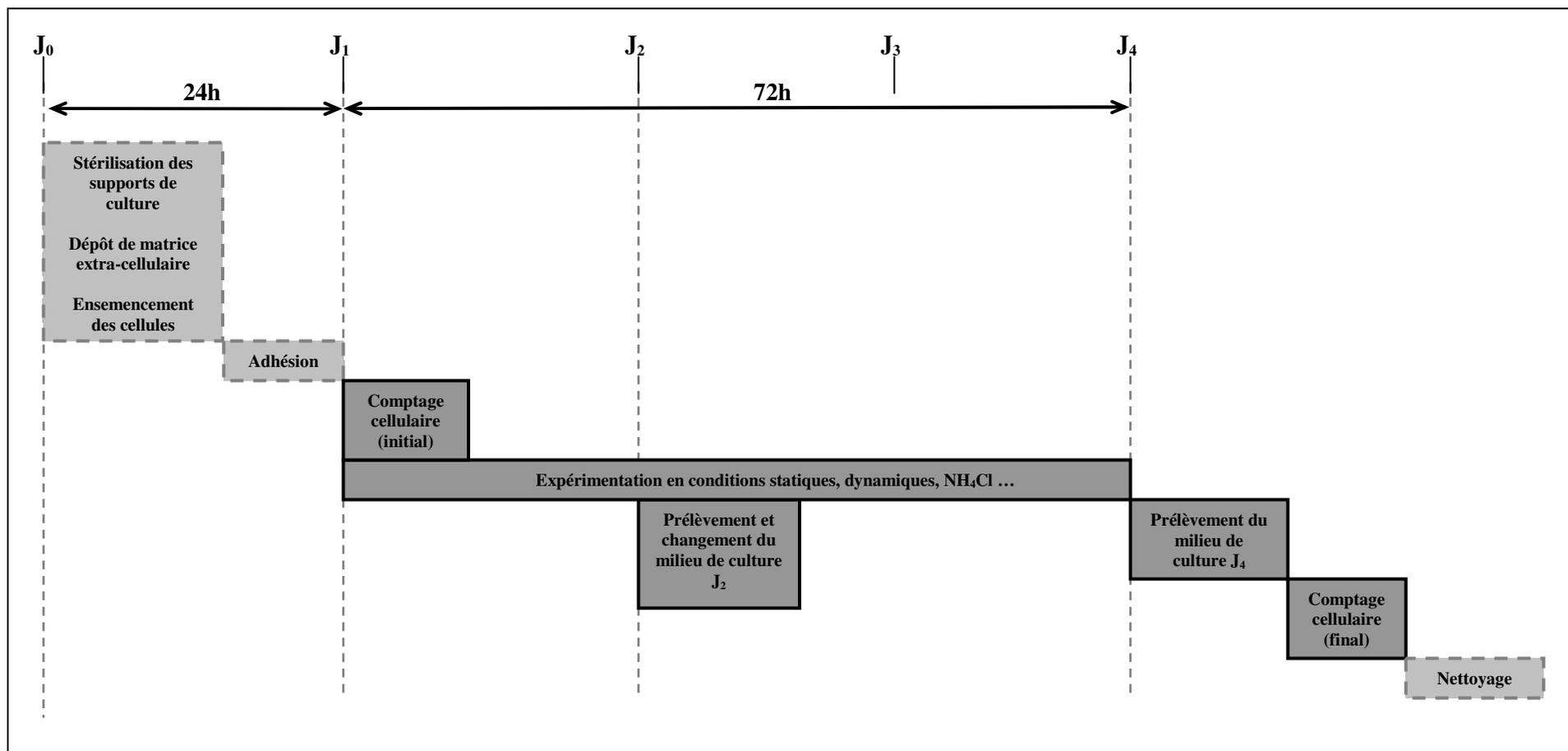


Figure 29 : Représentation graphique des étapes expérimentales réalisées pour la culture en biopuce.

Les cellules diluées dans 300 μL de milieu sont inoculées dans la biopuce à l'aide de deux seringues de 1mL. L'adhésion des cellules sur la surface microstructurée se fait sans flux durant une incubation d'une nuit à 37°C, 5% CO_2 . Après cette phase d'adhésion, le tapis cellulaire est débarrassé des cellules non adhérentes par deux rinçages avec du milieu complet.

Un lot de biopuces ($n=3$) est alors choisi pour effectuer le premier comptage cellulaire et rendre compte de la quantité de cellules initialement ensemencées (figure 29). Les cellules sont détachées à l'aide de trypsine-EDTA et comptées sur lame de Malassez. Ce dénombrement est appelé comptage J_1 par la suite. Les autres biopuces sont ensuite mises en conditions de culture dîtes statique et/ou dynamique.

3.3 Culture en condition statique

La culture en condition statique se fait avec 500 μL de milieu complet. Une légère pression est appliquée dans la biopuce à l'aide de deux seringues (TERUMO) de 1mL pour éviter la formation de bulles (une vue de la biopuce connectée aux seringues est disponible sur la figure 28a). L'ensemble est alors déposé dans un incubateur 37°C et 5% CO_2 . Cette situation correspond dans la suite du manuscrit à la condition 0 $\mu\text{L}/\text{min}$.

3.4 Culture en condition dynamique

Le circuit de perfusion se compose d'un tuyau en silicone qui relie les différents éléments du circuit. Les éléments qui constituent le circuit de perfusion sont une pompe péristaltique (Minipuls, GILSON), une trappe à bulle (MEDICOLAB) et deux connecteurs à vis (Luer Lock mâle et Luer lock femelle, \varnothing 1,6 mm) (figure 30).

Le circuit est rempli de 3mL de milieu complet par la trappe à bulles et le milieu est perfusé à grande vitesse afin d'éliminer les bulles dans les connecteurs. Après arrêt de la pompe, le circuit est clampé, ouvert et la biopuce est connectée au circuit. Cette connexion se fait grâce aux connecteurs préalablement intégrés à la biopuce et au circuit de perfusion. La pompe est alors remise en fonctionnement. Après 5 minutes de perfusion, l'ensemble est introduit dans un incubateur à 37°C, 5% CO_2 .

Les pompes péristaltiques utilisées permettent de perfuser jusqu'à 4 circuits en même temps. Durant cette étude, nous avons utilisé plusieurs pompes en parallèle, ce qui nous a permis d'expérimenter différentes conditions de culture cellulaire. Les conditions dynamiques ont été étudiées pour des débits de 10 ou 25 $\mu\text{L}/\text{min}$.

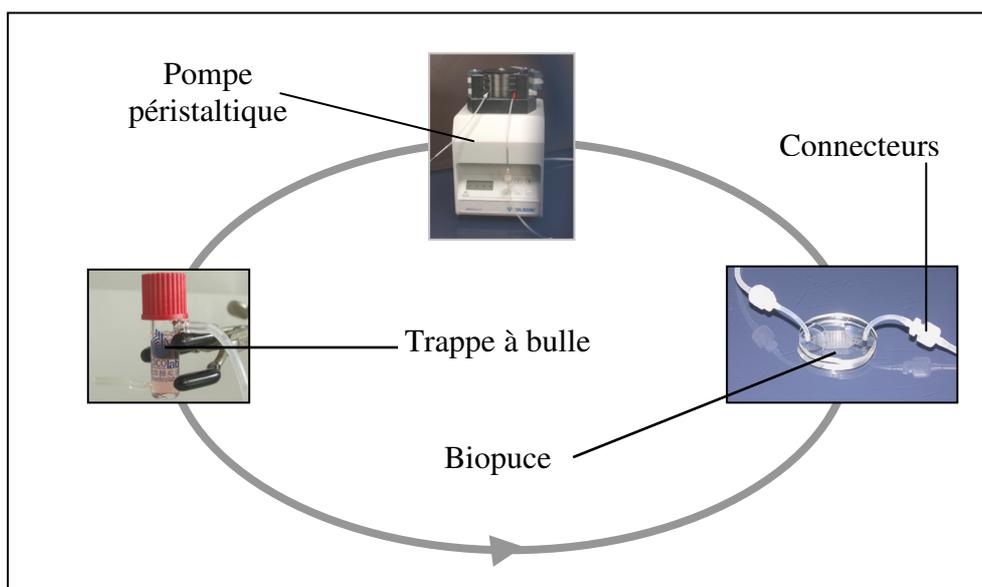


Figure 30 : Schéma du circuit de perfusion.

Le circuit est muni d'une pompe péristaltique délivrant des débits de 10 ou 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, une trappe à bulle par laquelle est fait le remplissage et le prélèvement de milieu de culture et une biopuce contenant des cellules. La biopuce est connectée au circuit de perfusion grâce à deux connecteurs à vis permettant un montage/démontage relativement aisé.

3.5 Prélèvement et changement de milieu 24 heures après le début de l'expérience (J₂)

Un prélèvement du milieu pour toutes les conditions de culture est réalisé 24 heures après le début de l'expérience. En condition statique, le milieu est prélevé et changé à l'aide d'une des deux seringues connectées. Il est prélevé un volume de 500 μL en condition statique. En condition dynamique, la pompe est arrêtée, la trappe à bulle est ouverte et 1100 μL de milieu sont prélevés et remplacés par 1300 μL de milieu neuf. Ces prélèvements sont stockés au congélateur avant d'être analysés. Ils sont annotés de l'indicatif « J₂ », dans la suite du manuscrit.

3.6 Arrêt des expériences après 96 heures de cultures (J₄)

Après 96 h de culture (incluant 72 h de culture dynamique et/ou statiques après le comptage J₁), les cultures cellulaires sont arrêtées. Pour les conditions dynamiques, la pompe est stoppée, le circuit est clampé pour permettre de déconnecter la biopuce sans perte du milieu de culture. Ce dernier est prélevé intégralement et conservé au congélateur jusqu'à analyse. La biopuce est alors connectée à deux seringues de 1mL pour conserver l'intégrité du tissu. Pour les conditions statiques, le milieu est

également récupéré et congelé. Ces prélèvements sont annotés par l'indicatif «J₄» dans la suite du manuscrit. 500 µL de trypsine-EDTA sont perfusés dans les biopuces afin de détacher et compter les cellules. Une observation au microscope optique permet de s'assurer que toutes les cellules sont détachées. Le comptage se fait sur lame de Malassez.

Après détachement des cellules, de l'eau déminéralisée est perfusée dans la biopuce pour rinçage. Du Sodium Dodécyl Sulfate (SDS, Sigma) à 2% est perfusé avec les seringues durant 30 minutes pour nettoyage suivi de trois rinçages abondants à l'eau déminéralisée. L'extérieur de la biopuce est également lavé dans de l'eau déminéralisée. Les connecteurs sont démontés et javellisés durant 5 minutes puis rincés abondamment à l'eau déminéralisée. Après un séchage en étuve, les connecteurs sont remontés sur la biopuce qui sera réutilisée pour une nouvelle culture de cellules. Les circuits de perfusion sont également javellisés puis rincés abondamment à l'eau déminéralisée. Une fois séchés, les circuits sont remontés en vue d'une nouvelle stérilisation.

4. Analyses

4.1 Viabilité cellulaire

La viabilité est estimée par la mesure du Lactate DésHydrogénase (LDH) sur des prélèvements des milieux de culture J₂ et J₄.

Pour cela, le kit Cytotox96[®] (Promega kit) est utilisé suivant les instructions du constructeur. La lecture de la densité optique est réalisée avec un lecteur de plaque (Biorad model 550, Microplate reader) à 490nm. La LDH est quantifiée par un test enzymatique. La réduction de NAD⁺ en NADH/H⁺ par la LDH conduit dans un premier temps à la conversion du lactate en pyruvate. Dans un second temps, le transfert de proton catalyse la réaction de transformation du 2-p-(iodophényl)-3-(p-nitrophényl)-5-phényltétrazolium chloride (INT) en formazan. La concentration en formazan est déterminée par la densité optique (DO) détectable à 492nm.

Une gamme étalon est réalisée sur plusieurs échantillons cellulaires dont le nombre de cellules est connu. Les cellules sont lysées par congélations et décongélations successives à l'azote liquide et le test LDH est effectué. Ceci permet d'établir une correspondance Densité Optique LDH/Nombres de cellules lysés afin de calculer un pourcentage cellulaire durant l'expérimentation. Chaque type cellulaire contient sa propre quantité de LDH, le test est donc effectué sur les deux types étudiés (figure 31).

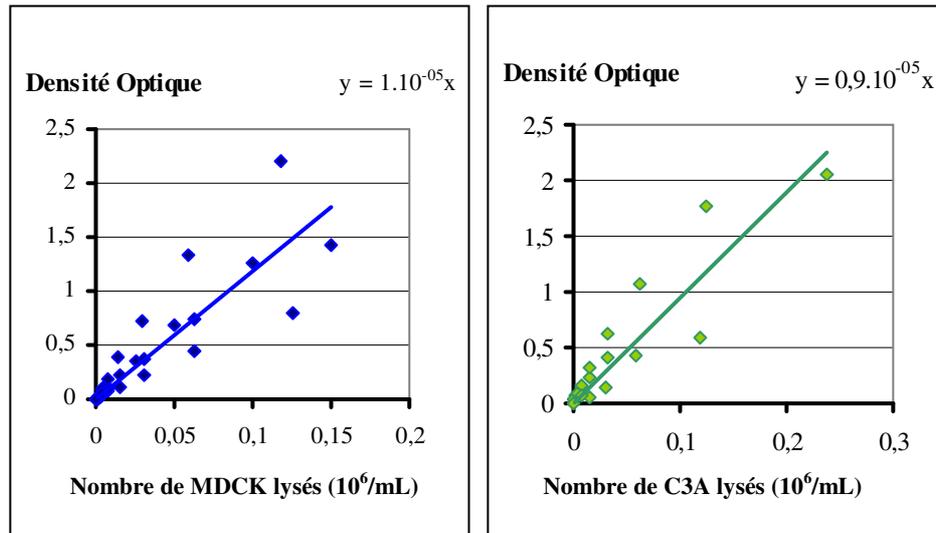


Figure 31 : Courbes étalons de la LDH relarguée par les cellules MDCK et C3A après lyse cellulaire (n=3).

L'équation associée au relargage de la LDH par les cellules MDCK est :

$$[\text{eq 1}] \quad \text{DO} = 1.10^{-5} \cdot (\text{Nb MDCK lysés}).$$

L'équation associée au relargage de la LDH par les cellules C3A est :

$$[\text{eq 2}] \quad \text{DO} = 0,9.10^{-5} \cdot (\text{Nb C3A lysés}).$$

L'estimation du nombre de MDCK lysés durant l'expérience se fait par la formule :

$$[\text{eq 3}] \quad \text{Nb cellules}_{\text{lysées expérience}} = ((\text{DO}_{\text{échantillon}} - \text{DO}_{\text{milieu basal}}) / 1.10^{-5}) \times \text{Vol}$$

L'estimation du nombre de C3a lysés durant l'expérience se fait par la formule :

$$[\text{eq 4}] \quad \text{Nb cellules}_{\text{lysées expérience}} = ((\text{DO}_{\text{échantillon}} - \text{DO}_{\text{milieu basal}}) / 0,9 \cdot 10^{-5}) \times \text{Vol}$$

Le pourcentage de cellules lysées est calculé par la formule :

$$[\text{eq 5}] \quad \% = (\text{Nb cellules}_{\text{lysées expérience}} / \text{Nb cellules}_{\text{totales}}) \times 100$$

Vol : correspond au volume au moment du prélèvement.

Nb cellules_{totales} : correspond au nombre de cellules comptées à J₁ ou J₄

4.2 Calculs des consommations et productions cellulaires

Nous considérons :

Le milieu de départ avec une concentration $C_{\text{départ}}$ et un volume $V_{\text{départ}}$.

Le milieu apporté à J_2 avec une concentration C_{apport} et un volume V_{apport} .

Le milieu prélevé à J_2 avec une concentration C_{J_2} , et un volume V_{J_2} .

Le volume dans le système à J_2 $V_{\text{total}J_2}$,

Le milieu récupéré à J_4 avec une concentration C_{final} et un volume final V_{final} .

Nous calculons pour les consommations à J_2 :

$$\text{[eq 6]} \quad \text{Conso}_{J_2} = (C_{\text{départ}} \times V_{\text{départ}}) - (C_{J_2} \times V_{\text{total}J_2})$$

Nous calculons pour les consommations entre J_2 et J_4 :

$$\text{[eq 7]} \quad \text{Conso}_{J_4} = (C_{J_2} \times V_{\text{total}J_2}) + (C_{\text{apport}} \times V_{\text{apport}}) - (C_{J_2} \times V_{J_2}) - (C_{\text{final}} \times V_{\text{final}})$$

Ce qui donne :

$$\text{[eq 8]} \quad \text{Conso}_{J_4} = C_{J_2} \times (V_{\text{total}J_2} - V_{J_2}) + (C_{\text{apport}} \times V_{\text{apport}}) - (C_{\text{final}} \times V_{\text{final}})$$

Les productions sont calculées de la même manière avec une inversion de signe.

Les résultats de production et de consommation sont normalisés par million de cellules et par heure.

4.3 Dosage de l'ammoniac

La dégradation des acides aminés telle que la glutamine produit de l'ammoniac^{213,220}. L'ammoniac contenu dans les échantillons prélevés à J_2 et J_4 est analysé par une méthode indirecte : l'alpha-ketoglutarate synthétise le L-glutamate en présence de NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide). Durant la formation du L-glutamate, la réduction du NADH en NAD conduit à la décroissance d'absorbance à 340 nm. Cette décroissance est proportionnelle à la concentration d'ammoniac présente dans les échantillons. La gamme du test est comprise entre 0 et 300 $\mu\text{mol/L}$.

Ce dosage est réalisé à l'aide d'un automate de biochimie (Konelab 20 biochemical analyzer, Thermo Electron Corporation) et du kit de dosage de l'ammoniac NH₃ AM1015 (Randox Laboratories LTD)

4.4 Dosage du glucose

Elément essentiel au métabolisme cellulaire, le glucose présent dans chaque prélèvement est déterminé avec deux réactions enzymatiques en cascade. La première consiste à transformer le glucose en D-gluconate et H₂O₂ par la glucose oxydase (GOD). En présence de peroxydase, l'H₂O₂ oxyde la 4-aminoantipyrine et le phénol conduisant à la production de quinone-imine. L'intensité lumineuse de la quinone-imine est mesurée à 510 nm. La gamme du test est comprise entre 0 et 100 mg/dL.

Ce dosage est réalisé à l'aide d'un automate de biochimie (Konelab 20 biochemical analyzer, Thermo Electron Corporation) et du kit de dosage du glucose GOD-POD (Thermo-Electron Corporation)

4.5 Dosage de l'albumine

Protéine majoritaire du plasma sanguin, le foie est le seul organe à synthétiser l'albumine. Cette protéine est détectée par une technique ELISA sandwich réalisée en plaque 96 puits (Maxisorb, NUNC). Les fonds de puits sont sensibilisés durant une nuit à 4°C avec un anti IgG albumine humaine (Cappel ; réf. 55028 ; lot : 03284 ; dilution 1/2000) repris dans du tampon carbonate (0,1 M, pH= 9,5). La passivation est faite après lavages des puits par une solution de Gélatine (2%) et tween 20 (0,1%) dilués dans du PBS. Après une heure d'incubation à 37°C, la plaque est rincée et les échantillons dilués dans du milieu de culture et tween 20 (0,1%) sont placés au fond des puits. Le lavage des puits sera ensuite réalisé après 90 minutes d'incubation à 37°C. Une solution d'anti IgG albumine humaine couplée à la peroxydase (Cappel ; réf. 55235 ; lot : 03806 ; dilution 1/8000) est ensuite introduite pour 1 heure d'incubation à 37°C. Après lavage, la peroxydase est révélée par un tampon de citrate (0,05M, pH=7,4), H₂O₂ 30% et OPD (O-Phénylènediamine Dihydrochloride, Sigma) à 5mg. La réaction de révélation est arrêtée à l'acide sulfurique 2N et la plaque est lue à 490nm (Biorad model 550, Microplate reader).

4.6 Dosage de la glutamine

La glutamine joue un rôle important en tant que constituant des protéines et intervient dans de nombreuses voies métaboliques. L'ammoniac formé par la fixation de l'azote est assimilé en composé organique par la conversion de l'acide glutamique en glutamine. Ainsi, 1/3 de l'azote dérivé du métabolisme des protéines est transporté dans le sang sous forme de glutamine. Cette conversion est réalisée par la glutamine synthétase. Elle représente ainsi une source importante de carbone et d'azote pour la synthèse des acides aminés et acides nucléiques. Elle joue également un rôle dans le contrôle de l'oxydo-réduction cellulaire par le glutathione et le glutamate dont elle est précurseur. Considérée également comme substrat énergétique, son oxydation génère de l'Adénosine Triphosphate (ATP).

Le dosage de la glutamine est réalisé avec le kit Glutamin assay GLN-2 (Sigma) dans les conditions préconisées par le constructeur²²¹. La L-glutamine, désaminée est quantifiée directement par la liaison du colorant au produit issue de la réaction enzymatique. Les échantillons sont incubés à l'obscurité durant 1 heure à 37°C en présence du substrat enzymatique. Le réactif coloré est ajouté et incubé 5 minutes à l'obscurité à température ambiante avant lecture via un spectrophotomètre à 550nm. Une gamme étalon est dosée à chaque test.

4.7 Quantification de l'activité des CYP 1A2

L'activité est évaluée par les modulations de l'activité enzymatique sur l'éthoxyrésorufine-o-dé-éthylase (EROD) qui reflète l'activité des CYP 1A²⁰⁶. L'éthoxyrésorufine, de faible fluorescence est transformée en présence des CYP 1A en résorufine, produit très fluorescent (figure 32a). La fluorescence de la résorufine est caractérisée par un pic d'excitation à 530 nm et un pic d'émission à 590nm²²².

La concentration utile en éthoxyrésorufine est établie à 10 μ M dans la littérature (figure 32b)^{206,223}. Après un rinçage réalisé avec du milieu de culture chargé en éthoxyrésorufine à 10 μ M, 300 μ L de cette solution sont perfusés sur les cellules. Après une incubation à 37°C, 5% CO₂, à l'abri de la lumière durant 1 heure, la solution d'incubation est récupérée en plaque 96 puits. La fluorescence émise par la résorufine est excitée à 535 nm et lue à 595 nm (fluorimètre TECAN, Spectrafluor plus, logiciel Magellan). Une gamme étalon de résorufine (R3257 Resorufin sodium salt, Sigma) est réalisée juste avant lecture (figure 32c). L'auto-fluorescence des milieux de culture avec et sans éthoxyrésorufine est systématiquement contrôlée et prise en compte pour la quantification de la résorufine présente dans la biopuce. La quantité de résorufine transformée est normalisée par million de cellules et par heure.

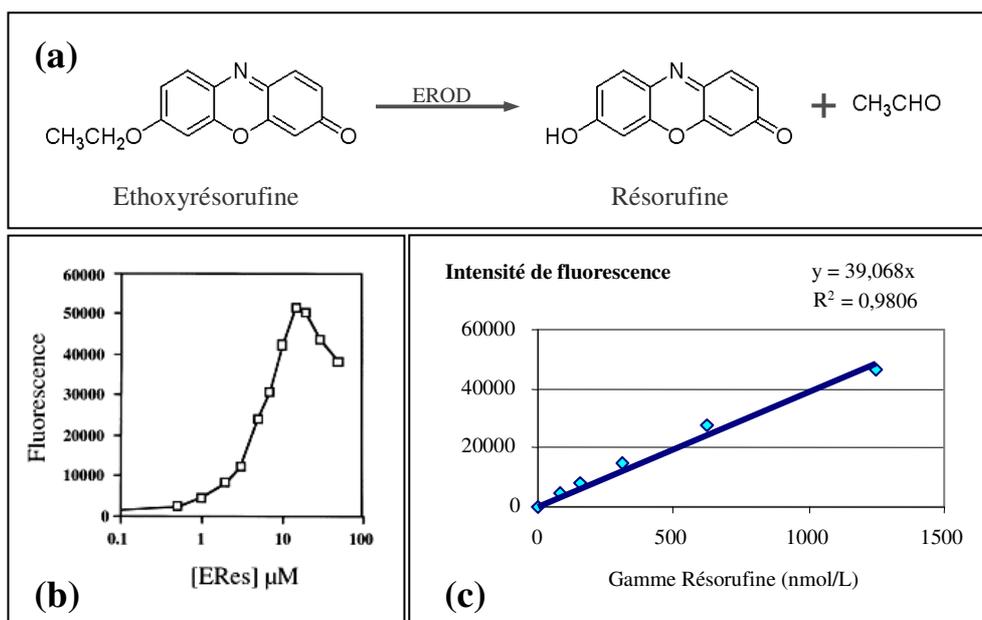


Figure 32 : Représentation de la dé-éthylation de l'éthoxyrésorufine (ERES) en résorufine (a) et gammes associées (b) (c).

Le réaction de dé-éthylation de l'ERES produit un composé fluorescent, la résorufine (excitation 530nm ; émission 590nm) (adapté de Sigma-Aldrich.com) (a). Essai de fluorescence pour différentes concentrations en éthoxyrésorufine sur des cultures cellulaires C3A (b)²²³. Gamme étalon de résorufine réalisée à des temps différents (n=3) (c).

5. Choix de la représentation graphique et du test statistique

5.1 Choix de la représentation graphique

Dans cette étude, la population d'échantillon est de taille limitée, nous sommes dans un cas de petit échantillon (10 à 30) voire très petit échantillon pour certaines conditions (3 à 10). Il est alors très difficile d'estimer la normalité de la distribution. La représentation graphique de ces petits échantillons se fait par un diagramme de Tukey (boîte et moustaches) préférant la médiane et les quartiles à la moyenne et écart-type comme valeur centrale et indices de distribution. Cependant, les représentations graphiques sont généralement réalisées par des histogrammes (graphique à barres) sur la moyenne et écart-types dans la littérature. Nous avons donc choisi cette représentation afin de faciliter la lecture des résultats. Les tests statistiques sont par contre réalisés sur chaque valeur mesurée afin de s'approcher au plus près de la réalité expérimentale.

5.2 Choix du test statistique

La normalité de la distribution étant difficilement estimable dans notre étude, il est préférable d'utiliser un test statistique non paramétrique. Notre étude est basée sur la comparaison de plusieurs conditions de culture en biopuce : les débits, les densités et les concentrations en chlorure d'ammonium. Les résultats d'une condition sont complètement indépendants des résultats d'une autre. Nous travaillons donc ici avec plusieurs échantillons indépendants. Les mesures réalisées sur les individus sont quantitatives (nombre de cellules, concentrations en glucose, concentrations en glutamine...). Les valeurs sont dites en *échelle d'intervalle*. Lorsqu'une expérience contient plus de deux échantillons indépendants de petite taille, on utilise le test de Kruskal & Wallis (KW) sur les rangs en remplacement de l'analyse de variance. Si cette analyse indique un effet global significatif, cela indique que l'un au moins des groupes diffère significativement d'au moins l'un des autres groupes. Siegel & Castellan (p.213) proposent une solution non paramétrique, utilisable à la suite du test de KW²²⁴ afin de déterminer l'emplacement des différences significatives.

Nous avons donc utilisé le test statistique de KW suivi d'une comparaison des échantillons afin d'identifier les différences significatives. Les tests de Kruskal & Wallis sont réalisés avec un utilitaire développé sous Excel par P. Georgin et M. Gouet²²⁵. Les comparaisons deux à deux entre les échantillons sont effectuées à l'aide d'un utilitaire développé sous Excel par G. Le Pape. Ces deux utilitaires sont téléchargeables librement sur Anastats.fr. Les différences significatives sont représentées par le facteur de risque d'erreur α sur les histogrammes au chapitre IV qui traitent des résultats.

Les valeurs prises par α sont notées de la manière suivante :

**** pour $\alpha \leq 2,5\%$

*** pour $\alpha \leq 5\%$

** pour $\alpha \leq 7,5\%$

* pour $\alpha \leq 10\%$

CHAPITRE IV : RESULTATS

1. Résultats des tests préliminaires réalisés sur les C3A

1.1 Test de revêtement de fibronectine avec les cellules C3A

Les cellules C3A sont cultivées durant 72 heures sur quatre types de revêtements : fond de boîte TCPS avec et sans traitement à la fibronectine et PDMS avec et sans dépôt de fibronectine. Les cellules sontensemencées dans les puits préalablement préparés et après une nuit d'adhésion, un premier comptage noté au temps 0 h est réalisé en tripléte. Le suivi des cultures est ensuite réalisé toutes les 24 heures. La figure 33 présente les résultats de ces comptages pour les quatre conditions de cultures. Les photos des morphologies cellulaires réalisées au microscope optique sont présentées en figure 34.

Le comptage à 0h fait état du nombre de cellules adhérees sur les fonds de puits au début de l'expérience. Les cultures sur TCPS, TCPS+FN et PDMS+FN présentent une quantité de cellules adhérees de $0,09 \pm 0,02.10^6$ cellules/cm². Les cultures sur PDMS par contre présentent un nombre de cellules inférieur avec $0,005 \pm 0,004.10^6$ cellules/cm². Les photos de la figure 34 illustrent ces différences d'adhésion avec des cellules étalées sur les surfaces de TCPS (34a) et de PDMS+FN (34b) tandis que les cellules mises en culture sur PDMS (figure 34c) sont retrouvées agglomérées les unes aux autres. Ces cellules non adhérees sont alors éliminées dès le premier rinçage ce qui explique le faible nombre de cellules comptées pour la condition de culture sur PDMS. Cette quantité de cellules est significativement plus faible que les conditions en Pétri TCPS ($\alpha=10\%$) et TCPS+FN ($\alpha=5\%$).

Pour les cultures présentant une adhésion cellulaire sur TCPS, TCPS+FN et PDMS+FN, il est constaté une différence morphologique. En présence de fibronectine, les C3A sont étalés sur la surface. De nombreuses cellules sont isolées les unes des autres ce qui permet un recouvrement important de la surface. Cet étalement est illustré sur la figure 34(b). Sans fibronectine, les cellules adhérees sur TCPS sont regroupées en îlots avec par endroit des cellules en superposition (figure 34a). Ces différences morphologiques d'adhésion sont encore visibles après 72 heures au niveau des espaces vides présents sur la figure 34(e) (flèches).

Bien que les morphologies soient différentes, les quantités de cellules pour les conditions sur TCPS, TCPS+FN et PDMS+FN sont proches à 24, 48 et 72 heures de culture. D'après les tests statistiques réalisés, les quantités de cellules de ces trois conditions ne sont pas significativement différentes. Le nombre moyen de cellules pour ces trois conditions en fin d'expérience est de $0,34.10^6$

$\pm 0,03$ cellules/cm². Ceci correspond à une prolifération moyenne de $3,7 \pm 0,6$, significative sur les 72 heures de culture ($\alpha = 2,5\%$). La croissance des C3A la plus importante se fait durant les 24 premières heures de culture avec un taux de $1,9 \pm 0,2$. Cette croissance ralentie ensuite avec des taux de $1,6 \pm 0,1$ à 48h et $1,2 \pm 0,1$ à 72 h. Ce ralentissement peut être corrélé avec la formation de la monocouche cellulaire occupant pratiquement toute la surface disponible.

Après 72 heures sur PDMS, plus aucune cellule n'est présente comme l'illustre la photo de la figure 34(f), montrant ainsi la nécessité de réaliser un traitement de surface du PDMS, préalable à la culture des C3A.

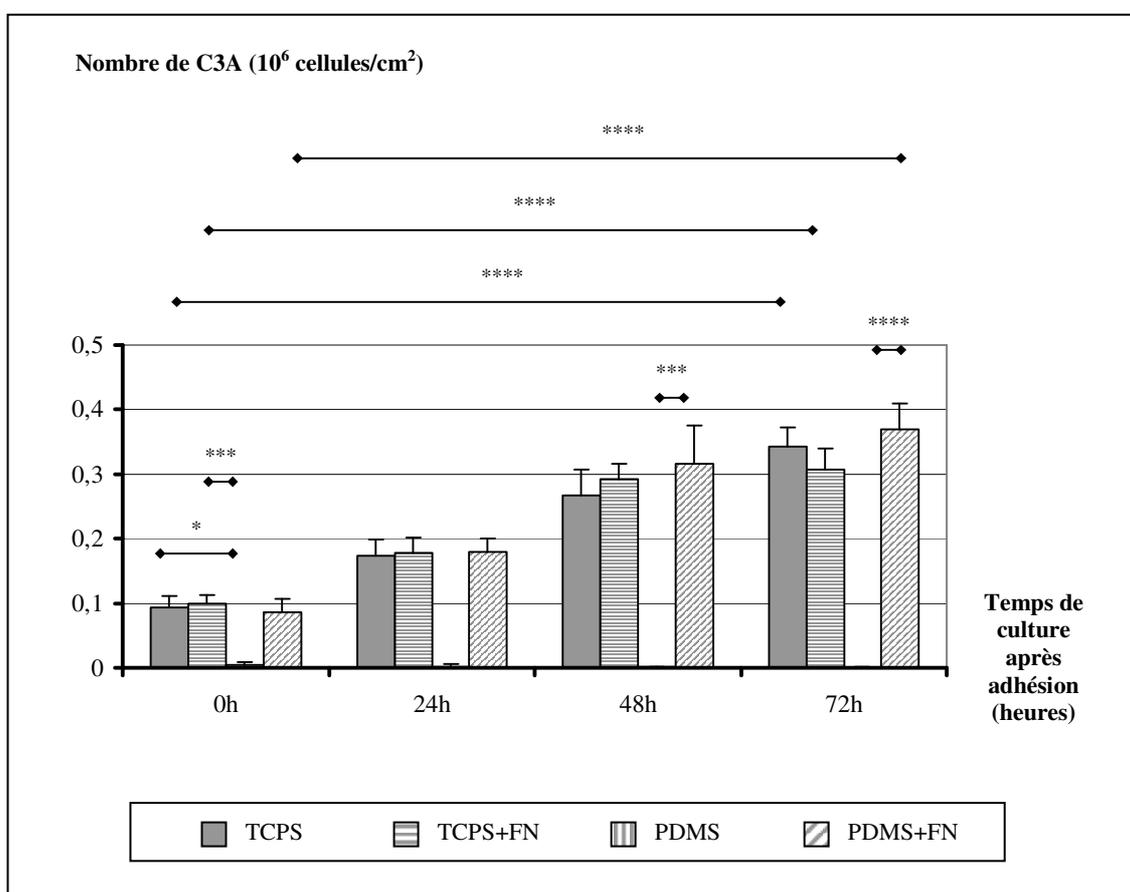


Figure 33 : Nombre de cellules C3A en plaque multi-puits pour différents revêtements surfacique (n=3).

L'adhésion cellulaire est quasiment nulle sur une surface de PDMS tandis qu'après un traitement à la fibronectine, l'adhésion et la prolifération cellulaire sont semblables aux conditions standards de culture cellulaire sur polystyrène (TCPS).

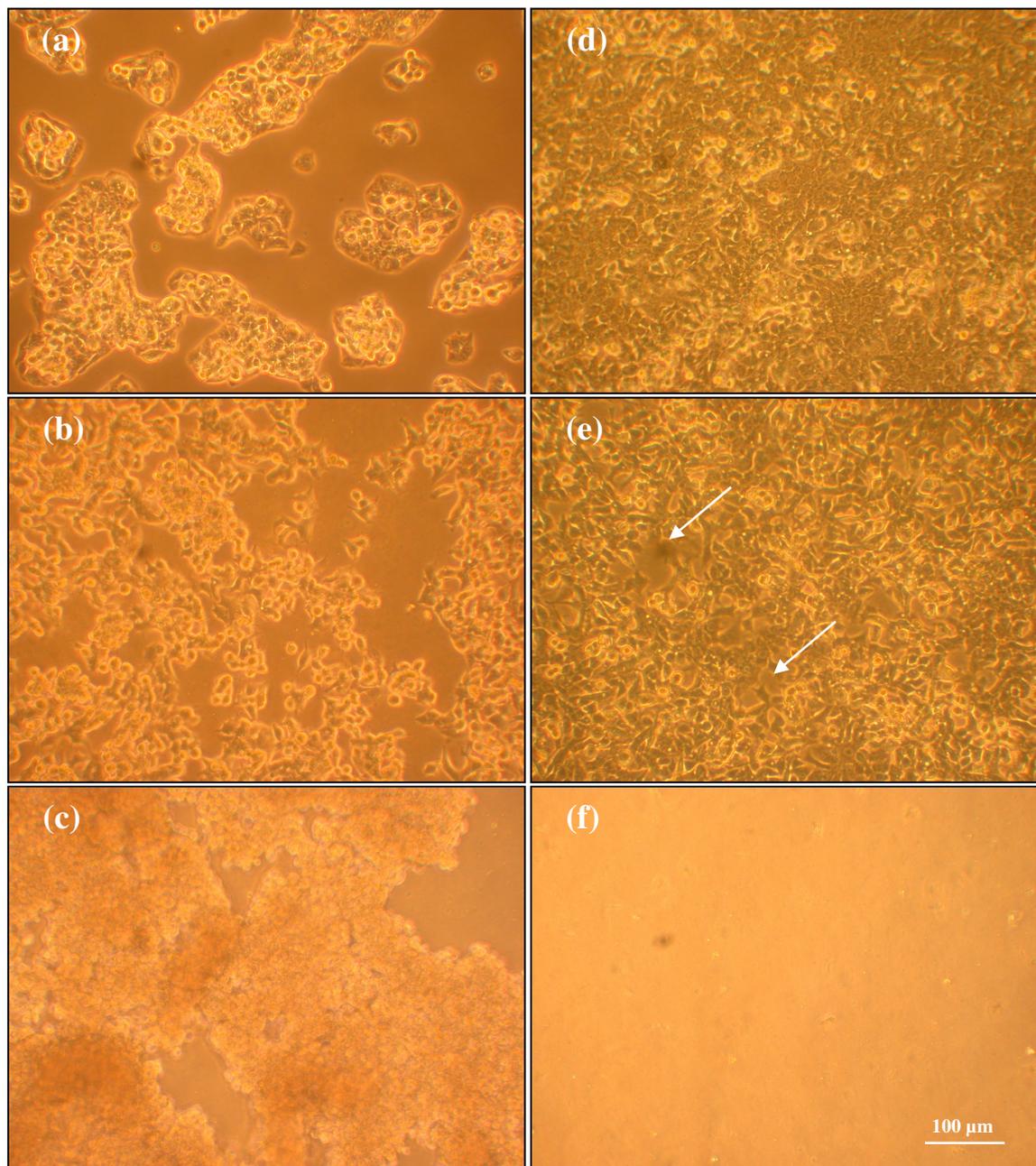


Figure 34 : Photos de C3A cultivés en puits avec des revêtements de surface différents à 0 et 72 heures (X10).

Photos des cultures après adhésion (a-c). Photos après 72 heures (d-f). C3A sur revêtement TCPS (a et d). C3A en culture sur PDMS recouvert de fibronectine (10 μg/mL) (b et e). Photos des cultures sur PDMS sans traitement préalable (c et f). Toutes les cellules se sont agglomérées sans aucune adhésion sur la surface de PDMS (c). Les cellules non adhérentes sont éliminées avec les rinçages successifs durant la période expérimentale. Sans un traitement préalable, aucune cellule n'est présente sur la surface de PDMS après 72 heures (f).

1.2 Test de culture cellulaire C3A en présence de NH₄Cl.

Les C3A sont ensemencés en puits recouvert de PDMS+FN. Après adhésion, 3 puits sont détachés et comptés. Le comptage est représenté au temps 0 h en pointillés sur la figure 36. Le milieu de culture des autres puits restants est remplacé par du milieu enrichi de chlorure d'ammonium à 5 concentrations différentes : 0 ; 0,5 ; 1 ; 5 et 10 mM. Le chargement en NH₄Cl est représenté sur le graphique de la figure 35 par une flèche. Des comptages pour ces 5 conditions de culture sont réalisés en triplicte après 24, 48 et 72 heures de chargement en chlorure d'ammonium. Des photos illustrant les morphologies cellulaires en début et en fin d'expérience sont présentées par la figure 36.

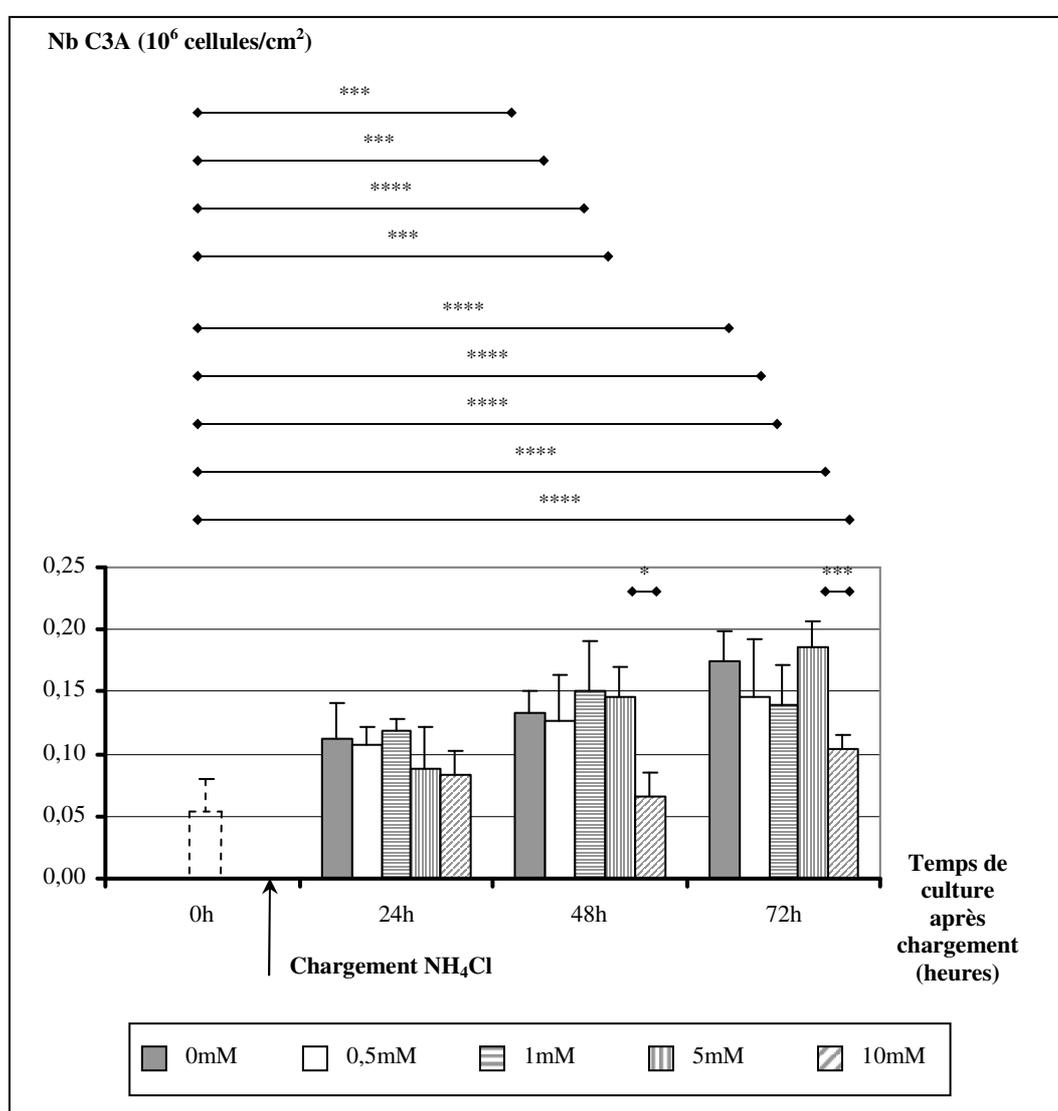


Figure 35 : Représentation graphique du nombre de cellules C3A pour différents chargements de chlorure d'ammonium (n=3).

La barre à 0 h représente le nombre de cellules ensemencées initialement pour chaque condition.

Les morphologies cellulaires après 72 heures ne présentent pas de différences quelques soient les concentrations de chlorure d'ammonium (figure 36 b-f). Les cellules restent étalées et forment une monocouche parsemée d'espaces libres. Le nombre de C3A augmente pour chacune des conditions sur la durée totale de culture au regard du nombre initial de cellules ($0,05 \pm 0,03 \cdot 10^6$ cellules/cm²). Ceci est caractérisé par une différence significative entre le nombre initial et le nombre final de cellules avec un facteur d'erreur α égale à 2,5% (figure 35).

Pour les conditions de culture à 0 ; 0,5 ; 1 et 5 mM, le nombre moyen final de cellules est de $0,16 \pm 0,02 \cdot 10^6$ cellules/cm². Ceci correspond à une prolifération moyenne sur 72 heures de $3,3 \pm 0,5$. Le nombre de cellules augmente significativement à partir de 48 h pour ces quatre conditions avec un facteur α de 5% pour les conditions à 0 ; 0,5 et 5 mM et un facteur α égale à 2,5% pour la condition de chargement à 1mM.

A 10mM, le nombre final de cellules est de $0,10 \pm 0,01 \cdot 10^6$ cellules/cm². Ceci correspond à un taux de prolifération moyen sur 72 heures de $2,1 \pm 0,2$. A cette condition, le nombre final de cellules est pratiquement atteint dès les premières 24 heures se stabilisant à 48 et 72 heures. Contrairement aux autres conditions, la différence entre le nombre initial de cellules et le nombre de cellules à 48h est non significativement différente. Cette différence entre la condition à 10mM et les autres conditions de culture est visible au temps 48h avec un taux de prolifération deux fois moins élevé. Le taux est en effet de $1,4 \pm 0,4$ à 10 mM contre $2,8 \pm 0,2$ pour les autres conditions. De plus, une différence significative avec le nombre de cellules à 5 mM est nettement visible aux temps 48h et 72h. Pour ces cas, les facteurs d'erreur α sont de 10 et 5% (figure 35).

1.3 Conclusion des tests préliminaires réalisés sur les C3A

Ces tests réalisés en plaque multi-puits nous permettent de valider l'effet bénéfique d'un revêtement de fibronectine à 10 μ g/mL pour la culture de cellules C3A sur PDMS. Les résultats de prolifération cellulaire à l'aide de cette protéine matricielle sont similaires aux résultats obtenus sur les surfaces de polystyrène préparées à la culture (TCPS).

Les chargements de chlorure d'ammonium réalisés sur les C3A nous permettent de caractériser une concentration critique à 10 mM stoppant de manière importante la prolifération des C3A dès les premières 24 heures de culture.

Pour la suite de notre étude, nous utiliserons la fibronectine pour permettre l'adhésion des C3A en biopuces statiques et dynamiques. Après caractérisation de la biopuce en conditions statiques et dynamiques, nous nous proposons également d'étudier l'effet du chlorure d'ammonium à 5 et 10 mM sur les cultures de C3A pour différentes conditions d'ensemencement et de débit.

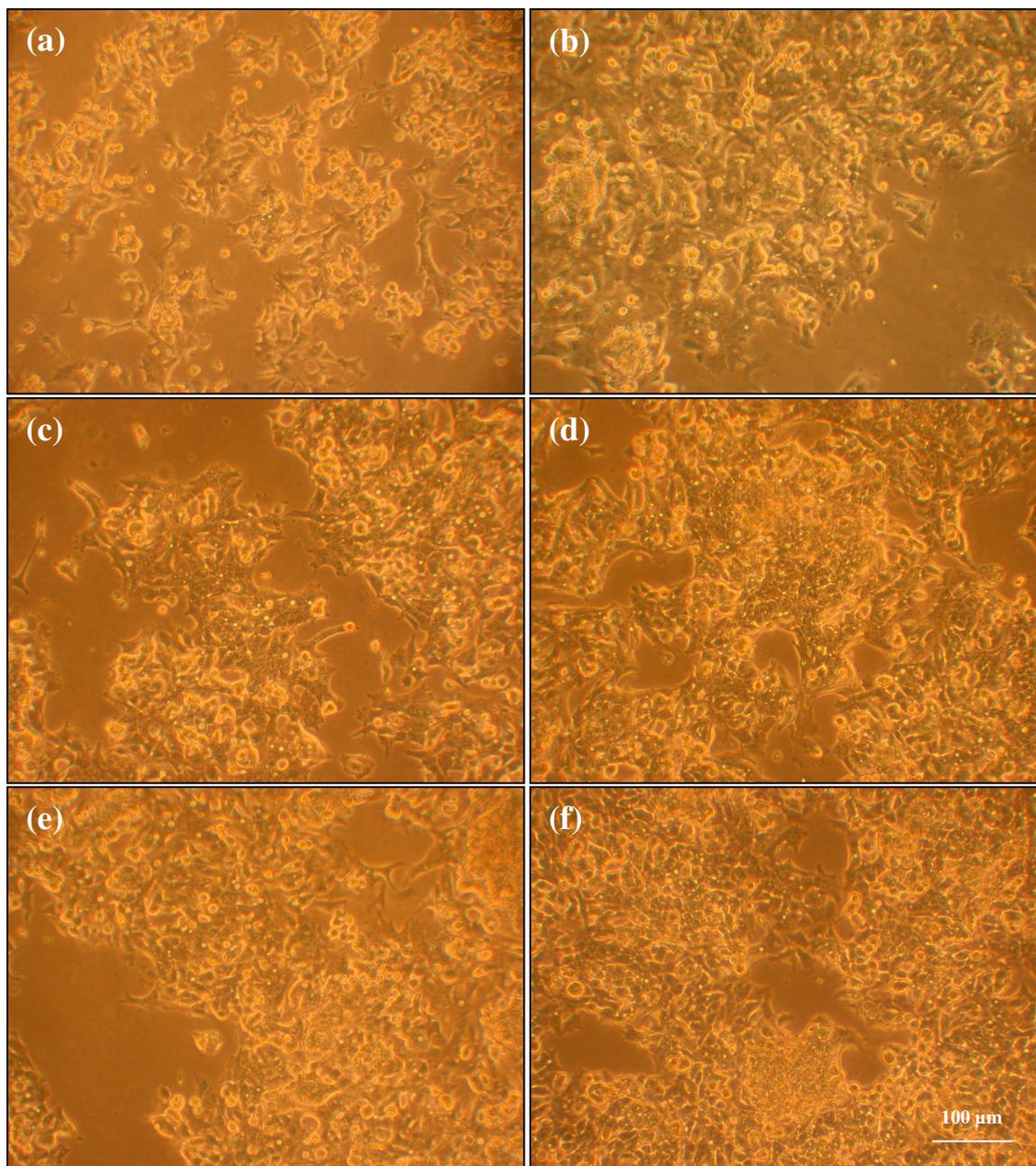


Figure 36 : Cultures de cellules C3A en puits PDMS+FN sous différents chargements de chlorure d'ammonium (Photos réalisées au microscope optique, objectif X 10).

Photos de C3A après une nuit d'adhésion (a). Cette photo présente l'état des cultures cellulaires juste avant l'apport du milieu chargé en chlorure d'ammonium. Culture de C3A après 72 heures en milieu de culture standard (b). C3A après 72 heures de culture en milieu chargé de chlorure d'ammonium aux concentrations de 0,5 et 1 mM respectivement (c-d). C3A après 72 heures en contact avec du chlorure d'ammonium à 5 et 10 mM respectivement (e-f). La morphologie des C3A ne semble pas différente en présence de chlorure d'ammonium.

2. Caractérisation de la biopuce avec les cellules C3A

Avant de réaliser les expériences en présence de chlorure d'ammonium, il est nécessaire dans un premier temps de montrer l'intérêt que représente la culture de cellules en biopuce. Des cultures de C3A en biopuce avec du milieu de culture standard sont réalisées afin de comparer les activités cellulaires à 0, 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ au regard des cultures classiques en boîte de Pétri (PDMS+FN). La densité d'ensemencement initiale est de $0,24 \cdot 10^6$ cellules/ cm^2 . Cette densité correspond à $0,45 \cdot 10^6$ cellules/biopuce.

Les morphologies cellulaires des C3A en biopuce sont présentées sur la figure 37. La photo 37a permet l'observation des C3A au temps 0 h, après adhésion sur la surface microstructurée. Les autres photos présentent les C3A après 72 heures de culture en biopuce. La figure 37b est une condition à 0 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les photos 37c et 37d sont des cultures de C3A en conditions dynamiques avec des débits de 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ respectivement. Les flèches indiquent la formation d'amas cellulaires le long des microstructures.

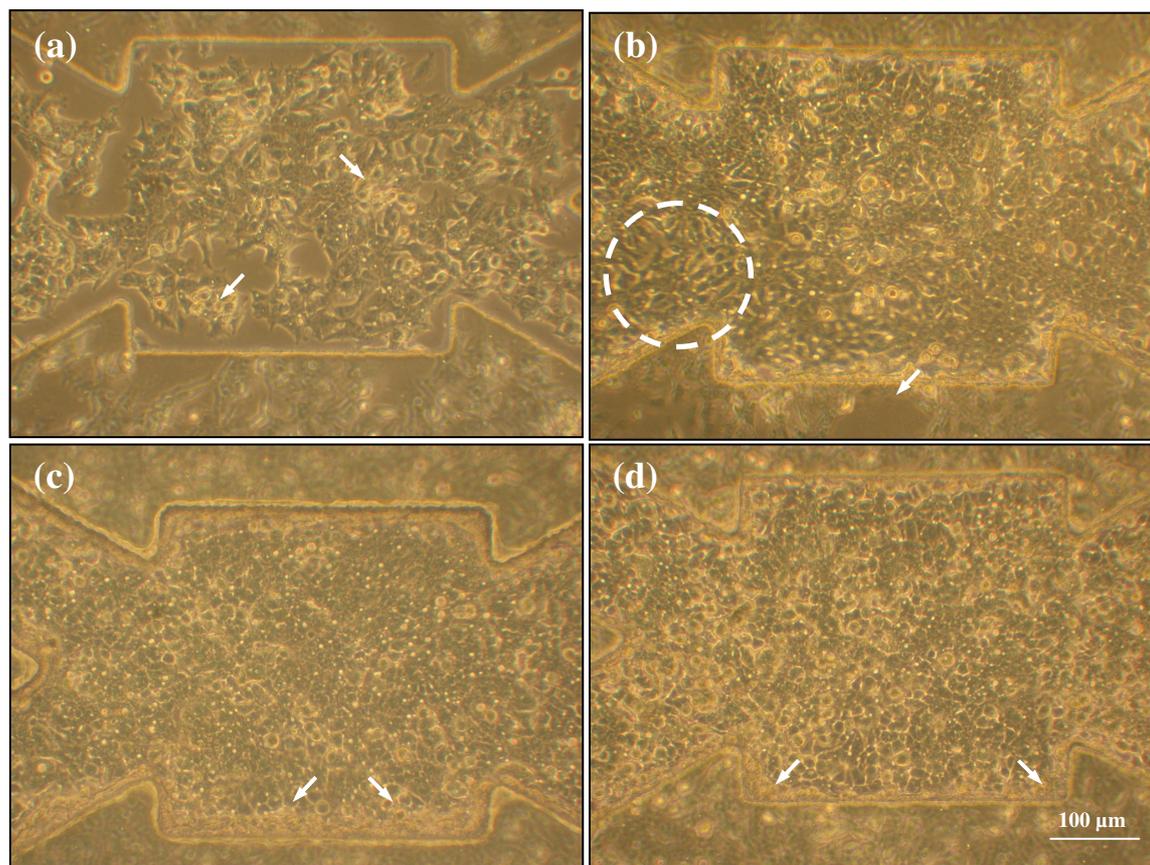


Figure 37 : Photos réalisées au microscope optique (objectif X10) de C3A en biopuce.

2.1 Morphologies et proliférations cellulaires en biopuce

Après adhésion (figure 37a), les cellules ont la même morphologie que sur PDMS+FN en Pétri (cf. figures 34b et 36a). Les cellules sont étalées sur le fond de la biopuce avec par endroit quelques cellules superposées (flèche sur la photo 37a).

Après 72 heures de culture en biopuce statique, les C3A forment une monocouche dans le fond des canaux. Certains endroits présentent des cellules moins serrées (cercle sur la photo 37b) et les dessus des microstructures présentent de nombreux espaces libres (flèche sur la photo 37b) caractéristique d'un nombre de cellules faible. Ceci est corrélé avec une prolifération cellulaire de $1,2 \pm 0,1$ à $0 \mu\text{L}/\text{min}$ (figure 38).

En conditions dynamiques par contre, le fond des canaux et le dessus des microstructures sont recouverts d'un tapis où les cellules sont petites et jointives, caractéristiques d'une monocouche dense. Des amas cellulaires sont présents sur les côtés des microstructures (flèches sur les photos 37c et photos 37d) ce qui laisse également présager d'un nombre de cellules supérieur au regard des conditions statiques. De plus, les morphologies en biopuce pour les débits de 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ sont semblables. Ces deux observations sont renforcées par une prolifération à $2,9 \pm 0,6$ à $10 \mu\text{L}/\text{min}$ et $2,4 \pm 0,2$ à $25 \mu\text{L}/\text{min}$ (figure 38).

2.2 Comparaison entre la culture en biopuce et la culture en puits

2.2.1 Prolifération des C3A

Les proliférations cellulaires à 72 heures sur Pétri recouvert de PDMS+FN et biopuces dynamiques sont proches (figure 38). Le relargage de la LDH est également très faible pour ces trois conditions. Les taux présentés sur la figure 38 sont en effet inférieurs à 1% ce qui dénote de bonnes conditions de culture pour les C3A. A $0 \mu\text{L}/\text{min}$ par contre, la faible prolifération est accompagnée dans certaines biopuces d'un relargage de LDH plus important (figure 38). Ceci démontre une souffrance cellulaire due aux conditions statiques de culture.

L'activité cellulaire des C3A est présentée après 72 heures de culture. Le suivi de l'activité est fait au niveau des consommations de glucose et de glutamine, des productions d'ammoniac et d'albumine et enfin, au niveau de l'activité des CYP 1A2. Le graphique de la figure 38 présente les taux calculés pour les conditions de culture en puits recouverts de PDMS+FN et biopuces statiques et dynamiques.

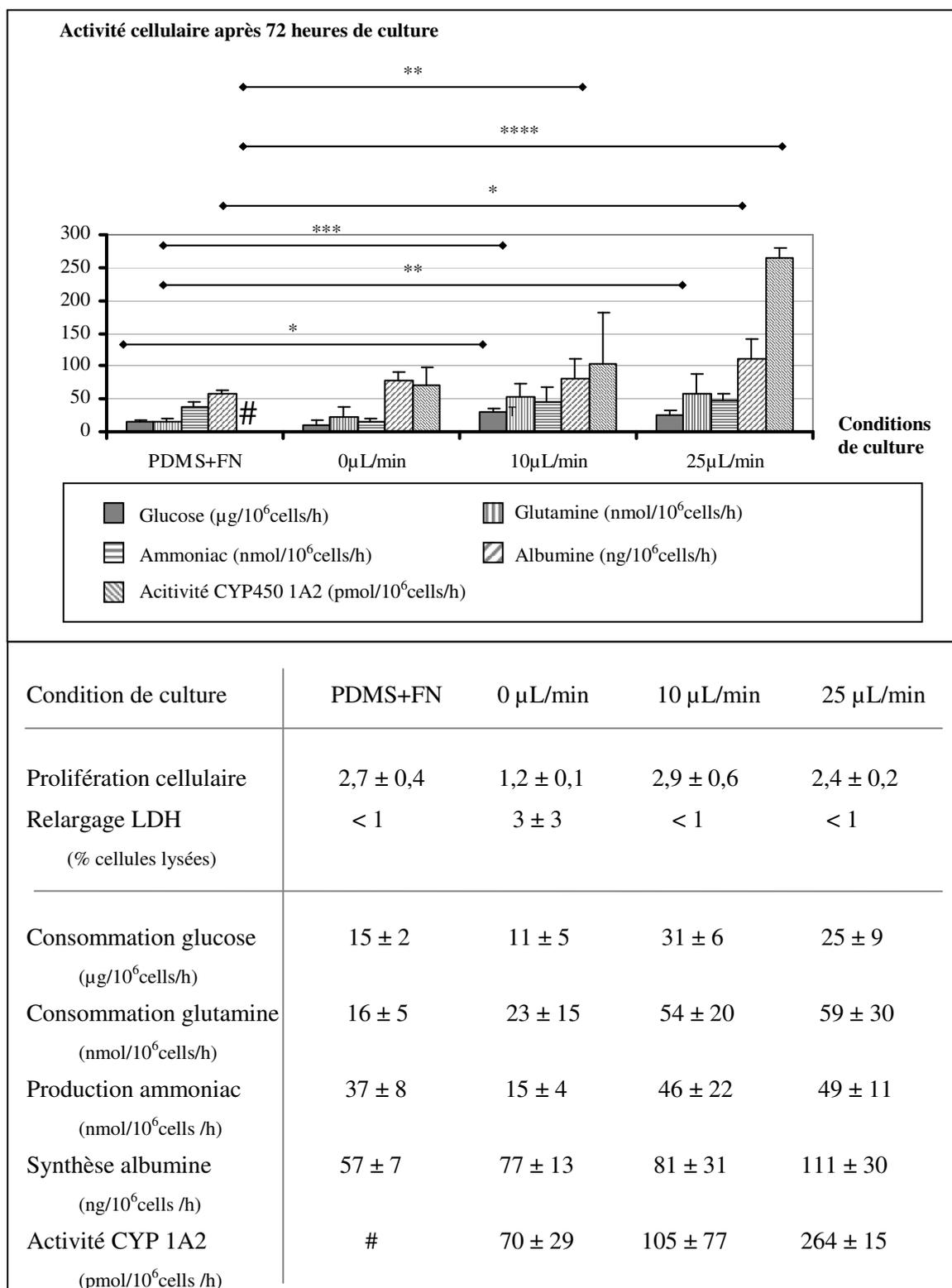


Figure 38 : Représentation graphique et tableau de valeurs associées de l'activité de consommation et de production des C3A pour différentes conditions de culture : plaque multi-puits recouverts de PDMS+FN et biopuce pour 0, 10 et 25 μL/min.

La densité initiale est de $0,24 \cdot 10^6$ cellules/cm², correspondant à $0,45 \cdot 10^6$ cellules/biopuce. # représente une activité faible en dessous du seuil de détection.

2.2.2 Consommations cellulaires

La consommation de glucose des C3A à 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ est deux fois plus importante qu'en conditions statiques (PDMS+FN et 0 $\mu\text{L}/\text{min}$). Les taux de consommations sont en effet de 31 ± 6 et 25 ± 9 à 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ tandis que les taux en Pétri et à 0 $\mu\text{L}/\text{min}$ ne sont que de 15 ± 2 et 11 ± 5 $\mu\text{g}/10^6$ cellules/h respectivement (figure 38). Il peut être remarquée une différence statistiquement significative ($\alpha = 10\%$) entre la consommation en Pétri et celle à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Le suivi de la consommation de glutamine montre également une augmentation de la consommation cellulaire en dynamique avec des taux de 54 ± 20 et 59 ± 30 à 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ au regard des taux à 16 ± 5 et 23 ± 15 $\text{nmol}/10^6$ cellules/h en Pétri et biopuce statique. La consommation de glutamine par les C3A en Pétri est significativement différente des consommations calculées à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ ($\alpha = 5\%$) et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ ($\alpha = 7,5\%$).

La consommation cellulaire du glucose et de la glutamine est donc plus importante en biopuce dynamique.

2.2.3 Productions cellulaires

Aucune différence significative n'est rapportée pour la production d'ammoniac. Cependant, les valeurs moyennes de production sont supérieures en dynamique au regard des taux de production calculés en Pétri et en statique. La production d'ammoniac en Pétri est en effet de 37 ± 8 $\text{nmol}/10^6$ cellules/h. Ce taux, supérieur à la production constatée à 0 $\mu\text{L}/\text{min}$ qui n'est que de 15 ± 4 , est en dessous des taux à 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ qui sont de 46 ± 22 et 49 ± 11 .

Les taux de synthèse d'albumine sont également supérieurs en biopuce à 0, 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ au regard des conditions de culture en Pétri. Avec une valeur à 57 ± 7 $\text{ng}/10^6$ cellules/h sur PDMS+FN, ce taux est inférieur aux synthèses réalisées en biopuce qui sont de 77 ± 13 , 81 ± 31 et 111 ± 30 à 0, 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ respectivement. Une différence statistiquement significative est présente entre la condition en Pétri et la condition à 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ ($\alpha = 10\%$).

Les productions d'ammoniac et d'albumine sont plus élevées en biopuce dynamique.

2.2.4 Activité des cytochromes P450 1A2

Après 72 heures de culture en Pétri sur PDMS+FN, une faible activité des CYP 1A2 est détectée par la fluorescence de la résorufine. En biopuce par contre, l'activité de ce complexe enzymatique est nettement visible ($\alpha = 7,5\%$ à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ et $\alpha = 2,5\%$ à 25 $\mu\text{L}/\text{min}$). De plus, cette activité est supérieure en conditions dynamiques avec des taux de 105 ± 77 $\text{pmol}/10^6$ cellules/h à 10

$\mu\text{L}/\text{min}$ et $264 \pm 15 \text{ pmol}/10^6 \text{ cellules}/\text{h}$ à $25 \mu\text{L}/\text{min}$ au regard du taux à $0 \mu\text{L}/\text{min}$ qui n'est que de $70 \pm 29 \text{ pmol}/10^6 \text{ cellules}/\text{h}$.

2.2.5 Conclusion

Après comparaison des cultures cellulaires en Pétri recouverts de PDMS+FN et biopuces statiques ou dynamiques, il apparaît adéquat d'utiliser le mode de culture en perfusion pour réaliser des tests sur des substances chimiques et médicamenteuses. Deux arguments majeurs vont dans ce sens : d'une part, avec des taux de $2,7 \pm 0,4$ en Pétri et des taux de $2,9 \pm 0,6$ et $2,4 \pm 0,2$ à 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, les proliférations sont comparables. De plus, les taux de LDH cellulaires en Pétri et biopuces dynamiques sont faibles. D'autre part, l'activité cellulaire en biopuces dynamiques est systématiquement supérieure aux cultures réalisées en Pétri.

Le travail de caractérisation de la biopuce présenté dans la suite du manuscrit a pour objectif de déterminer l'influence de différents paramètres cellulaires sur l'activité de la biopuce. Aussi, différentes densités cellulaires ($0,35$; $0,45$ et $0,65 \cdot 10^6$ cellules) et de débits (0 , 10 et $25 \mu\text{L}/\text{min}$) sont étudiés et présentés.

2.3 Influence du débit et de la densité initiale de cellulesensemencées

Les taux de prolifération et de métabolisme des C3A en biopuce pour un milieu de culture standard sont présentés pour des débits de 0 , 10 et $25 \mu\text{L}/\text{min}$ et des densités d'ensemencement de $0,35$; $0,45$ et $0,65 \cdot 10^6$ cellules/biopuce. Les données sont extraites après 72 heures de culture en biopuce. Les représentations graphiques présentées dans cette partie sont issues du tableau 2 en fin de section.

2.3.1 Prolifération en milieu de culture standard

La figure 39 représente graphiquement la prolifération cellulaire des C3A cultivés durant 72 heures en biopuces statiques et dynamiques. Les débits étudiés sont 0 , 10 et $25 \mu\text{L}/\text{min}$ et les densités d'ensemencement initiales sont de $0,35$; $0,45$ et $0,65 \cdot 10^6$ cellules/biopuce.

2.3.1.a) Effet du débit

La prolifération cellulaire à 0 $\mu\text{L}/\text{min}$ est moins importante qu'en conditions dynamiques. Ceci est caractérisé par une prolifération significativement plus faible lorsqu'elle est comparée aux proliférations à 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le facteur d'erreur α est égal à 5% pour toutes les densités étudiées. Après 72 heures de culture en biopuce statique, le nombre final de cellules est stabilisé à $0,57 \cdot 10^6 \pm 0,03$ cellules. En conditions dynamiques, ce nombre s'élève à $1,2 \pm 0,2 \cdot 10^6$ cellules/biopuce. Les proliférations à 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ sont comparables.

2.3.1.b) Effet de la densité

Les taux de prolifération cellulaire diminuent avec l'augmentation de la densité initiale d'ensemencement. Ceci est nettement visible à 0 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ où des différences significatives sont présentes. A 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, bien qu'il y ait une diminution de la prolifération moyenne à $0,65 \cdot 10^6$ cellules/biopuce, celle-ci n'est cependant pas statistiquement significative.

L'étude à différentes densités cellulaires initialement ensemencées nous renseigne sur la stabilité de la culture en biopuce. Ainsi, quel que soit le nombre de cellules compris entre 0,35 et $0,65 \cdot 10^6$, l'utilisateur peut s'attendre à récolter après 72 heures de culture, un nombre de C3A peut varier de $0,57 \cdot 10^6 \pm 0,03$ en biopuce statique et $1,2 \cdot 10^6 \pm 0,2$ en conditions dynamiques. Ce résultat sera discuté ultérieurement dans la partie V. Un effet de densité est alors mis en avant, notamment à 0 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$.

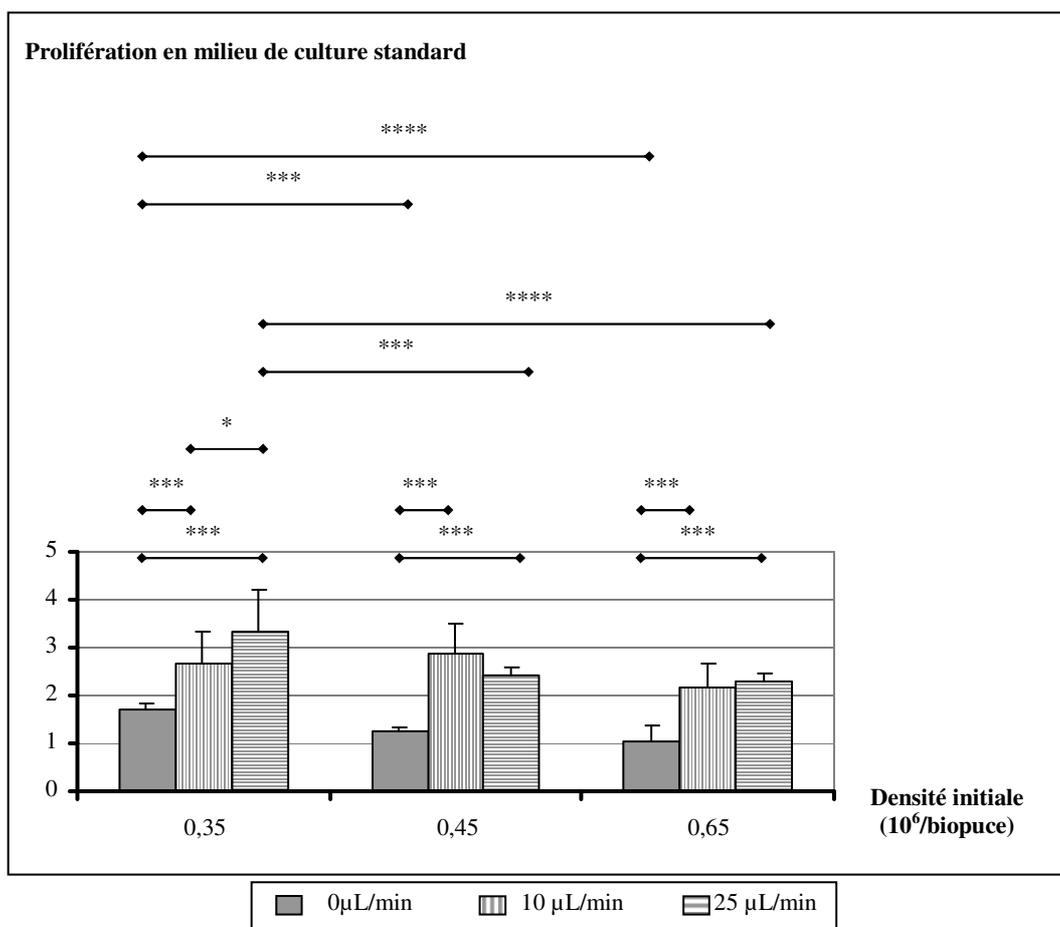


Figure 39 : Représentation graphique de la prolifération cellulaire des C3A cultivés durant 72 heures en biopuces statiques et dynamiques.

2.3.2 Relargage de la LDH en milieu de culture standard

La figure 40 présente un graphique du relargage de la LDH par les C3A cultivés durant 72 heures en biopuces statiques (0 μ L/min) et dynamiques (10 et 25 μ L/min) pour 3 densités initiales différentes : 0,35 ; 0,45 et 0,65. 10^6 cellules/biopuce.

2.3.2.a) Effet du débit

Avec des taux systématiquement inférieurs à 1%, le relargage de la LDH par les C3A est très faible en conditions de perfusions au regard des conditions de culture statiques. A 0 μ L/min, les taux de relargage de la LDH sont de $13 \pm 16\%$, $3 \pm 3\%$ et $6 \pm 6\%$ pour les 3 densités d'ensemencement étudiées. Cette différence entre dynamique et statique est significative quelles que soient les densités

d'ensemencement. Ce taux élevé est le signe d'une lyse cellulaire plus importante en condition de biopuce statique.

2.3.2.b) Effet de la densité

Aucune différence significative n'a pu mettre en évidence un effet lié à la densité cellulaire. Bien que la moyenne de relargage de LDH soit plus importante à $0,35 \cdot 10^6$ cellules/biopuce, une dispersion importante des valeurs (cf. écart-type) ne permet pas de conclure sur une potentielle différence avec les densités d'ensemencement plus élevées.

Le relargage de la LDH est donc plus important en biopuces statiques qu'en biopuces dynamiques.

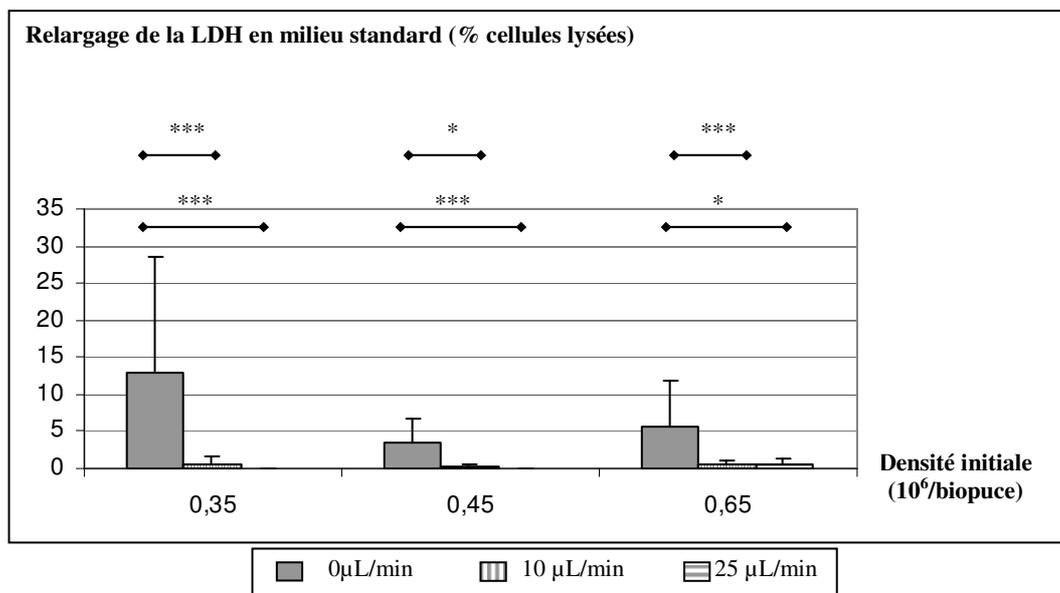


Figure 40 : Représentation graphique de la lyse cellulaire par le relargage de la LDH dans le milieu de culture après 72 heures en biopuce.

2.3.3 Consommations cellulaires en milieu de culture standard

La figure 41 présente les taux de consommation de glucose (a) et de glutamine (b) par les C3A cultivés en biopuces statiques et dynamiques. Les taux calculés pour 3 densités cellulaires y sont présentés.

2.3.3.a) Effet du débit

A 0 $\mu\text{L}/\text{min}$, les consommations de glucose et de glutamine par les C3A sont inférieures aux consommations en biopuces dynamiques. Pour la consommation de glucose, le taux calculé à 0 $\mu\text{L}/\text{min}$ est de $12 \pm 1 \mu\text{g}/10^6$ cellules/h. Cette valeur de consommation est 3 fois moins importante que la valeur de consommation en biopuce dynamique qui est à $30 \pm 6 \mu\text{g}/10^6$ cellules/h. Ce constat est également fait pour la consommation de glutamine qui est de $20 \pm 7 \text{nmol}/10^6$ cellules/h en biopuces statiques contre $60 \pm 8 \text{nmol}/10^6$ cellules/h en dynamique.

Ceci se caractérise par de nombreuses différences significatives statistiquement. Les facteurs d'erreur α calculés entre 0 et 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ pour la consommation de glucose sont systématiquement à 5% (figure 41a). Ceux calculés entre 0 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ sont à 10% pour les densités de 0,35 et $0,65 \cdot 10^6$ cellules/biopuce. Pour les consommations de glutamine, des différences significatives sont systématiquement rapportées entre les conditions statiques et les conditions dynamiques. Les facteurs d'erreur α sont alors compris entre 2,5 et 5% (figure 41b).

2.3.3.b) Effet de la densité

Les taux moyens de consommation ont tendance à diminuer avec l'augmentation de la densité cellulaire. Cette diminution est illustrée avec une différence significative entre la densité 0,35 et la densité $0,65 \cdot 10^6$ cellules/biopuce pour les consommations de glucose à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Cependant, aucune différence significative impliquant la densité cellulaire n'est visible. Ceci est valable pour les consommations de glucose et les consommations de glutamine.

Les consommations de glucose et de glutamine sont donc plus importantes en biopuces dynamiques. Une légère diminution du taux moyen de consommation est visible avec l'augmentation de la densité cellulaire.

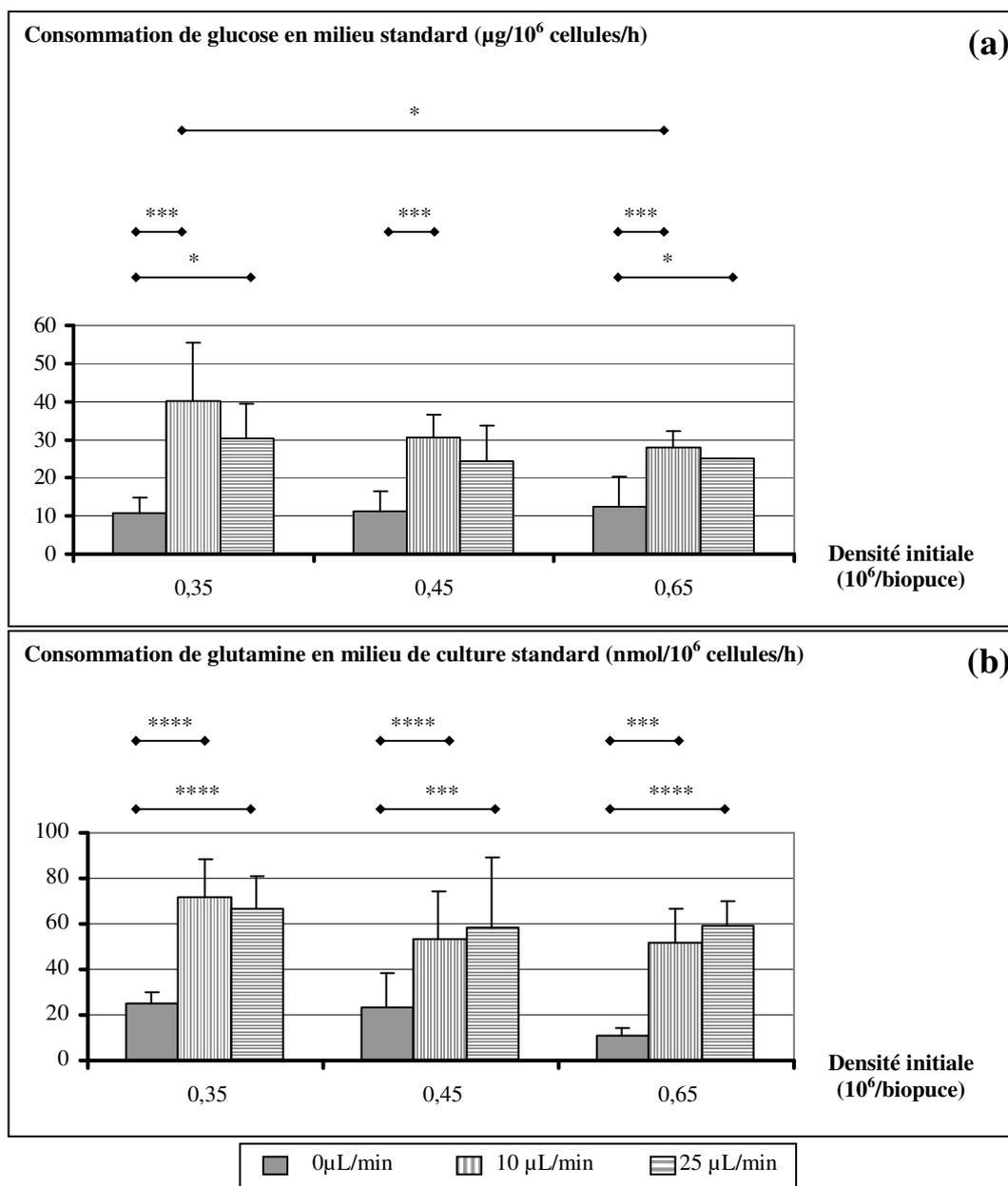


Figure 41 : Représentations graphiques des consommations de glucose (a) et de glutamine (b) pour les C3A en biopuces statiques (0 $\mu\text{L}/\text{min}$) et dynamiques (10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$).

Les taux sont présentés pour 3 densités d'ensemencement qui sont : 0,35 ; 0,45 et 0,65. 10^6 cellules/biopuce après 72 heures de culture.

2.3.4 Productions cellulaires en milieu de culture standard

La figure 42 présente les productions cellulaires en ammoniac (a) et albumine (b) pour les C3A cultivés dans du milieu standard en biopuces statiques et dynamiques. Les densités d'ensemencements sont de 0,35 ; 0,45 et 0,65.10⁶ cellules/biopuce. Les résultats extraits du tableau 2 sont les taux de productions calculés après 72 heures de culture.

2.3.4.a) Effet du débit

La production d'ammoniac avec un taux à 14 ± 2 nmol/10⁶ cellules/h est plus faible en biopuces statiques par rapport aux conditions dynamiques qui présentent un taux moyen de 44 ± 7 nmol/10⁶ cellules/h. En comparant les productions d'ammoniac à 0 µL/min et 10 µL/min, les taux calculés pour les biopuces statiques sont significativement plus faibles avec un facteur d'erreur α égale à 5%. Les taux à 25 µL/min sont également supérieurs aux statiques et bien que très proches de ceux calculés à 10 µL/min, une seule différence significative est visible à la densité de 0,45.10⁶ cellules/biopuce ($\alpha = 5\%$). La synthèse d'albumine est relativement oscillante d'une condition à l'autre et aucune tendance ne peut être établie. Les valeurs de production sont comprises entre 80 et 180 ng/10⁶ cellules/h.

2.3.4.b) Effet de la densité

Les taux de production de l'ammoniac sont équivalents d'une densité à l'autre. La densité cellulaire d'ensemencement n'est pas non plus considérée comme un paramètre influençant la production d'albumine. Une production d'albumine faible est notée à la densité de 0,45.10⁶ cellules/biopuce. Cependant, les taux de production d'albumine aux deux densités extrêmes sont proches.

La production d'ammoniac est plus faible en conditions statiques qu'en conditions dynamiques. La production d'albumine oscille entre 80 et 180 ng/10⁶ cellules/h quelque soient les conditions de culture en biopuce et aucune tendance ne peut être véritablement établie.

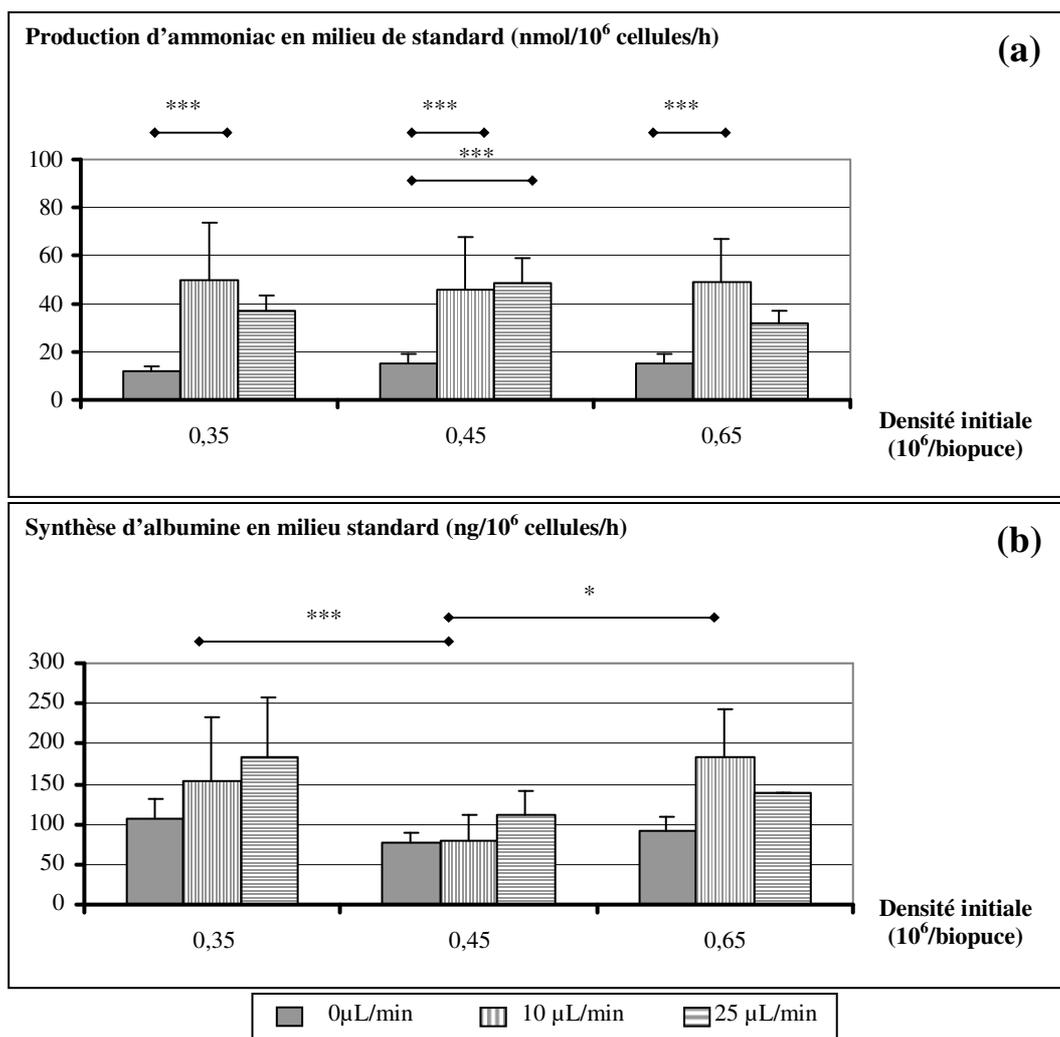


Figure 42 : Représentations graphiques des productions cellulaires d'ammoniac (a) et d'albumine (b) par les cellules C3A cultivées durant 72 heures en biopuces statiques et dynamiques.

Les taux de production sont ici présentés pour 3 densités d'ensemencement cellulaire différentes : 0,35 ; 0,45 et 0,65.10⁶ cellules/biopuce.

2.3.5 Activité des Cytochromes P450 1A2 en milieu de culture standard

Les taux d'activités des CYP 1A2 sont présentés sur le graphique de la figure 43. Ils sont extraits du tableau 2 après 72 heures de culture des C3A en biopuces statiques et dynamiques pour les 3 densités initiales d'ensemencement.

La valeur d'activité initiale est représentée également sur le graphique. Elle est la moyenne des dosages effectués sur les cellules en biopuce à J₁, juste avant de commencer la phase expérimentale. Aucune différence n'a été remarquée pour différentes densités d'ensemencement, c'est pourquoi une seule valeur est indiquée sur le graphique et constitue la référence de chacune des conditions de culture. Cette valeur à 225 ± 86 nmol/10⁶ cellules/h constitue ici un point de départ d'activité avant le lancement de la culture sur 72 heures.

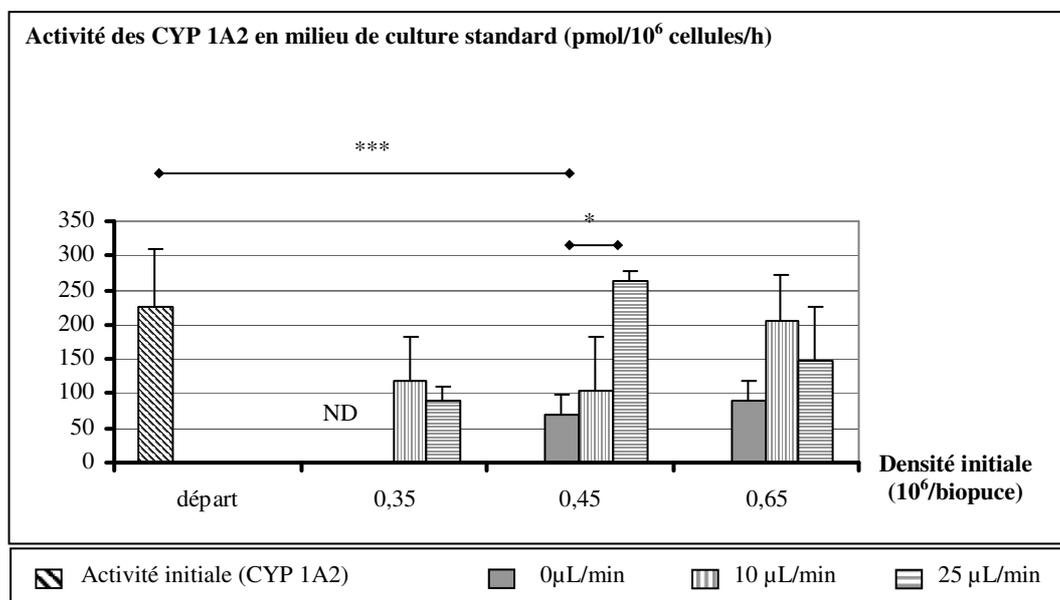


Figure 43 : Représentation graphique de l'activité des CYP 1A2 en début et fin d'expérience (72 heures de culture en biopuces statiques et dynamiques).

Les valeurs non déterminées sont annotées sur le graphique de la mention : « ND ».

2.3.5.a) Effet du débit

L'activité moyenne des CYP 1A2 est plus élevée en conditions dynamiques au regard de l'activité en biopuces statiques. Une différence statistique entre 0 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ à la densité de $0,45 \cdot 10^6$ cellules/biopuce illustre cette remarque.

2.3.5.b) Effet de la densité

Mise à part une valeur d'activité relativement élevée à 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, $0,45 \cdot 10^6$ cellules/biopuce, les valeurs moyennes déterminées sont en dessous de l'activité initiale. Les taux sont donc relativement proches et aucune tendance n'est véritablement visible.

2.3.6 Conclusions sur la culture de C3A en biopuce et milieu de culture standard

Après 72 heures de culture en biopuce, il est remarqué que la quantité de C3A récoltés est stable. En condition statique, le nombre de cellules en fin d'expérience est de $0,57 \pm 0,03 \cdot 10^6$ cellules/biopuce. En condition dynamique, ce nombre final est de $1,2 \pm 0,2 \cdot 10^6$ cellules/biopuce. Les proliférations et activités cellulaires sont meilleures en dynamique. Ceci est visible avec des consommations de glucose et glutamine, des productions d'ammoniac et des activités des CYP 1A2 supérieures. De plus, les taux mesurés de LDH en dynamique sont très faibles démontrant que les conditions de culture à 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ sont favorables.

La comparaison entre les deux débits de 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ n'établit pas de différence. Les taux de prolifération et d'activité cellulaire sont en effet très proches quelque soient les conditions d'ensemencement et les paramètres étudiés.

Les densités d'ensemencement cellulaire étudiées sont relativement proches. Une légère diminution de la prolifération et des consommations cellulaires peut être remarquée avec l'augmentation de la densité. Les taux restent cependant très proches et cette tendance devrait être mieux établie avec des écarts d'ensemencement plus important. On pourrait par exemple proposer d'ensemencer des biopuces à $1,2 \cdot 10^6$ cellules/biopuce, qui est la quantité finale.

Débit (µl/min)	0			10			25		
Densité initiale (10 ⁶ /biopuce)	0.35	0.45	0.65	0.35	0.45	0.65	0.35	0.45	0.65
Densité finale (10 ⁶ /biopuce)	0.61	0.56	0.54	0.96	1.25	1.50	1.16	1.08	1.50
Prolifération	1.7 ± 0.6	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.4	2.7 ± 0.7	2.9 ± 0.6	2.2 ± 0.5	3.3 ± 0.9	2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.2
Consommation Glucose (µg/h/10 ⁶ cells)	11 ± 4	11 ± 5	13 ± 8	40 ± 15	31 ± 6	28 ± 4	30 ± 9	25 ± 9	25 ± 0
Consommation Glutamine (nmol/h/10 ⁶ cells)	25 ± 5	23 ± 15	11 ± 3	72 ± 16	54 ± 20	52 ± 15	67 ± 14	59 ± 30	59 ± 11
Production Ammoniac (nmol/h/10 ⁶ cells)	12 ± 2	15 ± 4	15 ± 4	50 ± 24	46 ± 22	49 ± 18	37 ± 7	49 ± 11	32 ± 5
Production Albumine (ng/h/10 ⁶ cells)	107 ± 26	77 ± 13	93 ± 16	154 ± 79	81 ± 31	182 ± 61	184 ± 74	111 ± 30	138 ± 1
Activité CYP 1A2 (pmol/h/10 ⁶ cells)	ND	70 ± 29	90 ± 30	120 ± 61	105 ± 77	206 ± 65	90 ± 19	264 ± 15	147 ± 78
LDH (% cellules mortes/vivantes)	19 ± 17	3 ± 3	6 ± 6	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Tableau 2 : Valeurs des densités et du métabolisme des C3A aux débits de 0, 10 et 25 µl/min pour 3 densités d'ensemencement initial. Les données sont extraites après 72 heures de culture en biopuce et sont présentées par la valeur moyenne calculée ± écart-type (n >= 3).

Après la caractérisation de la biopuce en milieu de culture standard, cette étude est réalisée avec des chargements de chlorure d'ammonium déterminés par les tests en plaque multi-puits précédemment présentés dans la partie 1.2 intitulée : « Test de culture cellulaire C3A en présence de chlorure d'ammonium ».

3. Biopuce et C3A sous chargements de NH_4Cl

Le chargement de chlorure d'ammonium est réalisé après la période d'adhésion cellulaire, au moment de débiter les expériences en conditions statiques ou dynamiques. Du milieu de culture est préparé avec un supplément de chlorure d'ammonium afin d'obtenir des concentrations de 5 et 10 mM. La procédure expérimentale est alors réalisée dans les mêmes conditions qu'une expérience en milieu de culture standard sur 72 heures.

3.1 Morphologie cellulaire en présence de NH_4Cl

Les morphologies cellulaires après 72 heures de culture en biopuce sont présentées sur la figure 44. Les figures 44a et 44b présentent des biopuces statiques avec respectivement 5 et 10 mM de NH_4Cl . Les figures 44c et 44d sont des biopuces à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ pour des concentrations de 5 et 10 mM de chlorure d'ammonium. Les figures 44e et 44f présentent des biopuces à 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ pour des concentrations de 5 et 10 mM de NH_4Cl .

En condition statique et en présence de 5 et 10 mM de chlorure d'ammonium, les C3A forment une monocouche sur toute la surface de la biopuce comme le montrent les figures 44 (a) et (b). Les cellules sont bien délimitées avec un cytoplasme réfringent particulièrement visible au microscope optique.

A 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, le tapis cellulaire en présence de chlorure d'ammonium à 5 mM apparaît dense avec des cellules très serrées et des amas (flèche sur la figure 44c). Pour cette même condition de débit, la morphologie des C3A en présence de 10 mM de chlorure d'ammonium change complètement comme en témoigne la photo de la figure 44(d) après 72 heures de culture. Les cellules sont arrondies, relativement grosses et laissent des espaces libres le long des microstructures (cercles).

A 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, le tapis cellulaire est abîmé à 5 et 10 mM de chlorure d'ammonium (figures 44e et 44f). Les cellules sont assez grosses et les espaces sont nombreux, surtout en présence de 10 mM.

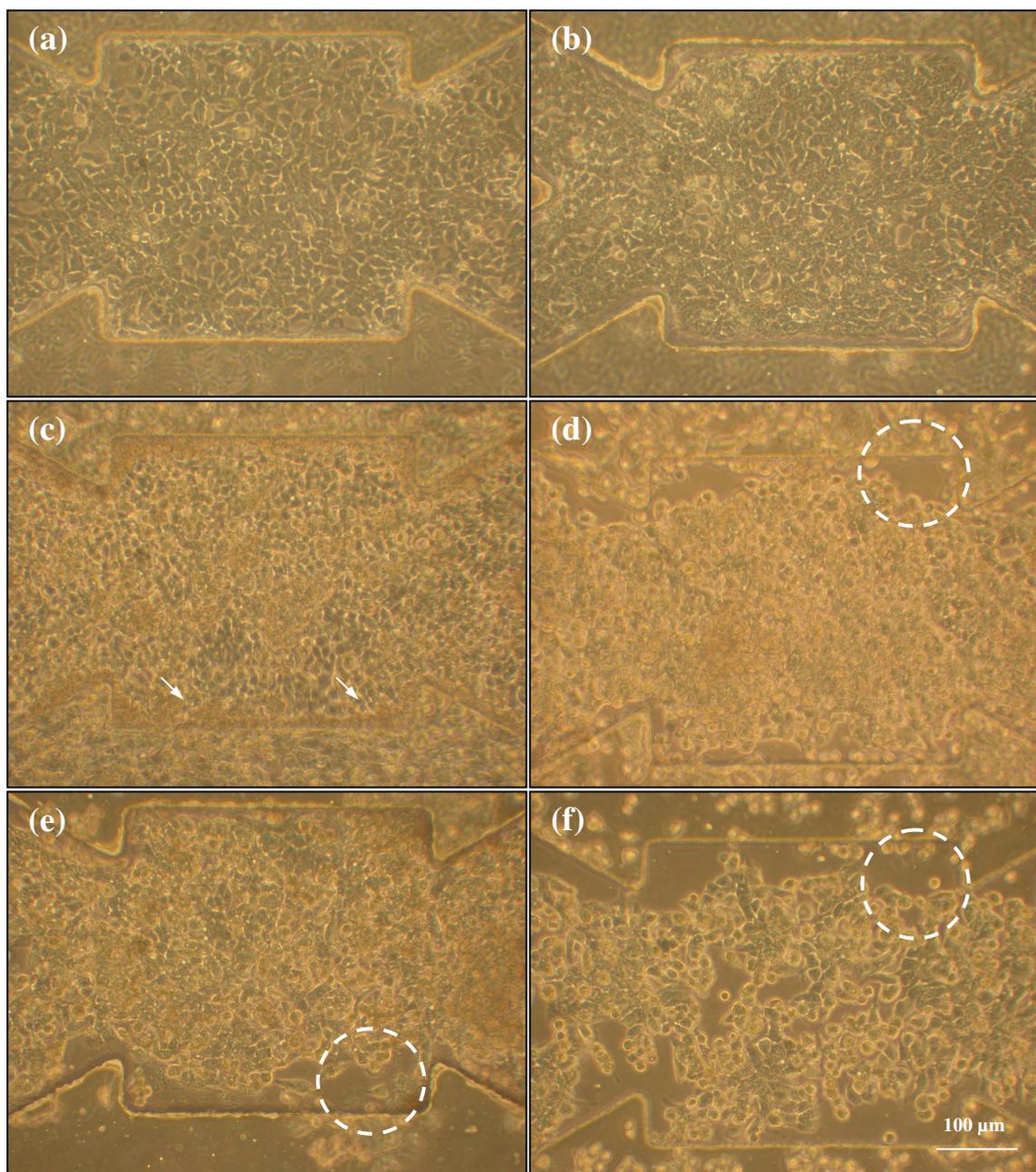


Figure 44 : Photos de C3A en biopuces statiques et dynamiques après 72 heures de culture en présence de chlorure d'ammonium à 5 et 10 mM.

Photos de C3A en culture statique (0 $\mu\text{L}/\text{min}$) (a et b), 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (c et d) et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ (e et f). Les cultures sont réalisées en présence de 5 (a, c et d) et 10mM de chlorure d'ammonium (b, d et f). Photos réalisées au microscope optique (grossissement X10). Les flèches indiquent des endroits dans lesquels les cellules forment des amas. Les cercles indiquent des espaces dans la monocouche.

Les résultats présentés sous forme de graphiques dans la suite de cette étude ont été construits à partir des données chiffrées du tableau 2 pour les conditions contrôles, du tableau 3 pour les conditions à 5 mM de chlorure d'ammonium et enfin du tableau 4 pour les données en présence de 10 mM de NH_4Cl .

Débit (µl/min)	0			10			25		
Densité initiale (106/biopuce)	0.35	0.45	0.65	0.35	0.45	0.65	0.35	0.45	0.65
Densité finale (106/biopuce)	0.51	0.49	0.69	0.75	1.04	1.15	0.70	0.84	1.37
Prolifération	1.5 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.2	2.0 ± 0.4	2.3 ± 0.1	2.1 ± 0.2	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.0	2.2 ± 0.5
Consommation Glucose (µg/h/10 ⁶ cells)	9 ± 2	16 ± 6	10 ± 2	54 ± 4	37 ± 1	29 ± 8	45 ± 3	40 ± 4	28 ± 13
Consommation Glutamine (nmol/h/10 ⁶ cells)	10 ± 11	15 ± 6	9 ± 1	80 ± 23	61 ± 1	76 ± 12	84 ± 23	66 ± 27	43 ± 7
Production Ammoniac (nmol/h/10 ⁶ cells)	6 ± 1	##	2 ± 3	##	##	2 ± 3	##	4 ± 8	##
Synthèse Albumine (ng/h/10 ⁶ cells)	80 ± 4	79 ± 11	163 ± 44	256 ± 2	123 ± 48	95 ± 4	143 ± 82	109 ± 58	77 ± 16
Activité CYP 1A2 (pmol/h/10 ⁶ cells)	81 ± 4	38 ± 8	72 ± 51	ND	125 ± 98	161 ± 49	252 ± 73	281 ± 115	299 ± 119
LDH (% dead/living cells)	27 ± 11	7 ± 5	7 ± 3	<1	<1	<1	2 ± 2	<1	<1

Tableau 3 : Valeurs des densités et du métabolisme des C3A aux débits de 0, 10 et 25 µl/min pour 3 densités d'ensemencement initial en présence de 5 mM de chlorure d'ammonium.

Les données sont extraites après 72 heures de culture en biopuce et sont présentées par la valeur moyenne ± écart-type (n >= 3). Les valeurs déterminées très faibles après calcul du taux sont annotées par « ## ».

Débit ($\mu\text{l}/\text{min}$)	0			10			25		
Densité initiale ($10^6/\text{biopuce}$)	0.35	0.45	0.65	0.35	0.45	0.65	0.35	0.45	0.65
Densité finale ($10^6/\text{biopuce}$)	0.36	0.48	0.47	0.38	0.49	0.58	0.36	0.37	0.63
Prolifération	1.3 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.0	1.0 ± 0.1
Consommation Glucose ($\mu\text{g}/\text{h}/10^6\text{cells}$)	16 ± 4	16 ± 7	13 ± 2	91 ± 10	51 ± 14	68 ± 14	78 ± 28	67 ± 16	53 ± 5
Consommation Glutamine ($\text{nmol}/\text{h}/10^6\text{cells}$)	12 ± 5	15 ± 1	5 ± 2	165 ± 51	80 ± 8	101 ± 32	153 ± 23	132 ± 65	104 ± 23
Production Ammoniac ($\text{nmol}/\text{h}/10^6\text{cells}$)	##	##	##	##	##	##	##	##	##
Production Albumine ($\text{ng}/\text{h}/10^6\text{cells}$)	55 ± 5	114 ± 79	95 ± 31	211 ± 77	125 ± 10	199 ± 35	150 ± 65	171 ± 115	122 ± 68
Activité CYP 1A2 ($\text{pmol}/\text{h}/10^6\text{cells}$)	4 ± 6	62 ± 52	34 ± 35	ND	310 ± 8	794 ± 370	426 ± 136	584 ± 360	487 ± 155
LDH (% dead/living cells)	11 ± 1	6 ± 7	8 ± 5	5 ± 9	<1	3 ± 2	<1	4 ± 7	<1

Tableau 4 : Valeurs des densités et du métabolisme des C3A à des débits de 0, 10 et 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ pour 3 densités d'ensemencement initial en présence de 10 mM de chlorure d'ammonium.

Les données sont extraites après 72 heures de culture en biopuce et sont présentées par la valeur moyenne \pm écart-type ($n \geq 3$). Les valeurs déterminées très faibles après calcul du taux sont annotées par « ## ».

3.2 Prolifération cellulaire

La figure 45 présente les taux de prolifération après 72 heures de culture en biopuce. Ces taux sont calculés pour des densités d'ensemencement de $0,35$; $0,45$ et $0,65 \cdot 10^6$ cellules/biopuce en présence de 0, 5 et 10 mM de NH_4Cl . Les débits sont de 0 (figure 45a), 10 (figure 45b) et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figure 45c).

3.2.1 Effet du NH_4Cl sur la prolifération cellulaire

A 0 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figure 45a), les proliférations cellulaires en présence de NH_4Cl restent faibles. La présence de NH_4Cl induit une limitation de la prolifération cellulaire. En effet, la prolifération cellulaire moyenne est systématiquement inférieure à la prolifération contrôle en présence de 10 mM de chlorure d'ammonium. Ceci est illustré par un taux moyen de $1,0 \pm 0,3$ à 10 mM contre $1,3 \pm 0,3$ à 0 mM et une diminution significative aux densités de $0,35$ ($\alpha = 2,5\%$) et $0,45 \cdot 10^6$ cellules/biopuce ($\alpha = 5\%$). La présence de NH_4Cl à 5 mM, induit également une diminution de la prolifération moyenne, essentiellement pour des densités initiales de $0,35$ et $0,45 \cdot 10^6$ cellules/biopuce. A 5 mM, le taux de prolifération moyen est de $1,2 \pm 0,3$.

A 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figure 45b), la diminution de la prolifération en présence de NH_4Cl est encore plus nette. Quelque soit la densité initialementensemencée, les proliférations en présence de 5 et 10 mM de chlorure d'ammonium sont inférieures aux taux moyens de prolifération calculés à 0 mM. Les taux calculés sont de $2,6 \pm 0,3$; $2,2 \pm 0,1$ et $1,0 \pm 0,0$ à 0, 5 et 10 mM. La diminution à 10 mM est donc très significative au regard des cultures à 0 et 5mM.

A 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, la même tendance est observée (figure 45c).

En condition statique, la diminution de prolifération à forte densité est significative ($\alpha = 2,5\%$). En dynamique par contre, les taux sont relativement proches en présence de chlorure d'ammonium 5 et 10 mM.

La prolifération en condition statique est significativement plus faible devant les conditions dynamiques en présence de 5 mM de NH_4Cl . Par contre, les proliférations sont tellement faibles avec 10 mM, qu'aucune différence significative n'est à noter pour les différents débits.

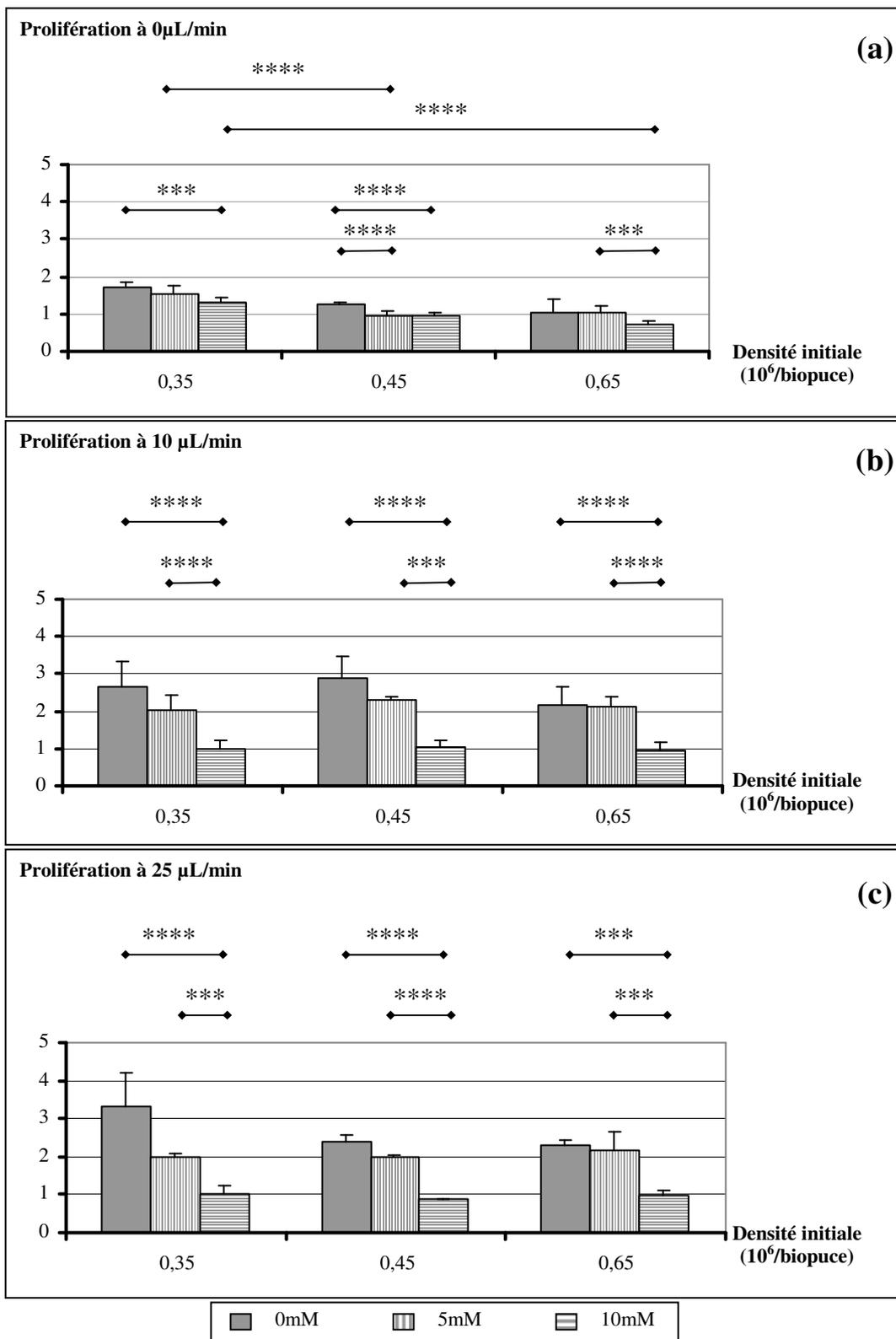


Figure 45 : Graphiques représentant la prolifération des C3A à 0 µL/min (a), 10 µL/min (b) et 25 µL/min (c) pour 3 densités cellulaires initiales en présence de chlorure d'ammonium (0 ; 5 et 10 mM).

3.2.2 Conclusion sur la prolifération cellulaire en présence de NH_4Cl

A 10 mM, le chlorure d'ammonium induit une diminution très nette de la prolifération des C3A au regard des cultures à 0 et 5 mM. A 5 mM, la prolifération des C3A est légèrement plus faible que les cultures standard. Ceci étant, ce chargement peut être considéré comme intermédiaire car les proliférations à $0,65 \cdot 10^6$ cellules/biopuces sont comparables aux cultures réalisées avec du milieu standard.

3.3 Lyse cellulaire par la LDH

La figure 46 présente les taux de relargage de la LDH par les C3A. Ces taux sont exprimés en pourcentage de cellules lysées par rapport au nombre de cellules comptées en fin d'expérience (J4) après 72 heures de culture en biopuce. Les résultats sont présentés pour des débits de 0 (figure 46a), 10 (figure 46b) et 25 $\mu L/min$ (figure 46c) en présence de 0, 5 et 10 mM de chlorure d'ammonium. Les densités d'ensemencement initiales sont de 0,35 ; 0,45 et $0,65 \cdot 10^6$ cellules/biopuce.

3.3.1 Effet du NH_4Cl sur la lyse cellulaire

Il est clairement montré ici que le relargage de la LDH est présent essentiellement en biopuces statiques. Ceci amène à penser que le chlorure d'ammonium n'a pas d'influence sur la lyse cellulaire mais qu'il s'agit plutôt du débit.

Les écart-types relativement importants au niveau des cultures en dynamique montrent que cette lyse cellulaire n'est pas un phénomène homogène dans les biopuces. En effet, certains lots expérimentaux ont présenté de la LDH alors que d'autres n'en ont pas. Par contre, en statique, il est systématiquement détecté de la LDH avec un taux plus ou moins important, ce qui explique les écarts-types.

3.3.2 Conclusion sur le relargage de la LDH en présence de NH_4Cl

Le chlorure d'ammonium n'a pas d'effet sur la lyse cellulaire des C3A cultivés en biopuce. L'effet principal jouant sur le relargage de la LDH est un effet de débit. Ce taux est le plus élevé en biopuce statique.

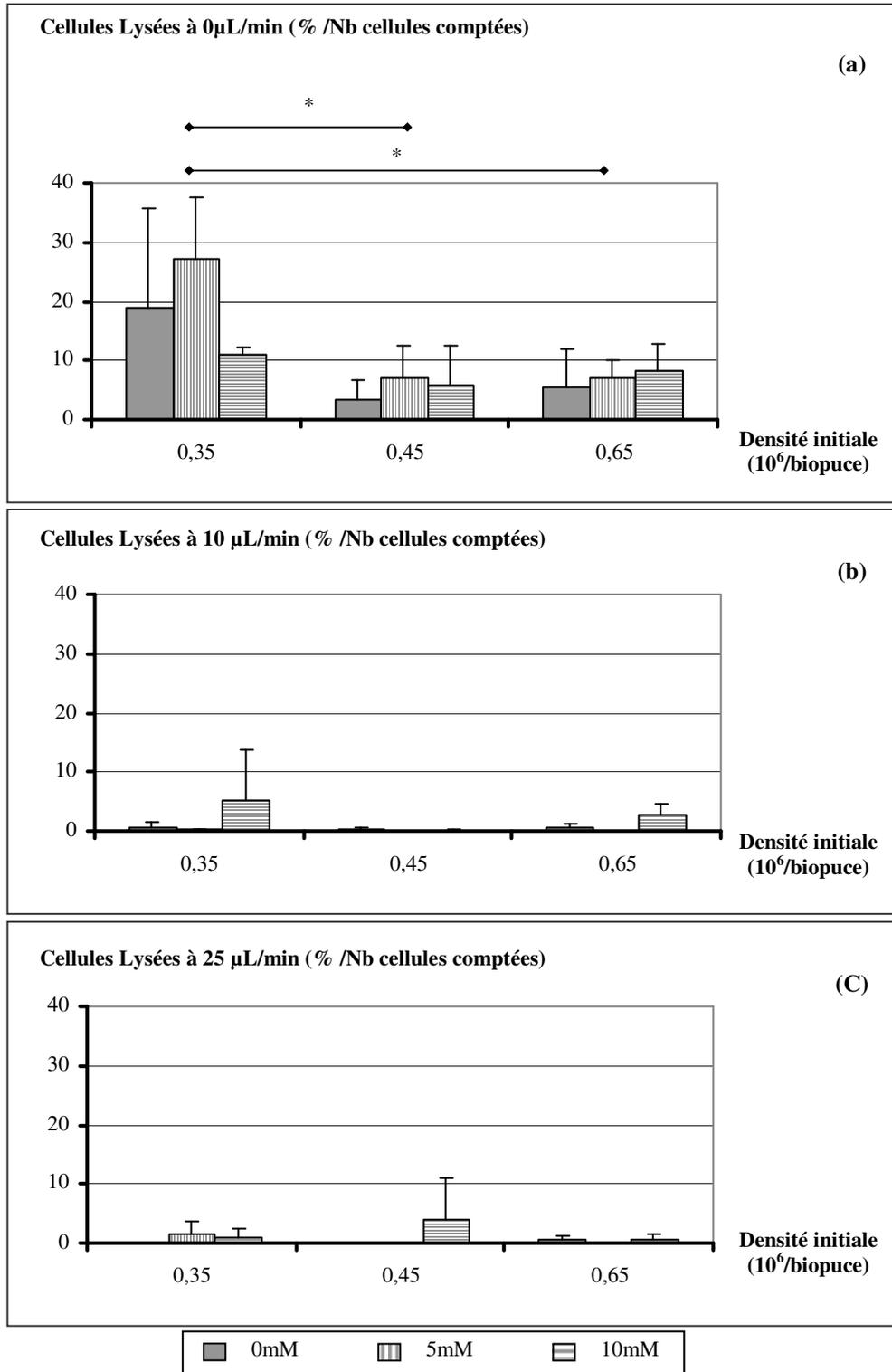


Figure 46 : Représentation graphique du relargage de LDH par les C3A cultivés en biopuce après 72 heures.

Les taux sont exprimés en %/Nombre de cellules comptées en fin d'expérience.

3.4 Consommation de glucose

Les représentations graphiques de la figure 47 sont les consommations de glucose des C3A calculées après 72 heures de culture en biopuce. Les densités initiales étudiées sont 0,35 ; 0,45 et 0,65.10⁶ cellules/biopuce pour des débits de 0 µL/min (figure 47a), 10 µL/min (figure 47b) et 25 µL/min (figure 47c) sous différents chargements de chlorure d'ammonium de concentration 0, 5 et 10 mM.

3.4.1 Effet du NH₄Cl sur la consommation de glucose

A 0 µL/min, les consommations de glucose calculées en présence de chlorure d'ammonium 5 et 10 mM sont de 11 ± 4 et 15 ± 2 µg/10⁶ cellules/h respectivement. Ces taux sont relativement proches des consommations en biopuces contrôles. La présence de NH₄Cl à ces deux concentrations n'influence donc pas la consommation des C3A en glucose.

A 10 µL/min, la consommation moyenne de glucose en présence de 5 mM de chlorure d'ammonium est légèrement plus importante que la consommation à 0 mM. Aucune augmentation significative n'est cependant visible. Par contre, il apparaît à 10 mM que le chlorure d'ammonium augmente de manière significative la consommation en glucose des C3A. La consommation passe alors de 33 ± 6 à 70 ± 20 µg/10⁶ cellules/h. L'augmentation de consommation à 10 mM est également significative au regard de la consommation à 5 mM. Ceci est par exemple montré aux densités extrêmes.

A 25 µL/min, la tendance reste la même. Cette fois l'augmentation de la consommation entre 0 et 10 mM est significative pour toutes les densités étudiées ($\alpha = 5\%$). La consommation augmente de 27 ± 3 à 66 ± 13 µg/10⁶ cellules/h. La consommation à 5 mM augmente également et cette fois, une différence significative apparaît à faible densité ($\alpha = 10\%$).

En comparant les taux de consommation aux différentes densités, il peut être remarqué que la consommation diminue lorsque la densité augmente. Ceci est montré avec plusieurs différences significatives à 10 et 25 µL/min.

Il peut également être remarqué que les consommations en condition statique sont très faibles au regard des consommations déterminées en dynamique.

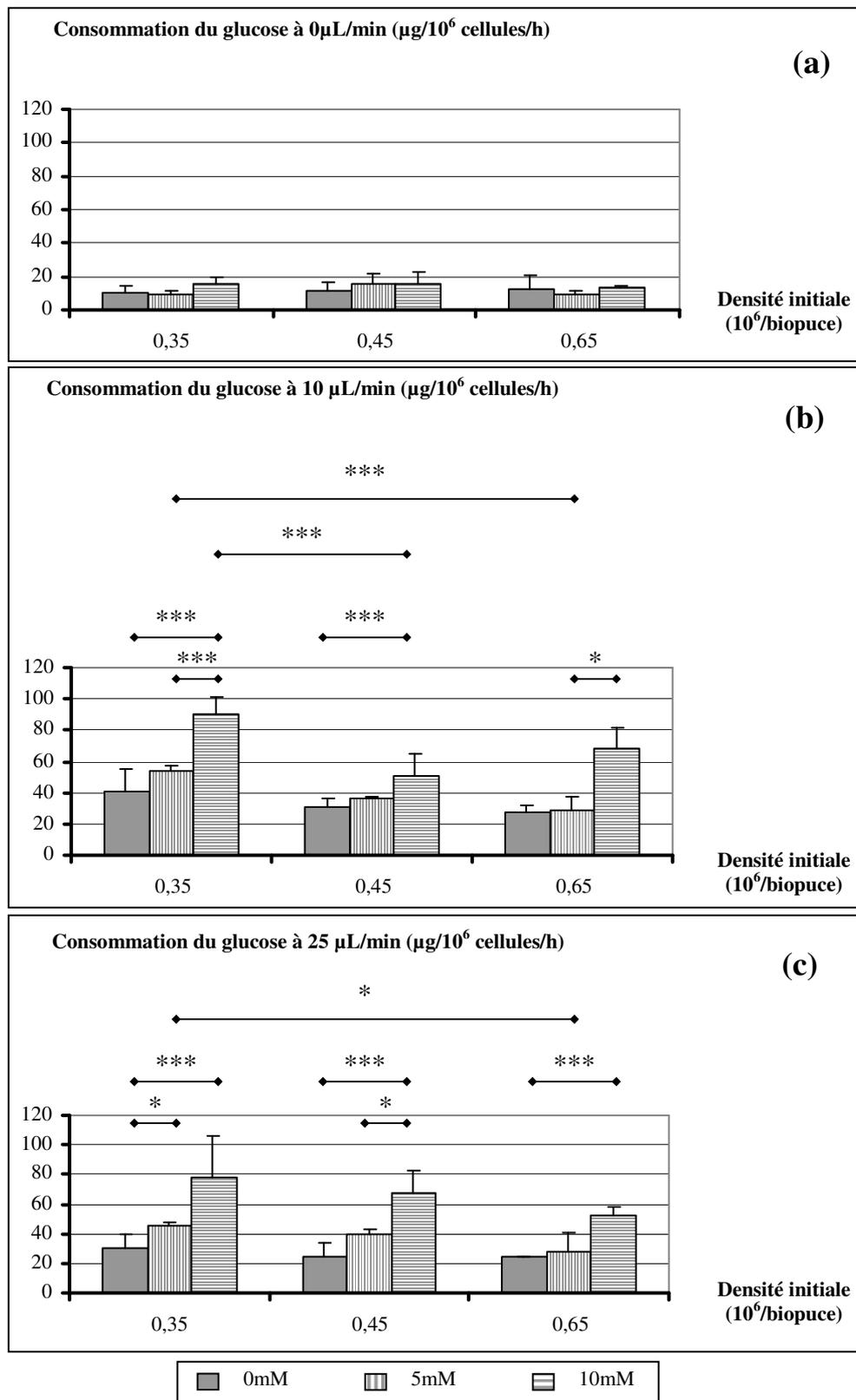


Figure 47 : Représentation graphique des consommations de glucose par les C3A à 0, 10 et 25 µL/min en présence de chlorure d'ammonium pour différentes densité.

3.4.2 Conclusion sur la consommation de glucose en présence de NH_4Cl .

En biopuces statiques, les consommations de glucose par les C3A sont faibles et aucun effet lié au chlorure d'ammonium n'est illustré. Par contre, en conditions dynamiques, la présence de NH_4Cl induit une consommation cellulaire plus élevée. A 10 mM, cette hausse est très importante et significative. La consommation de glucose semble également plus importante à faible densité.

3.5 Consommation de la glutamine

La figure 48 présente les taux de consommation de glutamine après 72 heures de culture en biopuce. Ces taux sont calculés pour des densités d'ensemencement de $0,35$; $0,45$ et $0,65 \cdot 10^6$ cellules/biopuce en présence de 0, 5 et 10 mM de chlorure d'ammonium. Les débits sont fixés à 0 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figure 48a), 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figure 48b) et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figure 48c).

3.5.1 Consommation de la glutamine en présence du NH_4Cl

La consommation de la glutamine en présence de NH_4Cl , suit la même tendance que la consommation du glucose.

En condition statique, les taux de consommation de glutamine sont très faibles quelque soient les chargements de chlorure d'ammonium et les densités étudiées. Avec des taux de consommation à 11 ± 3 et 11 ± 5 en présence de 5 et 10 mM de NH_4Cl , il peut être noté que les consommations de glutamine en présence de chlorure d'ammonium sont inférieures aux consommations moyennes calculées en milieu de culture standard dont la moyenne est à $20 \pm 7 \text{ nmol}/10^6 \text{ cellules}/\text{h}$.

En conditions dynamiques, la présence de 10 mM de NH_4Cl augmente la consommation des C3A en glutamine. A 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, le taux de consommation passe ainsi de $59 \pm 11 \text{ nmol}/10^6 \text{ cellules}/\text{h}$ en milieu de culture standard à $115 \pm 44 \text{ nmol}/10^6 \text{ cellules}/\text{h}$ à 10 mM. L'augmentation est significative pour toutes les densités étudiées (figure 48b). A 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, la consommation passe de 62 ± 5 à $130 \pm 25 \text{ nmol}/10^6 \text{ cellules}/\text{h}$. Cette augmentation est significative aux densités de $0,35$ et $0,45 \cdot 10^6$ cellules/biopuce.

A 5 mM, les consommations moyennes sont légèrement plus importantes mais restent comparables aux consommations en milieu de culture standard. Les taux calculés sont de 72 ± 10 à 10

$\mu\text{L}/\text{min}$ et $64 \pm 21 \text{ nmol}/10^6 \text{ cellules}/\text{h}$ à $25 \mu\text{L}/\text{min}$. Il apparaît alors des différences significatives entre les consommations à 5 et celles à 10mM ($\alpha = 5\%$).

3.5.2 Conclusion sur la consommation de glutamine en présence de NH_4Cl .

En dynamique, la présence de NH_4Cl à 5 mM, augmente légèrement la consommation de glutamine des C3A cultivés en biopuce. A 10 mM, cette augmentation est significativement importante. Une hausse de la consommation est également visible pour les densités faibles et s'illustre par plusieurs différences significatives.

3.6 Bilan de la consommation énergétique en présence de NH_4Cl .

Au niveau des consommations de glucose et de glutamine par les CA3 en biopuce, il peut être retenu que la présence de NH_4Cl , n'a pas d'influence en conditions statiques. Les consommations à 0 $\mu\text{L}/\text{min}$ sont en effet très faibles par rapport aux conditions dynamiques. Ceci traduit que l'absence de débit est le paramètre le plus important dans cette condition de culture.

Par contre, aux débits de 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, les consommations sont plus importantes avec le chlorure d'ammonium. Cette augmentation de la consommation des C3A est nettement visible en présence de 10 mM de NH_4Cl , traduisant d'un stress cellulaire plus important qu'à 5 mM.

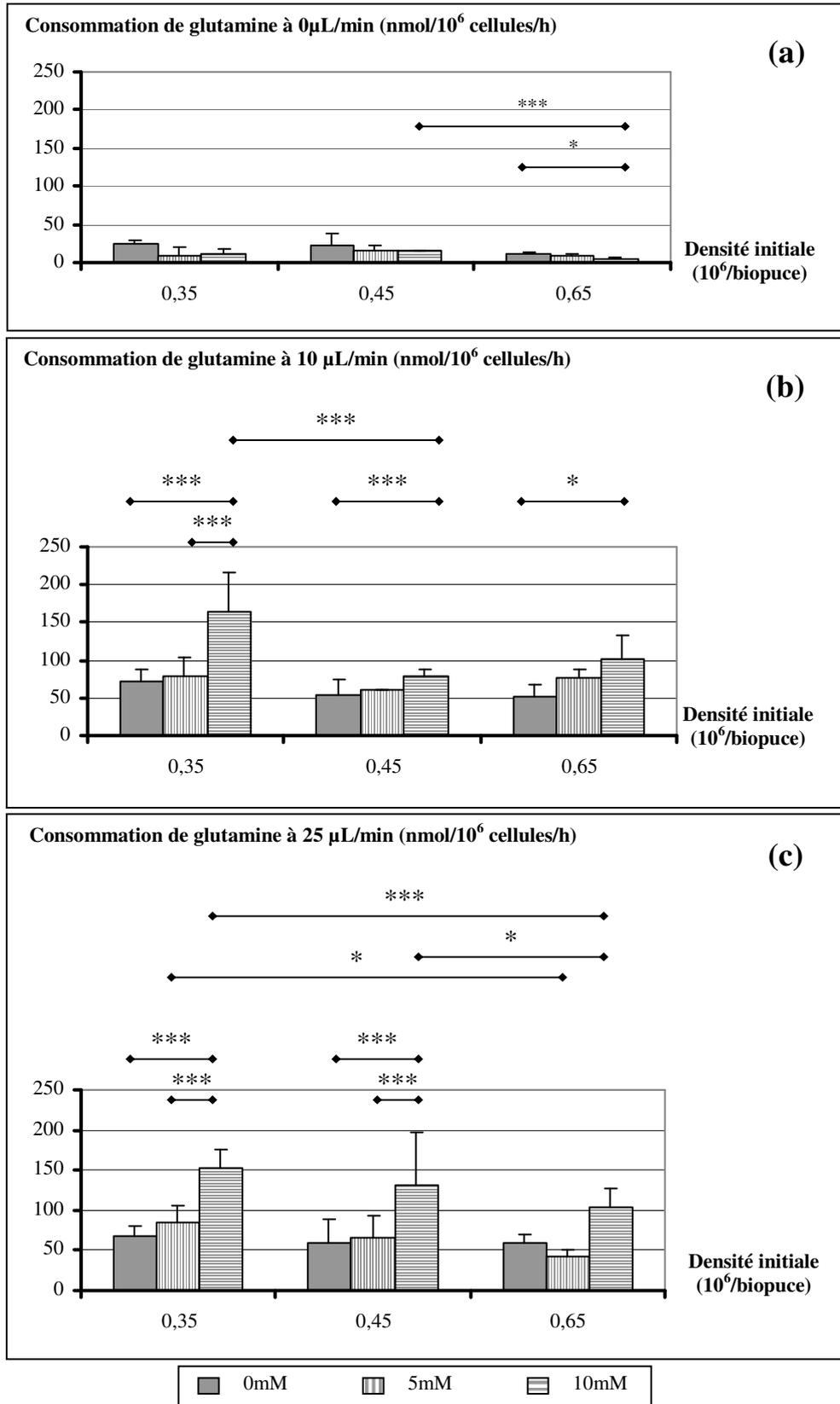


Figure 48 : Représentations graphiques des consommations de glutamine par les C3A à 0, 10 et 25 µL/min en présence de chlorure d'ammonium.

3.7 Production d'ammoniac

La figure 49 présente les productions d'ammoniac pour les cultures de C3A en biopuce. Toutes les conditions de culture ici étudiées sont représentées : Les débits sont de 0, 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, les chargements sont de 0, 5 et 10 mM en chlorure d'ammonium et enfin les densités cellulaires initiales sont de 0,35 ; 0,45 et 0,65. 10^6 cellules/biopuce.

3.7.1 Effet du NH_4Cl sur la production d'ammoniac

Les valeurs les plus fortes de production sur la figure 49 sont les taux calculés en condition standard de culture (0 mM). A 5 mM, quelques productions sont détectées amenant ainsi le taux moyen à 3 ± 3 nmol/ 10^6 cellules/h. Ces productions sont très faibles au regard des biopuces en condition standard. Les autres sont négligeables. En présence de 10 mM de chlorure d'ammonium, la production d'ammoniac est négligeable pour toutes les conditions de culture.

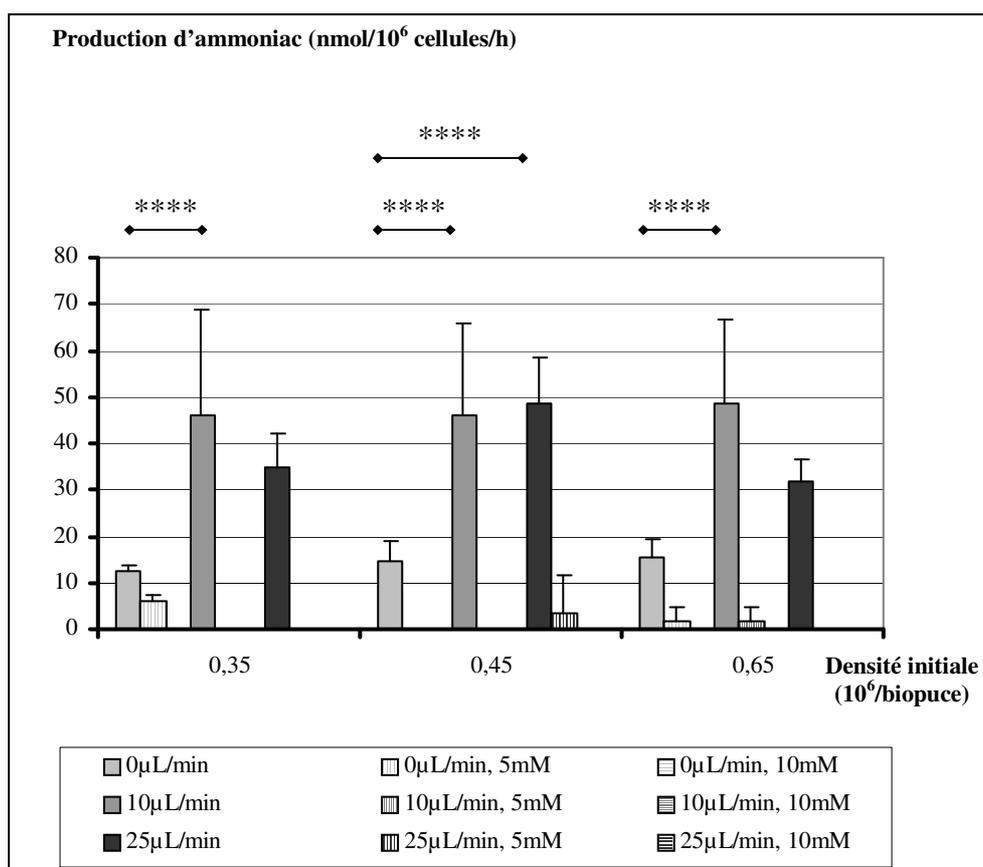


Figure 49 : Représentation graphique de la production d'ammoniac par les C3A à 0, 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ en présence de 0, 5 et 10 mM de chlorure d'ammonium.

3.7.2 Conclusion sur la production d'ammoniac en présence de NH_4Cl .

En présence de chlorure d'ammonium il semble que la production cellulaire d'ammoniac soit faible. Il est cependant apparu précédemment que la consommation de glutamine était supérieure en présence de NH_4Cl . Or, pendant la dégradation de la glutamine par l'enzyme glutaminase, il est relargué de l'ammoniac. Le taux de synthèse de l'ammoniac devrait donc être supérieur avec des chargements de NH_4Cl . En prenant par exemple la valeur moyenne de consommation de glutamine qui est de $125 \text{ nmol}/10^6 \text{ cellules/h}$. Il peut être estimé que 10^6 cellules produisent environ $6 \text{ } \mu\text{mol}$ d'ammoniac pendant 48 heures de culture. Devant des chargements de 5 et 10 mM, il semble qu'en réalité la détection de la production cellulaire en NH_3 soit difficilement réalisable car cette valeur est 1000 à 2000 fois plus faible que les chargements. De plus, la perméabilité aux gaz du silicone est également susceptible de produire des pertes d'ammoniaque non négligeables. Ce point sera abordé ultérieurement au chapitre V de la discussion.

3.8 Synthèse d'albumine

La figure 50 présente les taux de synthèse d'albumine par les C3A cultivés en biopuce après 72 h. Les concentrations en chlorure d'ammonium sont fixées à 0, 5 et 10 mM. Les débits étudiés sont de $0 \text{ } \mu\text{L}/\text{min}$ (figure 50a), $10 \text{ } \mu\text{L}/\text{min}$ (figure 50b) et $25 \text{ } \mu\text{L}/\text{min}$ (figure 50c). Les densités d'ensemencement cellulaire sont de 0,35 ; 0,45 et $0,65 \cdot 10^6$ cellules/biopuce.

3.8.1 Effet du NH_4Cl sur la synthèse d'albumine

En condition statique, la production moyenne d'albumine est de $96 \pm 31 \text{ ng}/10^6 \text{ cellules/h}$. En conditions dynamiques, les productions sont de $158 \pm 58 \text{ ng}/10^6 \text{ cellules/h}$ à $10 \text{ } \mu\text{L}/\text{min}$ et $134 \pm 33 \text{ ng}/10^6 \text{ cellules/h}$ à $25 \text{ } \mu\text{L}/\text{min}$. La production d'albumine est donc plus importante en conditions dynamiques. Elle s'illustre par exemple par une différence statistique déterminée entre les débits de 0 et $10 \text{ } \mu\text{L}/\text{min}$ pour une densité de $0,35 \cdot 10^6$ cellules/biopuce. Cette différence significative est visible pour les chargements de 5 et 10 mM et présente un facteur d'erreur α de 10%.

La grande dispersion des valeurs de production ne nous permet cependant pas d'établir de tendance réellement nette à part que les densités d'ensemencement ou les chargement en NH_4Cl n'ont pas d'influence sur la synthèse d'albumine en biopuce.

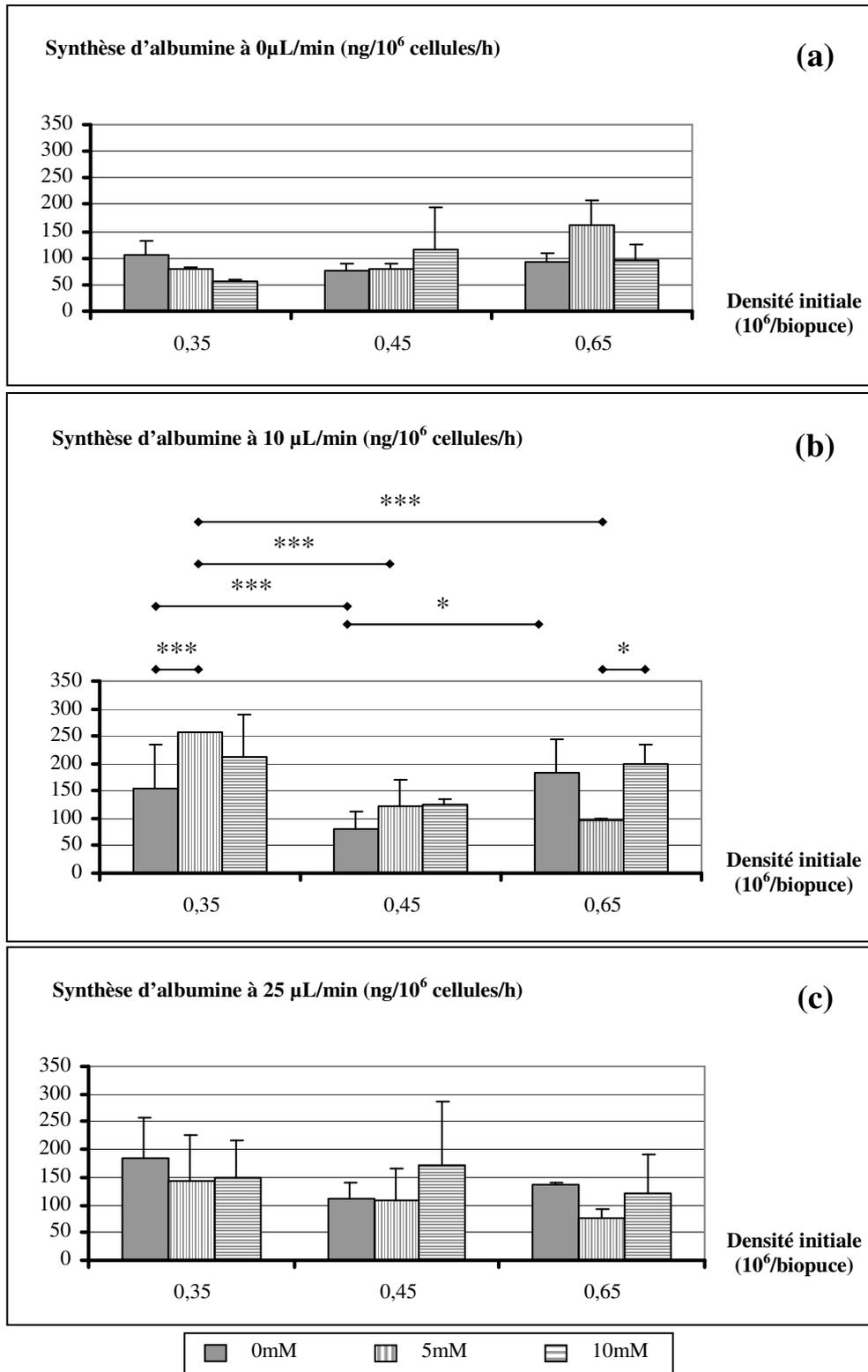


Figure 50 : Représentation graphique de la synthèse d'albumine réalisée par les C3A en présence de chlorure d'ammonium à 0, 10 et 25 µL/min.

3.8.2 Conclusion sur la production d'albumine en présence de NH_4Cl .

La présence de chlorure d'ammonium n'affecte pas particulièrement la production d'albumine des C3A en biopuce. La production est supérieure en biopuces dynamiques mais n'apparaît significative que pour un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

3.9 Activité des CYP 1A2

La figure 51 présente les taux d'activité des CYP 1A2 calculés après 72 heures de culture en biopuce. Ces taux sont présentés pour des densités d'ensemencement de 0,35 ; 0,45 et 0,65.10⁶ cellules/biopuce sous des chargements de 0, 5 et 10 mM de chlorure d'ammonium. Les débits sont fixés à 0 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figure 51a), 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figure 51b) et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figure 51c).

L'activité initiale déterminée en début d'expérience est représentée par la barre notée : « départ ». Cette activité correspond à la moyenne des mesures réalisées en début de chaque expérimentation au temps 0h, juste avant de commencer la perfusion. Sa valeur sur les graphiques ici présentés est de 226 ± 116 pmol/10⁶ cellules/h.

Les valeurs non déterminées sont annotées de la mention : « ND ». Ces valeurs manquantes sont pour les conditions à 0 $\mu\text{L}/\text{min}$, densité 0,35.10⁶ cellules/biopuce en présence de 0 et 5 mM de NH_4Cl et 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, densité 0,35.10⁶ cellules/biopuce en présence de 5 et 10 mM de chlorure d'ammonium.

3.9.1 Effet du NH_4Cl sur l'activité des CYP 1A2

A 0 $\mu\text{L}/\text{min}$, les taux d'activités des CYP 1A2 sont significativement inférieurs au taux d'activité évalué initialement. Le taux moyen d'activité est en effet de 56 ± 29 pmol/10⁶ cellules/h. Ceci démontre une perte d'activité des CYP 1A2 après 72 heures de cultures en biopuces statiques. Cette perte d'activité déjà présente chez les cultures à 0mM est également confirmée en présence de 5 et 10 mM de NH_4Cl .

A 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, les activités des CYP 1A2 en présence de 5 mM de NH_4Cl sont en dessous de la valeur initiale. Ces activités sont comparables aux activités déterminées en milieu de culture standard. A 10 mM, les taux moyens en biopuce sont supérieurs à l'activité initiale. Avec un taux de 794 ± 370 pmol/10⁶ cellules/h, l'activité à 0,65.10⁶ cellules/biopuce semble induite par le NH_4Cl 10 mM.

L'induction par le NH_4Cl est confirmée à 25 $\mu\text{L}/\text{min}$. Toutes les valeurs en présence de 10 mM de chlorure d'ammonium montrent en effet une activité supérieure au regard de l'activité initiale

et des chargements à 5 mM. Pour les plus fortes densités étudiées, les taux sont de 584 ± 360 et 487 ± 155 pmol/ 10^6 cellules/h.

La figure 52 présente l'activité des CYP 1A2 pour les chargements de 5 (figure 52a) et 10 mM (figure 52b). Cette représentation graphique permet de comparer les activités densité par densité pour tous les débits étudiés ici.

Ceci permet notamment de mettre en avant la différence significative d'activité entre les conditions statiques et les conditions dynamiques quelles que soient les concentrations de NH_4Cl utilisées.

A 5 mM, il est également possible de remarquer que l'activité des CYP 1A2 est comparable à la valeur initiale après 72 heures de culture à 25 $\mu\text{L}/\text{min}$.

A 10 mM, il est également intéressant de visualiser que toutes les valeurs en dynamiques sont comparables ou supérieures à la valeur initiale.

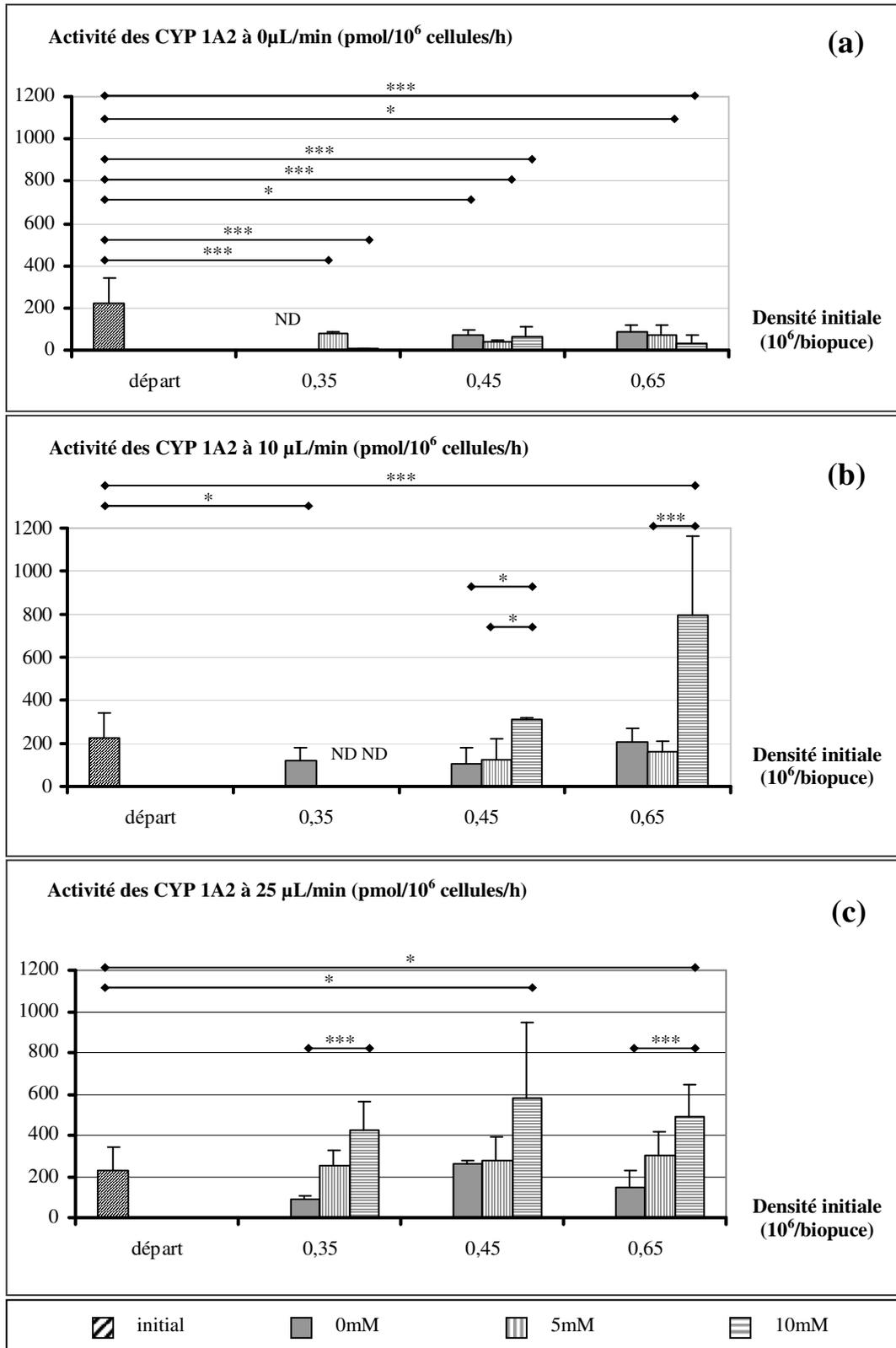


Figure 51 : Représentation graphique de l'activité des Cytochrome P450 1A2 en présence de chlorure d'ammonium à 0, 10 et 25 µL/min.

La barre de valeur initiale représente la quantification de cette activité juste avant la mise en perfusion. Les valeurs non déterminées sont annotées de la mention : « ND ».

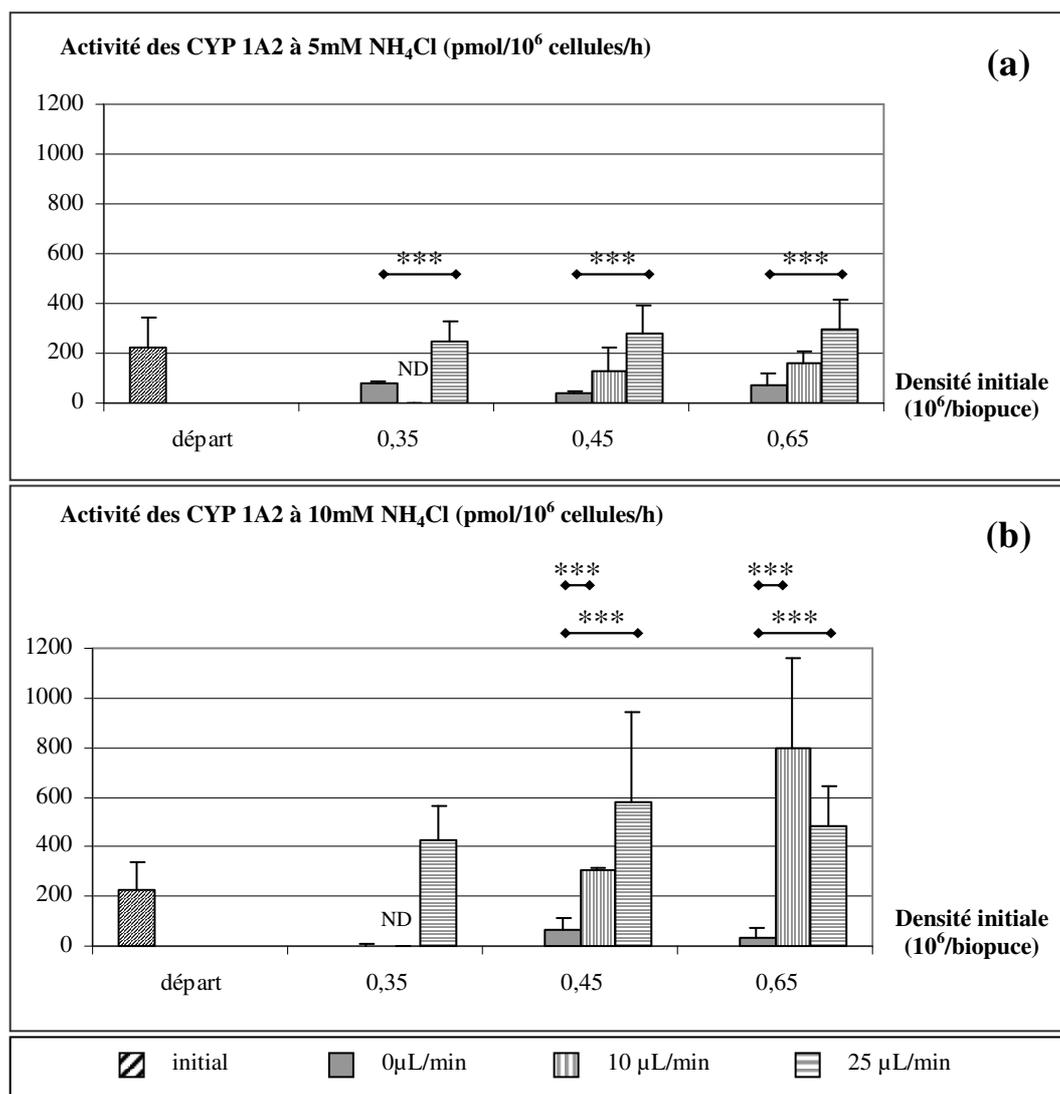


Figure 52 : Représentation graphique de l'activité des CYP 1A2 à 0, 10 et 25 μL/min pour trois densités d'ensemencement initiales à 0,35 ; 0,45 et 0,65.10⁶ cellules/biopuce.

Les taux d'activité sont regroupés en fonction des chargements en chlorure d'ammonium. Le graphique (a) présente les taux d'activité en présence de 5mM de NH₄Cl. Le graphique (b) traite l'activité pour un chargement à 10 mM.

3.9.2 Conclusion sur l'activité des CYP 1A2 en présence de NH₄Cl

L'activité des cytochromes P450 1A2 est systématiquement diminuée après 72 heures de culture en conditions statiques. Par contre, en dynamique, elle est maintenue, voire induite pour des chargements de 10 mM. La combinaison d'un chargement à 5 mM et d'un débit de 25 μL/min semble maintenir l'activité basale durant les 72 heures de perfusion. Ceci est un constat important quand on sait que cette condition de culture est comparable en prolifération et en activité métabolique à la condition standard.

3.10 Conclusions pour la culture en biopuce des C3A avec le NH_4Cl .

Les tendances établies grâce aux résultats qui ont été présentés sont résumées sur le tableau 5, pour toutes les densités. La condition de culture en biopuces dynamiques à 0 mM est considérée ici comme le contrôle et les autres conditions de culture sont comparées.

En condition statique, il peut être remarqué que tous les paramètres tels que la prolifération, consommation, production et activité des CYP450 diminuent très largement. Cette diminution est constatée quels que soient les chargements de NH_4Cl , impliquant que le facteur limitant pour la culture de cellule est la condition nulle de débit.

Pour les débits de 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, les tendances sont relativement proches. C'est pourquoi, les tendances à ces deux conditions de débit sont présentées dans la colonne intitulée : « Dynamique ».

En présence de 10 mM de chlorure d'ammonium, une modification importante de la morphologie est remarquée. Les cellules s'arrondissent et leur volume augmente. La prolifération diminue de manière importante tandis que les consommations de glucose et glutamine augmentent. L'activité des CYP 1A2 est également en hausse.

Avec un chargement de 5 mM, la tendance précédemment établie est plus nuancée. En effet, la prolifération moyenne est légèrement plus basse, les consommations de glucose et glutamine sont en légère hausse, tout comme l'activité des CYP 1A2.

Condition	Dynamique			Statique			
	[NH ₄ Cl] (mM)	0	5	10	0	5	10
Morphologie		étalées petites	étalées petites	arrondies grosses	étalées petites	étalées petites	étalées petites
Prolifération	2.6 ± 0.4	↘	↓	↓	↓	↓	
Glucose (µg/h/10 ⁶ cells)	30 ± 6	↗	↑	↓	↓	↓	
Glutamine (nmol/h/10 ⁶ cells)	61 ± 8	↗	↑	↓	↓	↓	
Ammoniac (nmol/h/10 ⁶ cells)	44 ± 8			↓	↓	↓	
Albumine (ng/h/10 ⁶ cells)	141 ± 40	→	→	↘	↘	↘	
CYP 1A2 (pmol/h/10 ⁶ cells)	155 ± 67	↗	↑	↓	↓	↓	
LDH (% mortes/vivantes)	<1	→	↗	↗	↗	↗	

Tableau 5 : Synthèse des tendances observées durant la culture des C3A en biopuces statiques et dynamiques avec ou sans NH₄Cl.

4. Résultats des tests préliminaires réalisés sur les MDCK

Les tests en plaque 12 puits réalisés avec les C3A pour le revêtement à la fibronectine et les chargements de chlorure d'ammonium sont reproduits avec les cellules MDCK.

4.1 Test de revêtement de fibronectine avec les cellules MDCK

Les cellules MDCK sont cultivées durant 72 heures sur quatre types de revêtements : fond de boîte TCPS avec et sans traitement à la fibronectine et PDMS avec et sans dépôt de fibronectine. Les cellules sontensemencées dans les puits préalablement préparés et après une nuit d'adhésion, un premier comptage noté au temps 0 h est réalisé en tripléte. Le suivi des cultures est ensuite réalisé toutes les 24 heures durant 3 jours. Les photos des morphologies cellulaires réalisées au microscope optique sont présentées avec la figure 53. La figure 54 présente les résultats des comptages cellulaires pour les quatre conditions de cultures.

Le comptage à 0h fait état du nombre de cellules MDCK adhérees au début de l'expérience. Les quantités de cellules sur TCPS, TCPS+FN et PDMS+FN ne sont pas significativement différentes. Avec une moyenne de $0,13 \pm 0,03 \cdot 10^6$ cellules/cm², le nombre de cellules pour ces trois conditions est 2 fois plus important que pour la culture réalisée sur PDMS. La quantité de cellules adhérees à cette condition est en effet de $0,06 \pm 0,02 \cdot 10^6$ cellules/cm². Ce faible nombre de cellules adhérees est significatif ($\alpha = 10\%$) en comparaison du revêtement de PDMS+FN. Les photos 53a, 53b et 53c illustrent cette situation au début de l'expérience. Les surfaces de TCPS (figure 53a) et PDMS+FN (figure 53b) sont en effet recouvertes de cellules MDCK tandis que la surface de PDMS présente de nombreux espaces vides (cercles sur la figure 53c). Les amas cellulaires non adhérees sur le PDMS sont éliminés par les rinçages justes avant le comptage cellulaire. Ceci explique le faible nombre de cellules comptées au temps 0h.

Durant les premières 24 heures de culture, la prolifération cellulaire est semblable pour toutes les conditions surfaciques. Cette prolifération est de $1,6 \pm 0,1$. Le nombre de cellules sur PDMS sans traitement préalable est encore significativement faible ($\alpha = 5\%$). Entre 24 et 48 heures, les cultures en présence de fibronectine, ralentissent leur prolifération qui est de $1,2 \pm 0,1$. Les autres conditions sans fibronectine par contre, présentent une prolifération plus élevée. Sur TCPS, le taux est de $1,9 \pm 0,3$ et le taux sur PDMS est de $2,7 \pm 0,3$.

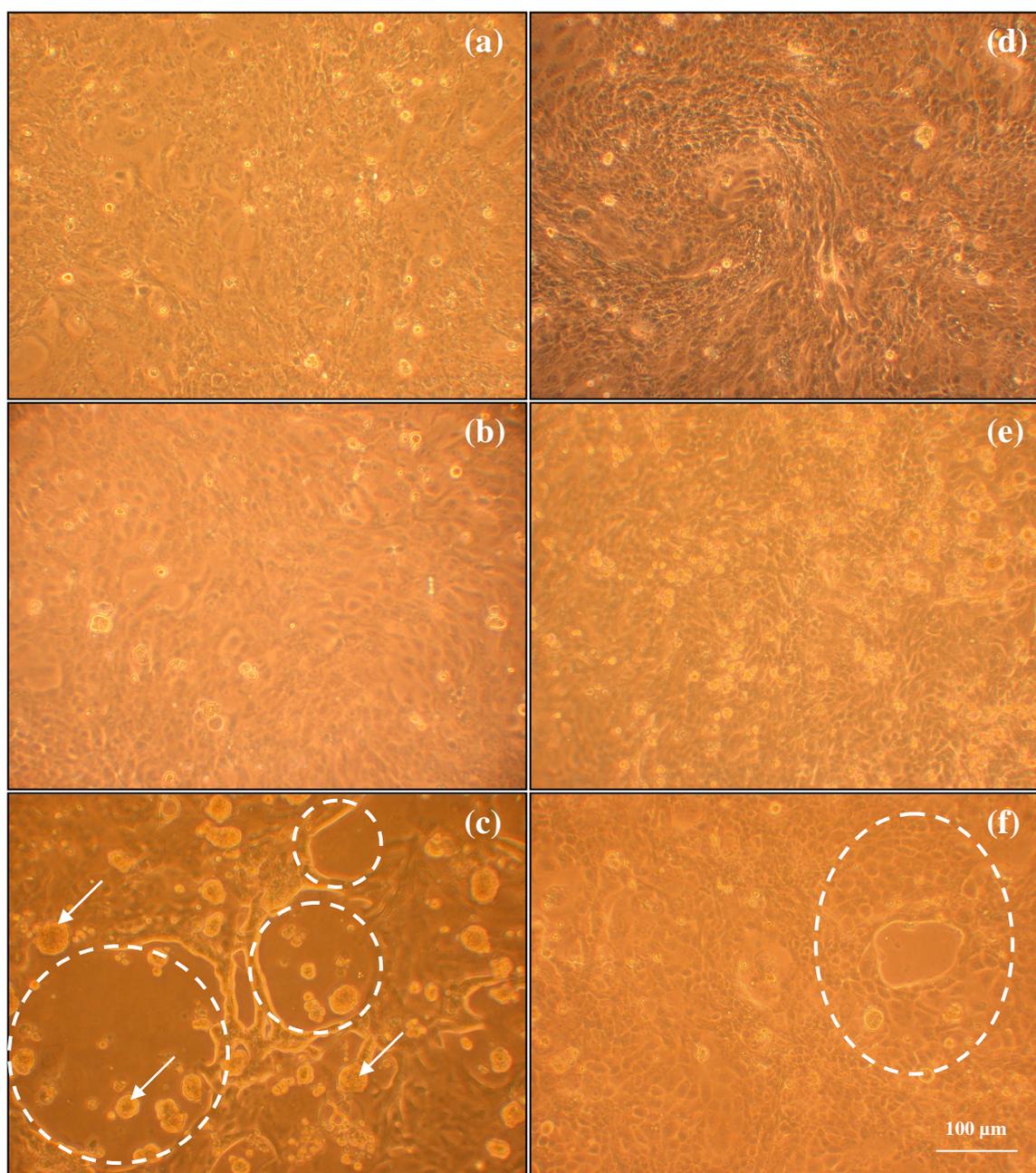


Figure 53 : Photos de cellules MDCK cultivés en puits avec des revêtements de surface différents à 0 et 72 heures (X10).

Photos des cultures après adhésion (a-c). Photos après 72 heures de culture (d-f). MDCK sur revêtement TCPS (a et d), sur PDMS recouvert de fibronectine (10 μ g/mL) (b et e) et sur PDMS sans traitement préalable (c et f).

Entre 48 et 72 heures, le nombre de cellules sur TCPS, TCPS+FN et PDMS+FN augmente encore avec une prolifération moyenne de $1,3 \pm 0,4$. Le nombre de cellules final est de $0,42 \pm 0,04 \cdot 10^6$ cellules/cm². Par contre, sur PDMS, le nombre de cellules n'augmente pas avec une prolifération de $0,9 \pm 0,3$. Le nombre final de cellules à cette condition de culture est de $0,20 \pm 0,07 \cdot 10^6$ cellules/cm². Ceci peut être corrélé avec les morphologies cellulaires de la figure 53. Sur PDMS (figure 53f), les cellules forment une monocouche après 72 heures, mais les cellules sont plus grosses et certains espaces libres persistent (ellipse sur la figure 53f), indiquant que le nombre de cellules est moins important que pour les autres conditions où le tapis cellulaire est dense (figures 53b et 53d).

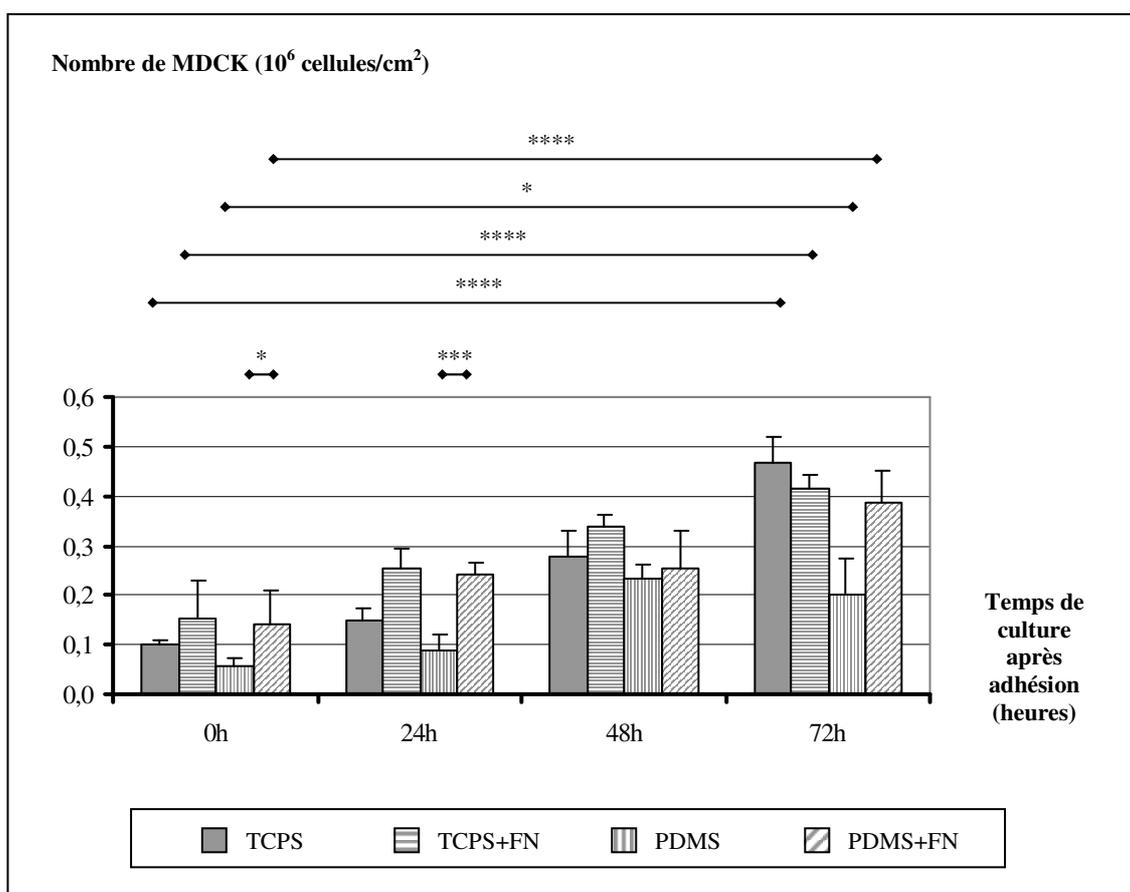


Figure 54 : Nombre de cellules MDCK en plaque multi-puits pour différents revêtements surfaciques.

4.2 Test de culture cellulaire MDCK en présence de NH_4Cl

Les MDCK sont ensemencés en puits recouvert de PDMS+FN. Après adhésion, 3 puits sont détachés et comptés. Le comptage est représenté au temps 0 h en pointillés sur la figure 55. Le milieu de culture des autres puits restants est remplacé par du milieu enrichi de chlorure d'ammonium à 0 ; 0,5 ; 1 ; 5 et 10 mM (représenté sur le graphique de la figure 55 par une flèche). Des comptages pour ces 5 conditions de culture sont réalisés en tripléte après 24, 48 et 72 heures de chargement en chlorure d'ammonium. Des photos illustrant les morphologies cellulaires au début et en fin d'expérience sont présentées par la figure 56.

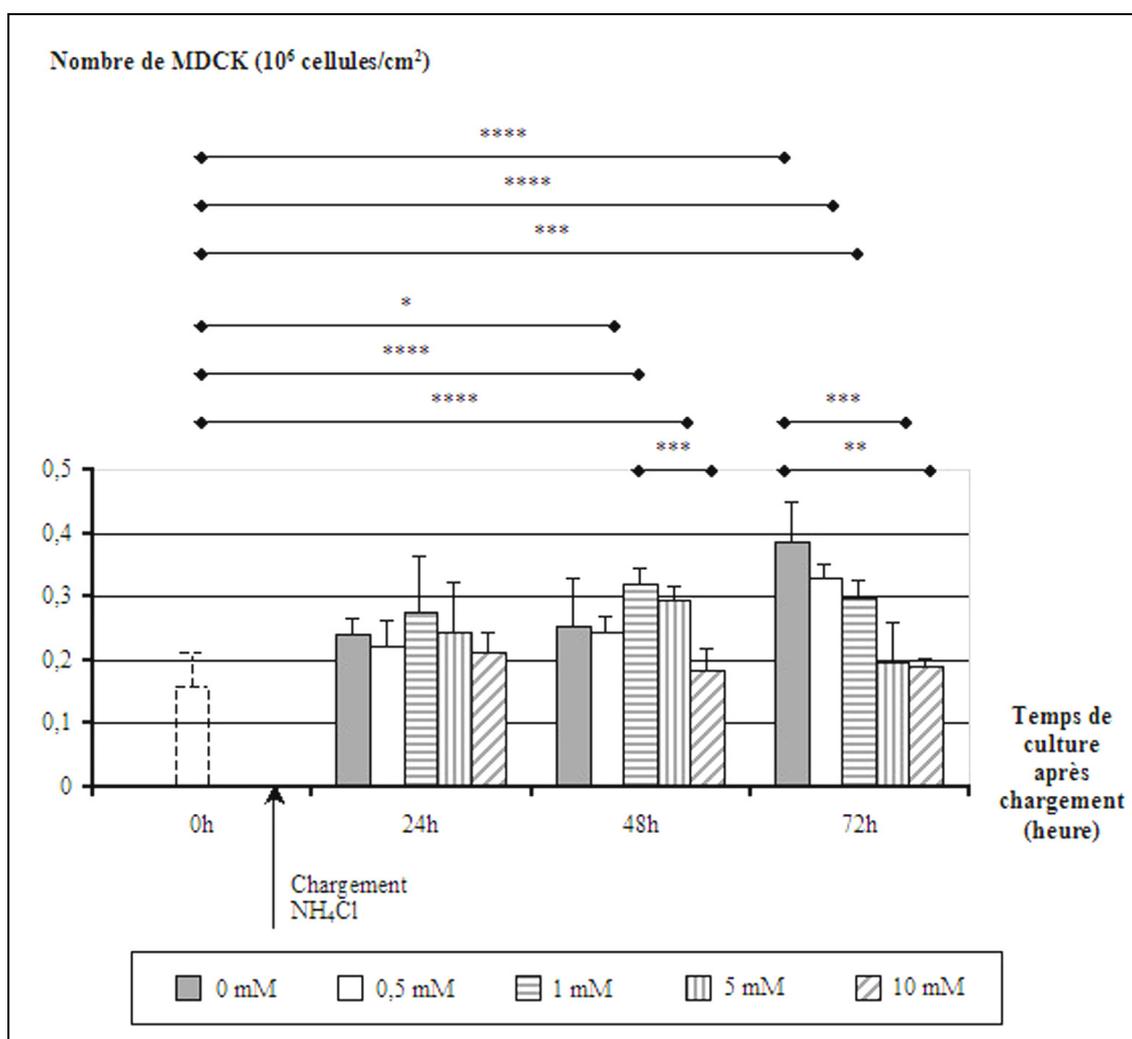


Figure 55 : Représentation graphique du nombre de cellules MDCK en fonction du temps en présence de chlorure d'ammonium.

La barre à 0 h représente le nombre de cellules ensemencées initialement pour toutes les conditions.

24 heures après les différents chargements en NH_4Cl , le nombre de MDCK n'est pas significativement différent d'une condition à l'autre. La quantité moyenne de cellules est estimée à $0,24 \cdot 10^6$ cellules/cm² pour une quantité initiale de $0,16 \pm 0,05 \cdot 10^6$ cellules/cm². Ceci représente une prolifération sur 24 heures de $1,5 \pm 0,2$.

Entre 24 et 48 heures, la prolifération cellulaire se poursuit pour toutes les conditions de culture, à l'exception des cultures sous un chargement à 10 mM. Dans ce cas, la prolifération est de $0,9 \pm 0,2$ conduisant à une diminution du nombre moyen de cellules en culture. Ce nombre tombe à $0,18 \pm 0,03 \cdot 10^6$ cellules/cm². Une différence significative apparaît alors avec les puits dont le nombre de cellules est important telle que la condition à 1 mM ($\alpha = 5\%$). Cette quantité de cellules ne change pas entre 48 et 72 heures avec une prolifération de $1,0 \pm 0,1$. L'effet du chlorure d'ammonium à 10mM apparaît ainsi dès les premières 48 heures avec une réduction significative de la prolifération ($\alpha = 7,5\%$). Un second effet apparaît plus tardivement sur les cultures de MDCK. A 5 mM, le nombre de cellules est diminué de manière significative ($\alpha = 5\%$) après 72 heures de culture. La prolifération cellulaire tombe alors à $0,7 \pm 0,2$ et le nombre final de cellules est de $0,20 \pm 0,06 \cdot 10^6$ cellules/cm². L'effet du NH_4Cl à 5 mM est ainsi plus tardif et n'est visible qu'à 72 heures. Ces différences de prolifération à 5 et 10 mM sont visibles sur les photos (e) et (f) de la figure 56. Des zones sur la monocouche cellulaire présentent des espaces libres et des cellules de tailles importantes (cercles) alors que pour les autres conditions de culture, le tapis cellulaire est dense.

4.3 Conclusions des tests préliminaires réalisés avec les MDCK

Les tests réalisés en plaque multi-puits nous permettent de valider l'effet bénéfique d'un revêtement de fibronectine à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour la culture de cellules MDCK sur PDMS. La quantité de cellules adhérentes sur le PDMS+FN est semblable à la quantité obtenue sur le TCPS+FN et permet rapidement d'obtenir une monocouche. De plus, le développement des cellules sur PDMS+FN se fait de manière stable contrairement aux cultures réalisées sur le PDMS sans traitement qui présentent de grosses variations de prolifération à 48 et 72 heures.

Les chargements de chlorure d'ammonium réalisés sur les MDCK nous permettent de caractériser une concentration critique à 10mM stoppant de manière importante leur prolifération dès les premières 48 heures de culture. Une deuxième concentration à 5 mM de NH_4Cl apparaît également intéressante car son effet est plus tardif et apparaît en fin d'expérience, à 72 heures.

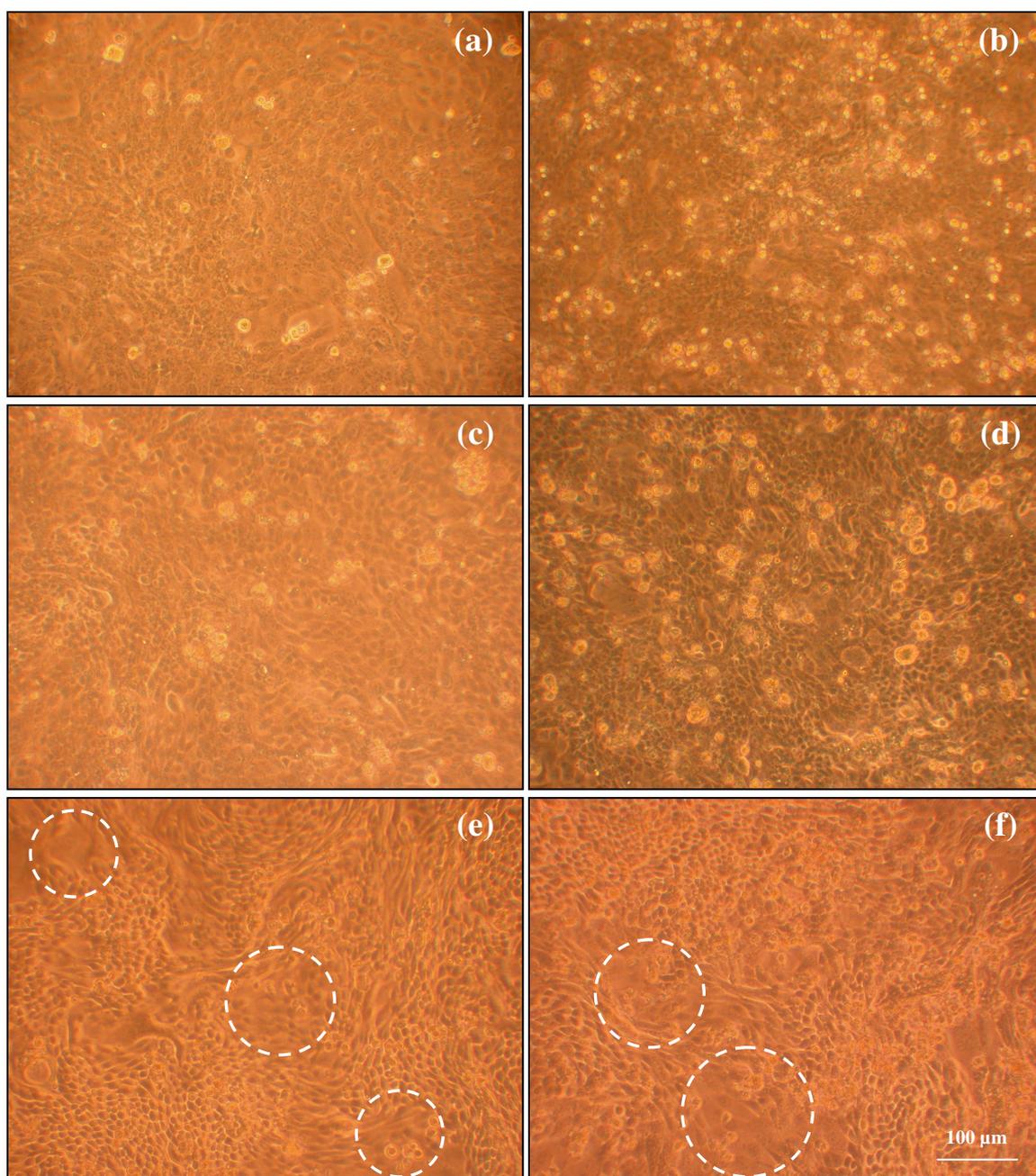


Figure 56 : Photos de cellules MDCK en culture sur PDMS+FN avec et sans NH_4Cl .

Photos réalisées au microscope optique pour un grossissement X10. Cellules MDCK en culture juste après adhésion (0 h) (a). Photos des cultures après 72 heures (b-f). MDCK en milieu culture standard ou milieu sans NH_4Cl (0 mM) (b). MDCK en milieu de culture supplémenté en NH_4Cl à 0,5 mM (c), 1 mM (d), 5 mM (e) et 10 mM (f).

La fibronectine est donc utilisée pour faciliter l'adhésion des MDCK en biopuces. Après caractérisation de la biopuce en conditions statiques et dynamiques, nous proposons également d'étudier l'effet du chlorure d'ammonium à 5 et 10 mM sur les cultures MDCK pour différentes conditions d'ensemencement et de débit.

5. Caractérisation de la biopuce avec les cellules MDCK

5.1 Morphologies et proliférations cellulaires en biopuce

Les morphologies cellulaires des cellules MDCK sont présentées sur la figure 57. La figure 57a est l'observation des MDCK au temps 0h, après adhésion sur le fond microstructuré de la biopuce. Les figures 57b,c et d représentent les MDCK après 72 heures de culture à 0 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figure 57b), 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figures 57c) et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figure 57d). Les graphiques présentés sur la figure 58 dans cette partie sont construits avec les valeurs chiffrées du tableau 6 en fin de section.

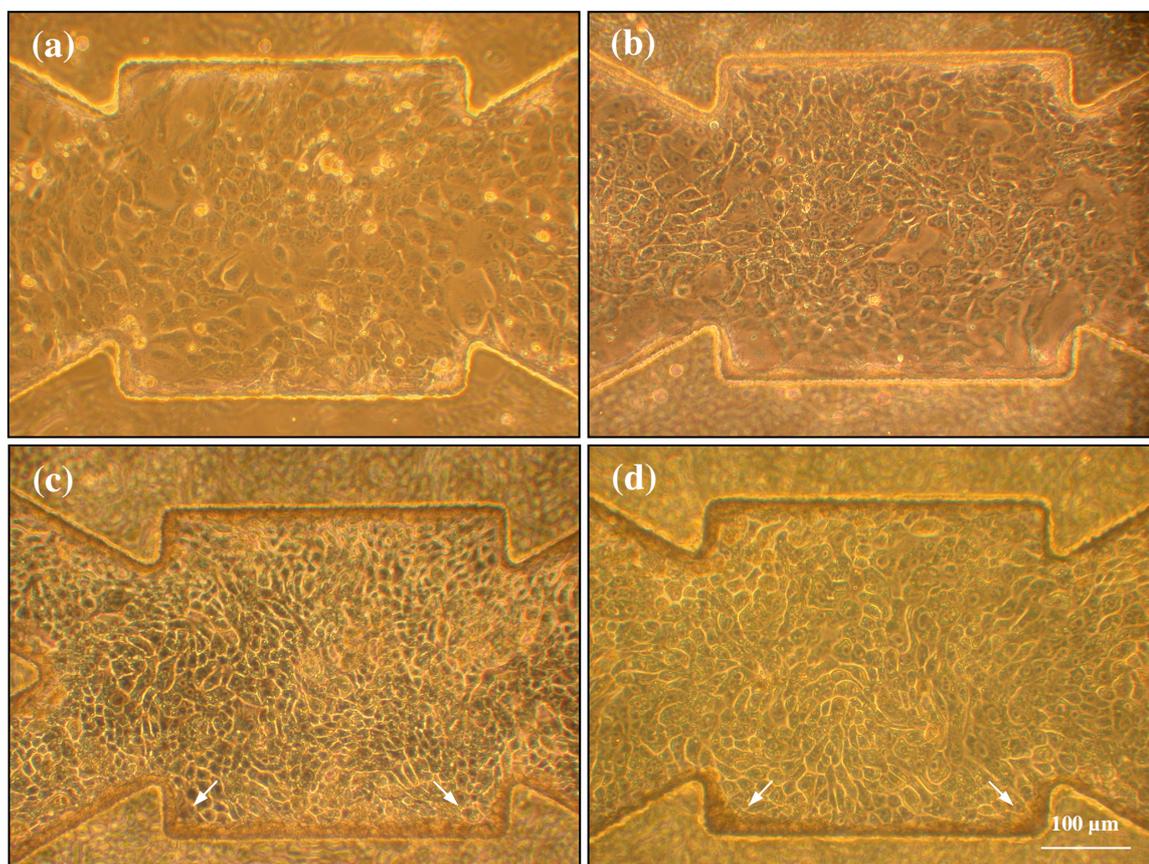


Figure 57 : Photos réalisées au microscope optique (objectif X10) de cellules MDCK en biopuce.

Photo des MDCK après adhésion sur les microstructures de la biopuce (a). Photos de cellules MDCK après 72 heures de culture en biopuce dans du milieu de culture standard (b-d). Les photos présentent ici les trois conditions de débit appliquées sur les cultures cellulaires : 0 $\mu\text{L}/\text{min}$ (b), 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (c) et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ (d). Les flèches indiquent la formation d'amas cellulaires le long des microstructures.

Après adhésion cellulaire, les MDCK sont étalés sur le fond de la biopuce. Certaines zones présentent des cellules serrées. Sur d'autres zones, où les cellules sont plus grosses des espaces vides sont présents.

Après 72 heures de culture en biopuce, les cellules forment une monocouche que ce soit en statique ou en dynamique. Les cellules forment des jonctions sur toute la surface de la biopuce dont certaines sont très réfringentes. En condition dynamique, les bords des microstructures sont bordés de cellules comme le montre les flèches sur les photos 57c et 57d. Pour les débits à 0 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figure 57b et 57d), les cellules sont de taille moyenne et le noyau cellulaire est bien visible. A 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, les cellules sont plus petites et le noyau n'est pas apparent. Les cellules paraissent plus serrées et donc plus nombreuses à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Ceci est vérifié par une prolifération plus importante des MDCK à cette condition (figure 58a). Le taux est en effet de $2,3 \pm 0,1$ contre $1,0 \pm 0,0$ et $1,4 \pm 0,1$ à 0 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ quelque soient les densités d'ensemencement initiales.

La prolifération à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ est significativement supérieure à la prolifération des conditions statiques ($\alpha = 5\%$) quelque soient les densités. En revanche, la prolifération à 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ est statistiquement supérieure à la prolifération statique que pour une densité de $0,75 \cdot 10^6$ cellules/biopuce.

5.2 Consommations cellulaires de glucose

En conditions statiques, le taux moyen de consommation du glucose par les MDCK est de $22 \pm 7 \mu\text{g}/10^6$ cellules/h. Ce taux est plus faible que les taux déterminés en dynamique (figure 58b). La consommation moyenne est de 29 ± 11 à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ et $52 \pm 22 \mu\text{g}/10^6$ cellules/h à 25 $\mu\text{L}/\text{min}$.

A 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, la consommation est légèrement supérieure à la culture statique et aucune différence significative n'est relevée. Par contre, à 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, la consommation est plus importante. Des différences significatives sont présentes quelles que soient les densités.

Il apparaît également que la consommation est liée au nombre de cellulesensemencées. En effet, plus la densité est importante, moins la consommation est élevée. Cet effet est nettement marqué entre les densités extrêmes quelque soient les conditions de débit ($\alpha = 5\%$).

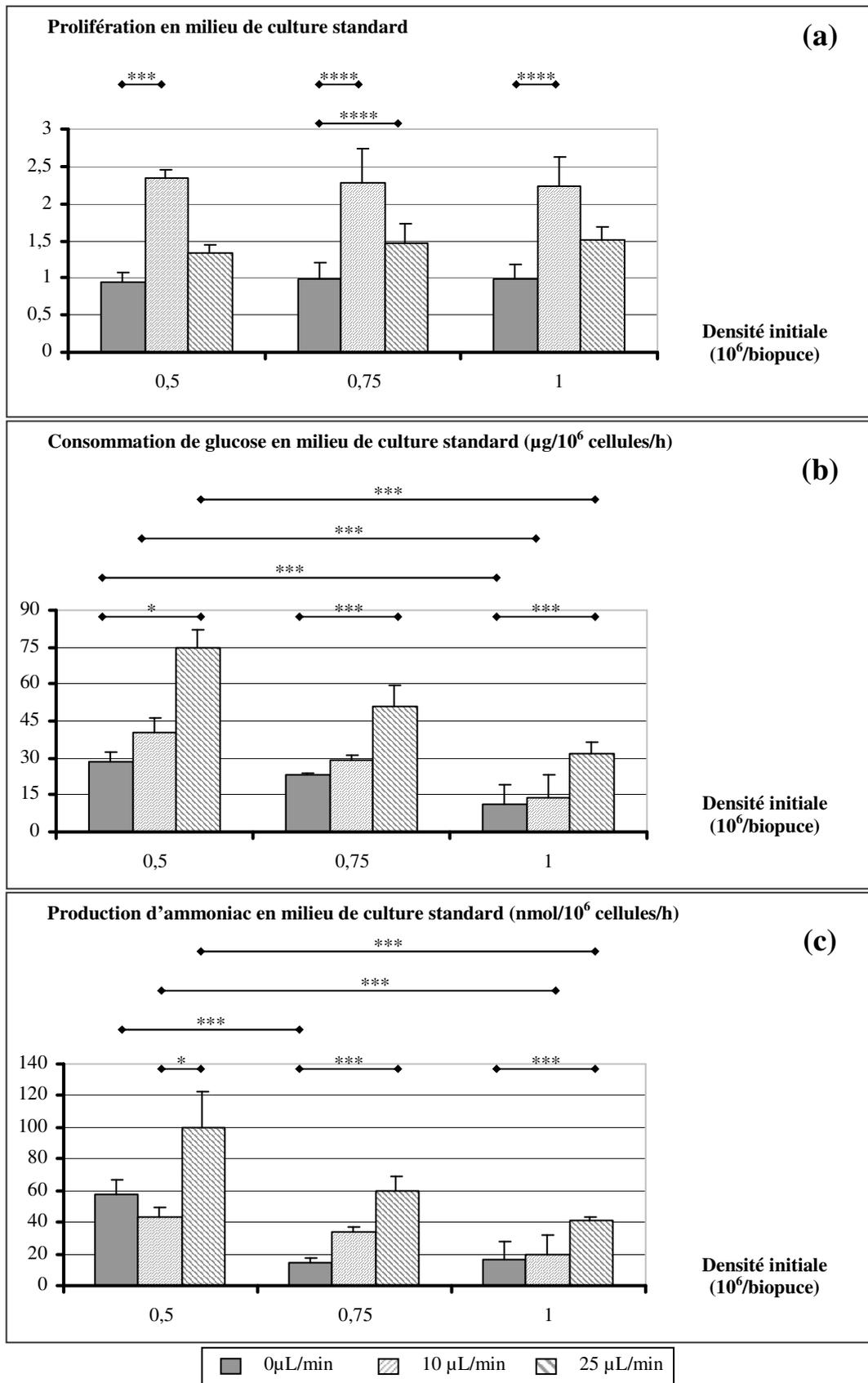


Figure 58 : Représentations graphiques des proliférations, consommations de glucose et synthèses d'ammoniac par les MDCK en biopuces statiques et dynamiques.

5.3 Production d'ammoniac

Le taux moyen de production d'ammoniac à 0 $\mu\text{L}/\text{min}$ est de 31 ± 23 nmol/ 10^6 cellules/h. Ce taux est relativement proche de la production calculée à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ qui est de 34 ± 9 nmol/ 10^6 cellules/h. Par contre, la production d'ammoniac à 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ est supérieure. Avec un taux de 52 ± 22 nmol/ 10^6 cellules/h, cette production est significativement plus importante que la production à 0 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les facteurs d'erreur sont en effet de 10% à la densité de $0,5 \cdot 10^6$ cellules/biopuce et 5% pour les deux autres densités (figure 58c).

Il est également remarqué que la densité cellulaire diminue la production de l'ammoniac. Ceci est statistiquement vérifié ($\alpha = 5\%$). La production diminue ainsi de 43 ± 6 à 25 ± 2 pour un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ et diminue de 100 ± 23 à 42 ± 2 au débit de 25 $\mu\text{L}/\text{min}$.

5.4 Conclusions sur la culture de MDCK en biopuce

Avec des taux constants quelle que soit la densité d'ensemencement, il apparaît que la prolifération est supérieure en biopuce dynamique au regard des conditions statiques. La prolifération apparaît comme étant plus élevée à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les consommations de glucose et productions d'ammoniac sont également supérieures en conditions dynamiques. Cependant, c'est à 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ que les valeurs les plus importantes sont retrouvées. Ainsi, les taux de consommation et de production sont 2 fois plus élevée à 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ en comparaison des cultures statiques.

La densité en biopuce MDCK n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire. Par contre, il est à noter une diminution des consommations de glucose et productions d'ammoniac lorsque la densité augmente.

Débit (µl/min)	0			10			25		
Densité initiale (10 ⁶ /biopuce)	0.5	0.75	1	0.5	0.75	1	0.5	0.75	1
Densité finale (10 ⁶ /biopuce)	0.5	0.8	1.0	1.1	1.7	2.3	0.7	1.1	1.6
Prolifération	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.5	2.2 ± 0.4	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.2
Consommation Glucose (µg/h/10 ⁶ cells)	29 ± 4	23 ± 0	15 ± 4	40 ± 6	29 ± 2	18 ± 1	75 ± 8	51 ± 9	32 ± 4
Production Ammoniac (nmol/h/10 ⁶ cells)	57 ± 10	14 ± 3	22 ± 3	43 ± 6	34 ± 2	25 ± 2	100 ± 23	60 ± 9	42 ± 2

Tableau 6 : Valeurs des densités finales et du métabolisme des MDCK pour des débits de 0, 10 et 25 µL/min en milieu de culture standard.

[NH ₄ Cl] (mM)	5			10		
Débit (µL/min)	0	10	25	0	10	25
Densité finale (10 ⁶ /biopuce)	0.6	1.0	1.2	0.5	0.5	0.8
Prolifération	1.0 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.3	1.1 ± 0.1
Consommation Glucose (µg/h/10 ⁶ cells)	23 ± 5	47 ± 9	34 ± 2	21 ± 1	52 ± 5	33 ± 3
Production Ammoniac (nmol/h/10 ⁶ cells)	25 ± 6	23 ± 9	##	23 ± 20	##	##

Tableau 7 : Valeurs des densités finales et du métabolisme des MDCK pour des débits de 0, 10 et 25 µL/min en présence de NH₄Cl à 5 et 10 mM. La densité d'ensemencement initial est de 0,75.10⁶ cellules/biopuce.

6. Biopuce et MDCK sous chargement de NH_4Cl

Les morphologies des cellules MDCK sont présentées sur la figure 59. Cette figure montre les photos des MDCK en biopuce après 72 heures de culture pour des conditions de débit à 0 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figures 59a et b), 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figures 59c et d) et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figures 59e et f). Les chargements en NH_4Cl sont ici de 5 mM (figures 59a-e) et 10 mM (figures 59b-f). La figure 60 présente les proliférations, consommations de glucose et productions d'ammoniac. Ces graphiques sont construits avec les tableaux 6 et 7 à la densité d'ensemencement à $0,75 \cdot 10^6$ cellules/biopuce.

6.1 Morphologies et proliférations en présence de NH_4Cl

Les photos de la figure 59 présentent les morphologies des MDCK en présence de chlorure d'ammonium. Il peut être remarqué qu'une monocouche cellulaire est visible pour toutes les conditions ici présentées. Cependant, les morphologies de ces monocouches sont différentes.

En conditions statiques et pour une concentration de 10 mM de NH_4Cl , les cellules ont une taille relativement importante avec un noyau cellulaire apparent à certains endroits. En présence de 5mM de NH_4Cl , les cellules MDCK forment un tapis cellulaire avec des cellules de petites tailles.

A 10 $\mu\text{L}/\text{Min}$, cette différence entre les cultures à 5 et 10 mM est encore plus marquée. La différence de tailles est nettement visible. De plus, en présence de 10 mM de NH_4Cl , les MDCK présentent des morphologies allongées avec des espaces libres entre les cellules comme le montre les flèches de la figure 59(d). Cette différence de morphologie montre que la quantité de cellules à 10 mM est plus faible qu'avec un chargement à 5 mM. Ceci est confirmé par la valeur de la prolifération qui est de $0,9 \pm 0,3$ à 10 mM contre $1,5 \pm 0,2$ à 5 mM dans ces conditions de débit.

A 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, la différence de morphologie pour les deux concentrations est moins visible. Les cellules sont de taille moyenne et serrées les unes avec les autres sur une monocouche. Il apparaît cependant à 10 mM, quelques espaces libres dans la monocouche (flèches sur la figure 59f) montrant une quantité de cellules plus faible. Ceci est également corrélé par la prolifération cellulaire sur la figure 60(a). La prolifération à 5 mM est en effet supérieure à la prolifération des biopuces chargées à 10 mM. Les taux de prolifération sont alors de $1,5 \pm 0,1$ à 5 mM contre $1,1 \pm 0,1$ à 10 mM.

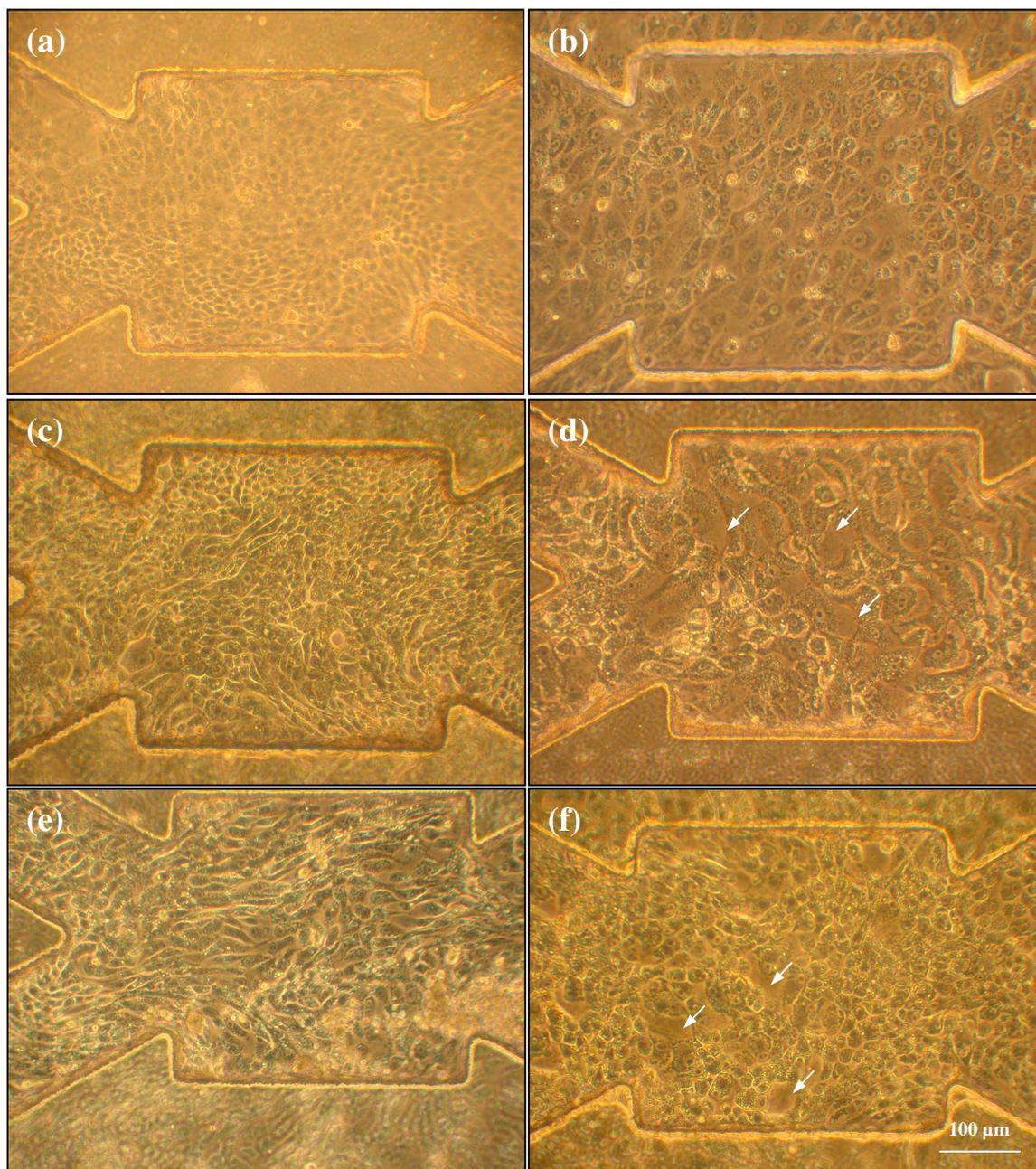


Figure 59 : Photos des MDCK en biopuce avec ou sans NH_4Cl (grossissement X10).

Photos prises à 72 heures des MDCK en culture statique (0 $\mu\text{L}/\text{min}$) dans une biopuce avec un milieu enrichi de chlorure d'ammonium à 5 mM (a) et un milieu à 10 mM (b). MDCK en biopuce après 72 heures dans des conditions de débit dynamique à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Photos des cultures en milieu à 5 mM (c) et 10 mM de chlorure d'ammonium (d). MDCK en biopuce après 72 heures pour un débit de 25 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les photos (e) et (f) présentent les cultures pour un milieu à 5 mM et 10 mM de chlorure d'ammonium respectivement.

6.2 Consommation de glucose en présence de NH_4Cl

La figure 60(b) présente les consommations de glucose des cellules MDCK en biopuce pour une densité initiale de $0,75 \cdot 10^6$ cellules/biopuce. Les chargements de chlorure d'ammonium sont de 0, 5 et 10 mM pour des débits de 0, 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$.

A 0 $\mu\text{L}/\text{min}$, les consommations cellulaires en glucose sont identiques quelque soient les chargements de NH_4Cl . Le taux moyen de consommation est de $22 \pm 1 \mu\text{g}/10^6$ cellules/h.

A 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, le taux de consommation de glucose augmente avec la concentration de chlorure d'ammonium. Les taux de consommation sont en effet de 47 ± 9 et $52 \pm 5 \mu\text{g}/10^6$ cellules/h à 5 et 10 mM respectivement. Ceci est corrélé par une différence significative ($\alpha = 10\%$) pour les consommations entre 0 et 5 mM et les consommations entre 0 et 10 mM. Une hausse significative de la consommation est également rapportée à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ au regard des consommations en biopuces statiques ($\alpha = 5\%$).

Pour un débit de 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, les consommations de glucose à 5 et 10 mM sont proches et inférieures aux consommations des cultures contrôles. En présence de chlorure d'ammonium, les taux de consommation sont de 33 ± 0 avec NH_4Cl contre $51 \pm 9 \mu\text{g}/10^6$ cellules/h à 0 mM. La différence entre les consommations à 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ n'est cependant pas statistiquement différente.

6.3 Production d'ammoniac en présence de NH_4Cl

Les productions d'ammoniac réalisées par les MDCK en biopuce statiques et dynamiques sont présentées sur la figure 60(c). Les taux de production sont calculés à une densité cellulaire initiale de $0,75 \cdot 10^6$ cellules/biopuce pour des débits de 0, 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ en contact avec des concentrations de NH_4Cl de 0 ; 5 et 10 mM.

A 0 $\mu\text{L}/\text{min}$, les taux de production d'ammoniac sont équivalents quelque soient les chargements de NH_4Cl . Le taux moyen de production est de $21 \pm 6 \text{nmol}/10^6$ cellules/h.

A 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, les productions à 0 et 5 mM sont relativement proches. Par contre, aucune production n'est détectable à 10 mM. A 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, la production d'ammoniac est également indétectable en présence de 5 et 10 mM de chlorure d'ammonium.

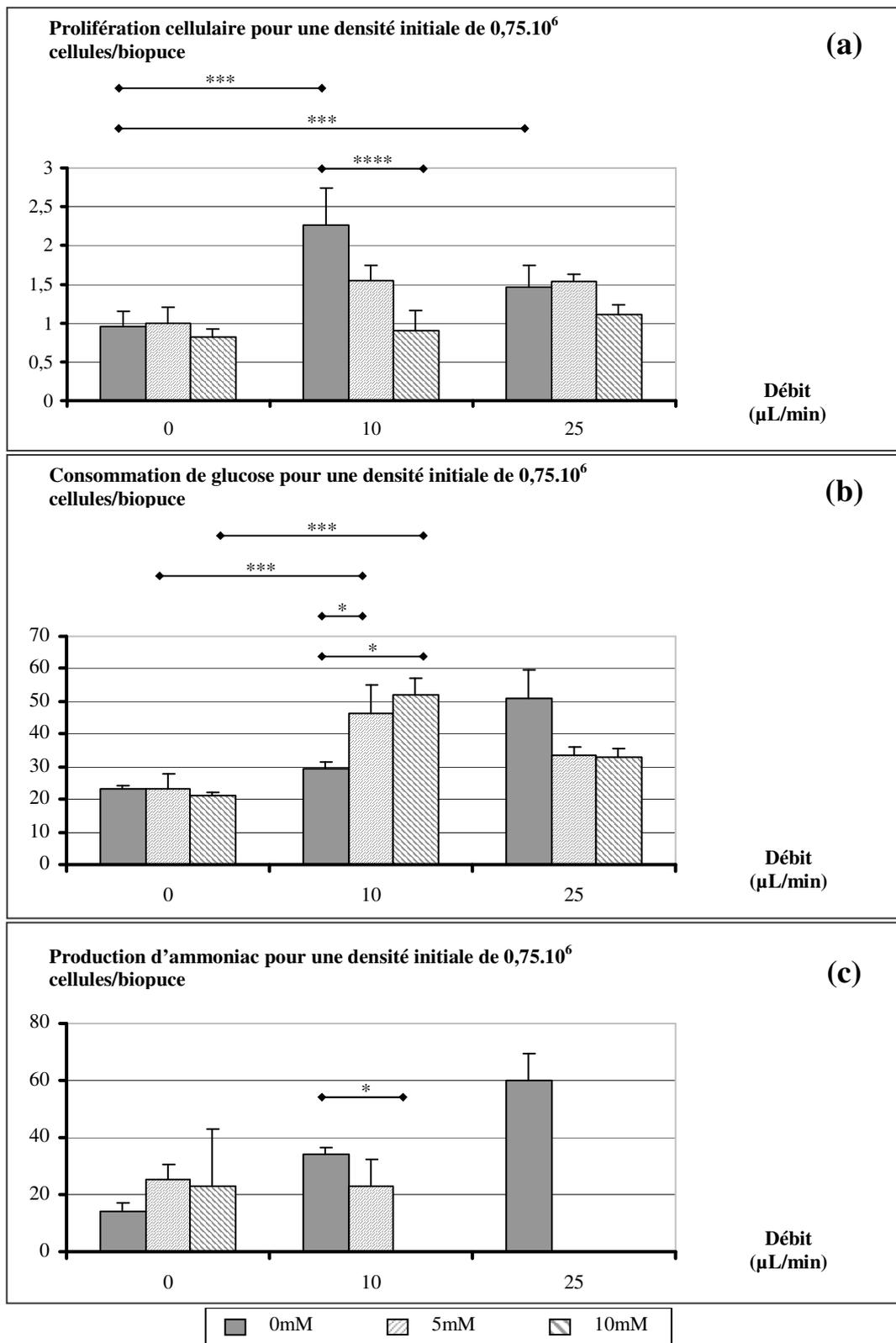


Figure 60 : Représentation graphique de la prolifération, consommation de glucose et production d'ammoniac des cellules MDCK cultivées en biopuce avec des chargements en chlorure d'ammonium de 0 ; 5 et 10 mM.

Pour les mêmes raisons évoquées précédemment avec la culture de C3A en biopuce, la détection de la production cellulaire d'ammoniac est également difficile lorsque le milieu est surchargé en NH₄Cl. La quantification de la consommation de glutamine présente initialement dans le milieu de culture pourrait permettre d'estimer le taux de production de l'ammoniac, comme cela a été réalisé avec les C3A.

6.4 Conclusions sur la culture de MDCK en biopuce chargée de NH₄Cl

L'étude de l'influence du chlorure d'ammonium sur les MDCK est réalisée pour une densité cellulaire initiale de 0,75.10⁶ cellules/biopuce. A cette densité, la comparaison entre trois concentrations de chlorure d'ammonium à 0, 5 et 10 mM nous permet d'établir que le NH₄Cl n'a pas de rôle prépondérant sur la prolifération cellulaire à 0 et 25 μL/min, mais que le facteur limitant est plutôt le débit. En effet, il est remarqué une diminution des paramètres de prolifération, consommation et production à 0 μL/min et une réduction de la prolifération à 25 μL/min.

Par contre, à 10 μL/min la prolifération cellulaire est maximale. Dans ce cas, l'influence du NH₄Cl est visible en biopuce. A 10 mM, le chlorure d'ammonium diminue la prolifération en biopuce de manière importante et augmente la consommation de glucose. Le stress engendré par ce chargement est visible sur la morphologie cellulaire avec des tailles de cellules importantes et des espaces libres dans la monocouche. A 5 mM, la réponse cellulaire est plus nuancée avec une morphologie très peu modifiée et une réduction de prolifération moins importante qu'à 10 mM.

Débit (μl/min)	10			25			0		
	0	5	10	0	5	10	0	5	10
[NH ₄ Cl] (mM)	0	5	10	0	5	10	0	5	10
Morphologie	étaillées petites	étaillées petites	étaillées grosses	étaillées moyennes	étaillées moyennes	étaillées moyennes	étaillées moyennes	étaillées petites	étaillées grosses
Prolifération	2.3 ± 0.5	↘	↓	↘	↘	↓	↓	↓	↓
Glucose (μg/h/10 ⁶ cells)	29 ± 2	↗	↗	↗	↗	↗	↘	↘	↘
Ammoniac (nmol/h/10 ⁶ cells)	34 ± 2	↘		↑			↓	↘	↘

Tableau 8 : Synthèse des tendances observées durant la culture de MDCK en biopuces avec ou sans NH₄Cl.

CHAPITRE V : DISCUSSION

1. Microfabrication des biopuces

Les biopuces sont fabriquées à l'aide de moules microstructurés. Ces moules sont réutilisables un grand nombre de fois et permettent de mouler une quantité importante de répliques nécessaires à l'assemblage des biopuces. Le moulage se fait avec du PDMS ; un silicone très utilisé dans les applications médicales (biomatériaux, domaine pharmaceutique ...) ²¹⁶. Le procédé de fabrication utilisé dans cette étude nous permet ainsi de fabriquer rapidement un nombre important de biopuces.

Grâce au collage irréversible réalisable avec le PDMS, la biopuce est fermée de manière hermétique et permanente ce qui facilite son utilisation. Les tubes en silicone des connectiques d'entrée et sortie de la biopuce sont scellés avec du PDMS. Les biopuces sont donc entièrement réalisées en silicone et supportent ainsi les grands écarts de température. La stérilisation de nos supports de culture est alors réalisée par autoclave ce qui permet de travailler dans des conditions optimales pour la culture cellulaire. Les biopuces supportent également les nettoyages répétés aux SDS permettant alors de réutiliser un grand nombre de fois les mêmes supports. Le travail est réalisé avec une vingtaine de biopuces simultanément et plusieurs conditions sont testées en parallèle.

Les biopuces sont éliminées lorsque le collage (bonding) casse. Cette rupture apparaît pour deux raisons : la première est due à une mauvaise manipulation de l'expérimentateur qui introduit une pression trop importante. La seconde raison est le résultat d'une fatigue qui apparaît après de nombreuses manipulations. La mise en place des cultures cellulaires se fait par introduction d'une légère pression afin de limiter le risque de bulles d'air. L'introduction répétée de pressions dans la biopuce déforme légèrement la chambre et fait ainsi travailler le collage. Afin de renforcer celui-ci, une surface de contact entre les deux répliques est nécessaire. La découpe des répliques se fait alors le plus éloignée possible des microstructures.

2. Design de la biopuce

La biopuce consiste en une chambre fermée. La surface de la chambre est microstructurée. Ceci permet d'augmenter la surface de culture de $1,2 \text{ cm}^2$ à 2 cm^2 pour un volume de $30 \text{ }\mu\text{L}$. Rappelons que la surface d'un puits de culture est de $3,8 \text{ cm}^2$ pour 2 mL de volume de milieu. Le ratio surface/volume est donc très largement supérieur en biopuce. Le haut de la chambre est un volume circulant qui permet d'homogénéiser la perfusion du milieu de culture dans la chambre quelque soit l'état de la culture cellulaire (figure 61a). En effet, une étude précédente montre dans la littérature que

la répartition cellulaire modifie l'écoulement en microcanal²⁰⁹. Un amas de cellules risque par exemple d'encombrer un canal privant toute une partie de la population de milieu nutritif. La prolifération des cellules peut également modifier les vitesses d'écoulement. Le tapis cellulaire qui recouvre la surface interne d'un canal, réduit la section de l'écoulement. Le débit étant constant, la vitesse d'écoulement augmente alors dans les canaux voisins. Le tissu n'est alors pas irrigué de manière homogène et les taux de cisaillement engendrés dans les parties d'accélération du fluide risquent d'être trop élevés et d'arracher les cellules (figure 61b). L'espace prédéfini avec la partie supérieure permet de maintenir une section d'écoulement qui limite ainsi l'augmentation des vitesses et des cisaillements à l'intérieur des canaux. Dans notre cas de biopuce, la vitesse de l'écoulement diminue à l'endroit du rétrécissement dans les microcanaux.

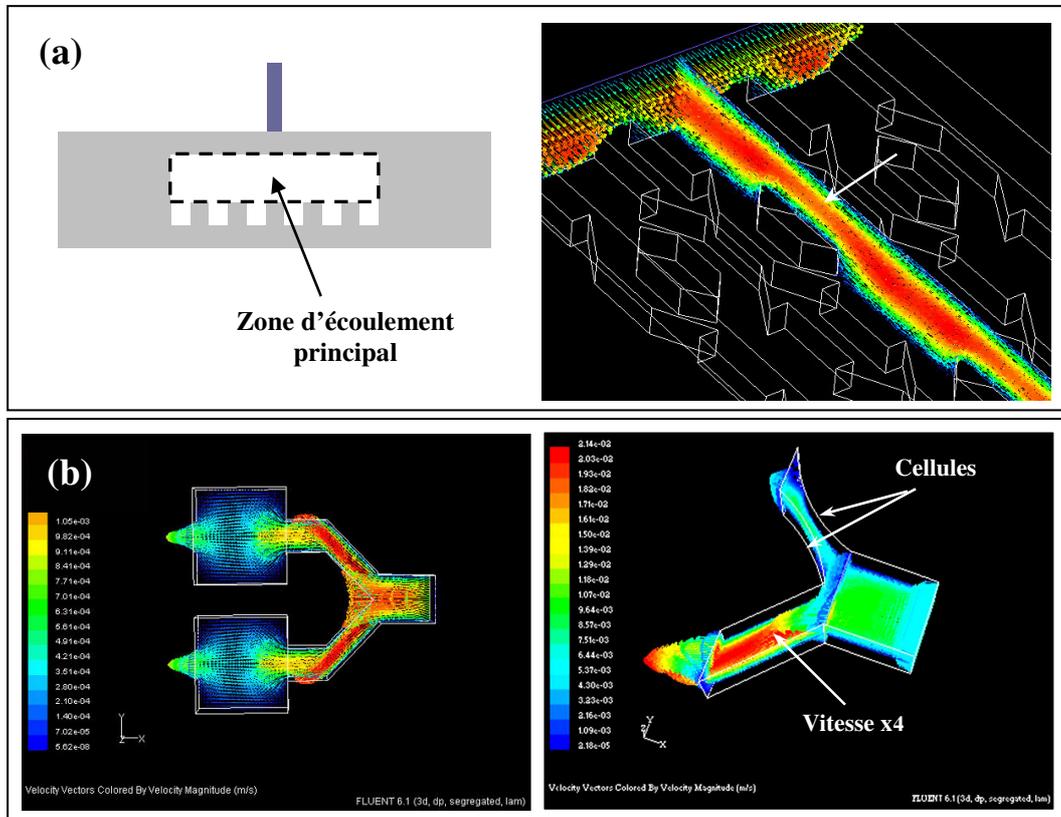


Figure 61 : Visualisation de la perfusion dans la partie supérieure de la biopuce (a) et modifications de l'écoulement dans deux canaux adjacents lors d'un encombrement de cellules dans un microcanal (b)²⁰⁹.

3. Choix des cellules

Le choix des cellules utilisées pour cette étude s'est fait en deux temps. Dans un premier temps, nous avons souhaité travailler sur des cellules provenant d'organes qui jouent un rôle important dans les phases d'A.D.M.E. Le foie est l'organe de la biotransformation avec un système enzymatique très développé et également un organe qui participe à l'élimination des substances grâce aux sécrétions biliaires. Le rein, est l'organe de l'élimination. Il présente un système de filtration hautement perfectionné et permet de conserver l'homéostasie de l'organisme. Le complexe enzymatique présent dans cet organe participe également à la biotransformation en métabolites de substances exogènes et endogènes. De part leurs systèmes vasculaires très riches, ces deux organes sont très irrigués et sont donc en contact avec une grande quantité de substances circulantes. La recirculation entéro-hépatique et l'absorption parentérale déversent en effet dans le foie de grandes quantités (parfois la totalité) de substances exogènes. Après biotransformation, le foie est également au contact de fortes concentrations de métabolites avant leur élimination. Le rein, lui aussi reçoit de grandes quantités de substances qu'il concentre en urine dans le tubule. Le tubule est alors soumis à de fortes concentrations de substances ou métabolites.

D'après la littérature, la culture de cellules primaires est un modèle incontournable dans la mise en place de nouveaux systèmes de culture *in vitro*. Il nous est apparu nécessaire de développer dans un premier temps un modèle rapide à mettre en place. Notre choix s'est donc tourné vers un système cellulaire facile d'entretien comme le proposent les lignées cellulaires. Ces cellules sont en effet robustes et relativement stables ce qui nous a permis de mettre en place des dosages tels que les consommations de glucose et glutamine, les productions d'ammoniac et albumine ainsi que le suivi de l'activité des CYP 1A2. Afin de limiter les complexités de manipulation d'entretien des lignées et de préparation des biopuces, nous avons également choisi de travailler avec deux lignées cellulaires largement utilisées dans la littérature et acceptant le même milieu de culture. Ce travail est donc réalisé avec des cellules HepG2/C3A et MDCK provenant de l'ATCC. Il nous semble cependant impératif de passer en culture de cellules primaires dans une prochaine étape afin de se rapprocher au mieux des conditions *in vivo*. Ceci est par exemple motivé par la démonstration récente de l'absence du cycle de l'urée chez les C3A qui produisent un niveau basal d'urée mais ne détoxifient pas l'ammoniac²²⁶. La caractérisation d'un modèle de biopuce à cellules primaires hépatiques est actuellement en cours de validation sur des cellules cryopréservées de rats. Ce travail donne lieu à un partenariat avec l'industrie pharmaceutique Servier Technologie.

4. Caractérisation de l'évaporation en biopuce

En fin d'expérience, il est remarqué une perte du volume de perfusion de l'ordre de 300 à 400 $\mu\text{L}/24\text{h}$. L'évaporation est un phénomène bien connu dans la littérature, surtout en biopuces microfluidiques dans lesquelles de petits volumes sont manipulés^{156,180}. Ce volume d'évaporation a été déterminé par comparaison des volumes en début et fin d'expérience et également par les différences de concentration de glucose dans le milieu lorsque celui-ci est perfusé dans les mêmes conditions expérimentales sans cellules. En l'absence de cellules, il n'y a pas de consommation de glucose et par conséquent, la quantité reste inchangée dans le circuit. Il apparaît pourtant une concentration supérieure après plusieurs jours de perfusion, démontrant une perte de fluide. Cette perte a été calculée de la manière suivante :

$$\text{[eq 9]} \quad n\text{Glucose}_{0\text{h}} = n\text{Glucose}_{24\text{h}}$$

$$\text{[eq 10]} \quad [\text{Glucose}]_{0\text{h}} \cdot V_{0\text{h}} = [\text{Glucose}]_{24\text{h}} \cdot V_{24\text{h}}$$

$$\text{[eq 11]} \quad V_{24\text{h}} = [\text{Glucose}]_{0\text{h}} \cdot V_{0\text{h}} / [\text{Glucose}]_{24\text{h}}$$

$n\text{Glucose}_{0\text{h}}$ et $n\text{Glucose}_{24\text{h}}$ sont les quantités de glucose présentes dans le circuit à 0 et 24 h. $[\text{Glucose}]_{0\text{h}}$ et $[\text{Glucose}]_{24\text{h}}$ sont les concentrations de glucose mesurées à 0 et 24 h. Les valeurs sont de 870 et 1020 $\mu\text{g}/\text{dL}$. $V_{0\text{h}}$ et $V_{24\text{h}}$ sont les volumes à 0 et 24 h. $V_{0\text{h}}$ est de 3 mL au départ de la perfusion.

Après calcul, le volume $V_{24\text{h}}$ est de 2,6 mL, soit une perte de 400 $\mu\text{L}/24\text{h}$.

De la même manière, le volume $V_{72\text{h}}$ est déterminé.

$$\text{[eq 12]} \quad V_{72\text{h}} = [\text{Glucose}]_{24\text{h}} \cdot V_{24\text{h}} / [\text{Glucose}]_{72\text{h}}$$

Après prélèvement de 300 μL à 24 h pour dosage, le volume $V_{24\text{h}}$ est de 2,3 mL. $[\text{Glucose}]_{72\text{h}}$ est la concentration de glucose mesurée en fin d'expérience. Sa valeur est de 1330 $\mu\text{g}/\text{dL}$.

Après calcul, le volume $V_{72\text{h}}$ est de 1,7 mL, soit une perte de 300 $\mu\text{L}/24\text{h}$.

Cette évaporation est prise en compte dans les calculs de consommations et de productions présentés dans la partie « Résultats ».

5. Caractérisation de la diffusion du NH₃ en biopuce

Le silicone est également perméable aux gaz^{180,216}. Le NH₃ présent dans le milieu de culture a alors la possibilité de s'échapper par la biopuce et le circuit de perfusion, tout deux en silicone. De la même manière que pour le glucose, le calcul des quantités de chlorure d'ammonium présentes à 0, 24 et 72 h permet de déterminer la perte de NH₃ dans le système de perfusion sans cellule. Durant les 72 heures de perfusion, la perte de NH₃ au final est évaluée à 27% à 5 et 10 mM.

Les taux d'ammoniac mesurés durant les expériences avec cellules aux temps 0, 24 et 72 h indiquent une stabilité des concentrations en NH₃. Ceci est lié à l'évaporation de liquide qui se fait conjointement à la perte en NH₃ dans les systèmes perfusés. L'ammoniac qui diffuse à travers le système est compensé par l'évaporation de l'eau. La concentration interne reste alors constante.

6. Modélisation des paramètres d'ADME en biopuce

Les deux types cellulaires ici présentés sont des lignées cellulaires rénales et hépatiques. Ces deux organes jouent un rôle capital dans les phénomènes d'ADME. Le foie est un des organes clé du métabolisme et le rein permet l'élimination des déchets et métabolites. Leur comportement sous différents chargements de substances hépato-toxiques et néphro-toxiques permettra de déterminer les mécanismes liés aux effets de toxicité de l'organisme.

Le profil de chargement de la substance que nous avons choisi simule une injection réalisée dans le système de circulation générale. La charge est maximale dès les premiers instants. L'ammoniac n'étant pas détoxiqué par les C3A²²⁶ et les MDCK, la concentration reste constante dans le temps. Ceci correspond à un bolus en boîte de Pétri (figure 62a). Les cellules sont ainsi chargées de manière identique ce qui explique que les effets du chlorure d'ammonium observés en Pétri sont identiques à la biopuce. Les effets de réduction de prolifération se font à 5 et 10 mM pour les MDCK et à 10 mM pour les C3A dans les deux systèmes de culture.

D'autres profils de chargements utilisant la perfusion seront à mettre en œuvre dans la continuité de l'étude. En effet, il est possible d'utiliser des pousses seringues permettant d'augmenter progressivement la concentration d'une substance au contact des cellules (figure 62b). Ceci permettrait de simuler par exemple une administration continue intermittente. Au contraire, l'ajout de milieu de culture contrôlé après un chargement, permettrait de diminuer la concentration du produit d'intérêt et ainsi modéliser une administration par intraveineuse (figure 62c)... L'utilisation de la perfusion

permet de réaliser un grand nombre de cinétiques d'absorption et d'élimination rencontrées *in vivo*. Elle permet également de mettre en relation plusieurs biopuces. La caractérisation des biopuces à C3A et des biopuces à MDCK peut par exemple être utilisée pour reproduire *in vitro*, des phénomènes de métabolisme et d'élimination des métabolites grâce à un circuit de distribution. Dans ce cas, les métabolites de la biopuce à C3A seraient véhiculés dans la biopuce à MDCK. La biopuce à MDCK, munie d'une membrane permettrait alors de modéliser l'élimination des déchets. Facilités par un milieu de culture commun, des essais de couplages entre la biopuce à C3A et la biopuce à MDCK ont déjà été réalisés et doivent encore être développés (résultats non présentés). Les modifications physico-chimiques liées au couplage de deux biopuces ne semblent pas perturber le développement des cultures des deux types cellulaires.

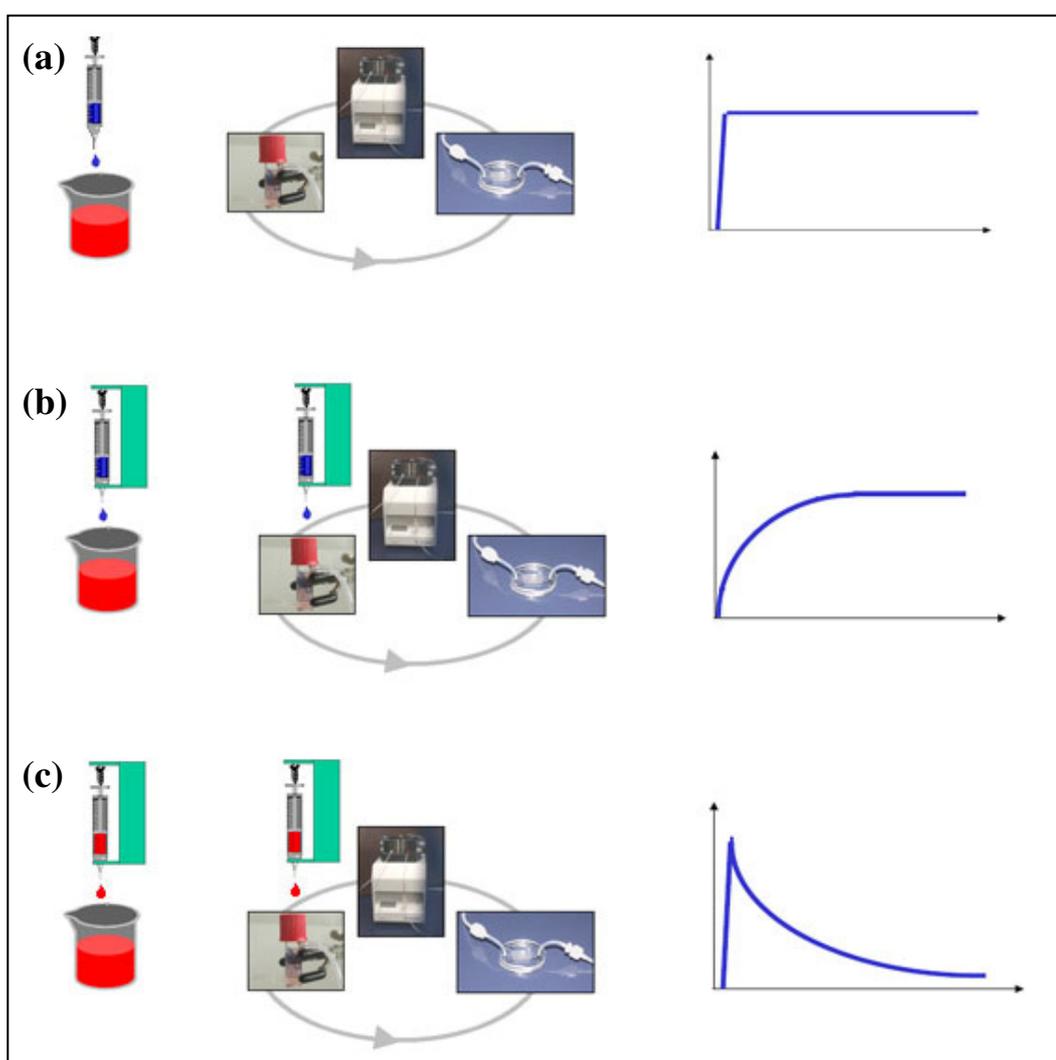


Figure 62 : Cinétiques de chargement réalisables en Pétri et biopuce perfusée.

(Représentation graphique inspirée du cours : « Bases Pharmacocinétiques de la voie IV » du Pr. Mathieu Molimard, CHU Bordeaux)

L'utilisation des lignées C3A et MDCK, facilitent la mise au point de la biopuce. Il apparaît cependant évident que l'utilisation à terme de cellules primaires est inévitable pour développer un modèle plus proche physiologiquement. Les cultures primaires sont en effet reconnues comme le meilleur modèle cellulaire en toxicologie et pharmacologie. Cependant, les difficultés d'approvisionnement et de maintien *in vitro* persistent. Certains paramètres devront être modifiés afin de réaliser cette translation vers ces modèles cellulaires. Il sera par exemple nécessaire de modifier les conditions de flux, les conditions de changement de milieu de culture ou les conditions d'adhésion cellulaire ...

7. Adhésion cellulaire en biopuce

Le PDMS étant hydrophobe ($\theta = 110^\circ$)²²⁷, il est nécessaire de réaliser un traitement de surface afin de faciliter l'adhésion des cellules ($\theta = 60-90^\circ$). Ceci est par exemple montré par les tests d'adhésion réalisés sur le PDMS. Le plasma à oxygène est un moyen d'oxyder la surface du PDMS, mais son effet n'est effectif que quelques heures et la surface redevient hydrophobe^{227,228}. De plus, cette technique est difficile à mettre en place dans des conditions stériles et la chambre microstructurée n'est pas accessible une fois refermée par le bonding irréversible. Le procédé le plus couramment utilisé en ingénierie tissulaire est le dépôt de matrice extracellulaire. Cette technique est simple et permet de déposer une protéine sur une surface en condition stérile après quelques minutes d'incubation. Les protéines les plus utilisées dans la littérature sont la laminine, les collagènes de type I et IV et la fibronectine. La fibronectine, majoritairement présente dans l'espace de disse²²⁹, favorise la différenciation des hépatocytes *in vitro* avec le maintien de certaines fonctions spécifiques telles que les CYP 2D6²³⁰, les synthèses d'albumine et d'alpha-féto-protéine²²⁹. Les MDCK déposent une matrice extracellulaire riche en laminine β et γ et fibronectine durant la tubulogénèse²³¹.

Les C3A possèdent à leur surface des intégrines $\beta_1\alpha_3$, $\beta_1\alpha_4$ et $\beta_1\alpha_5$ ²³² et les MDCK présentent les intégrines $\beta_1\alpha_3$, $\beta_3\alpha_v$ ²³³ se liant avec la fibronectine. L'absorption de la fibronectine sur différentes surfaces a fait l'objet d'une étude présentée dans la littérature récemment²³⁴. Le PDMS présente à sa surface des groupements chimiques OH et CH₃. A 10 $\mu\text{g/mL}$, il apparaît que la fibronectine s'adsorbe à 40 ng/cm^2 sur les groupements OH. A cette densité, la conformation de la protéine est telle que l'intégrine α_5 se couple sur la fibronectine de manière optimum et permet une fraction d'adhésion cellulaire supérieure à 0,30. Sur le groupement CH₃, la fibronectine s'adsorbe à 150 ng/cm^2 . Ceci conduit à une fraction d'adhésion cellulaire de 0,15 (figure 63). Ainsi, la fibronectine est reconnue comme capable de s'adsorber sur le PDMS en conservant une conformation protéique favorable à

l'adhésion cellulaire. Cette étude d'adhésion est réalisée avec des cellules préostéoblastiques de souris, les MC3T3.

Pour notre étude, nous avons confirmé cette adhésion sur nos types cellulaires et dans nos conditions de culture. Ceci est présenté avec les tests de cultures réalisés en puits sur le PDMS+FN. Ce traitement de surface nous permet ainsi de faire rapidement adhérer les cellules C3A et MDCK afin de préparer les biopuces à l'expérimentation.

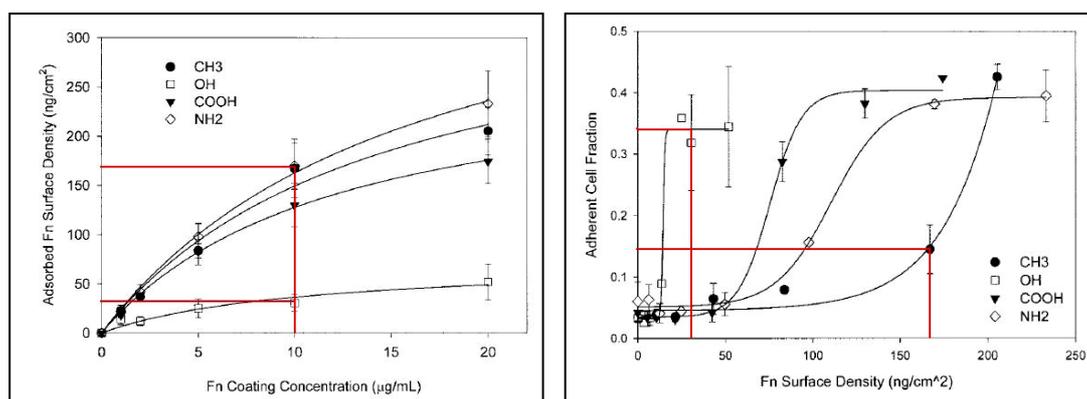


Figure 63 : Représentation graphique de l'adsorption de fibronectine (Fn) sur divers surfaces et de l'adhésion cellulaire (MC3T3-E1) sur la fibronectine adsorbée.

Ces résultats sont applicables au PDMS qui présente des groupements CH3 et OH (après oxydation au plasma à oxygène) à sa surface.

8. Ensemencement des cellules en biopuce

L'ensemencement des cellules se fait à l'aide de deux seringues de 1 mL de part et d'autre de la biopuce. Les cellules sont perfusées à l'intérieur de la chambre. La biopuce est laissée au repos durant une nuit afin de permettre aux cellules d'adhérer sur la surface microstructurée. Une légère pression permet d'évacuer ou de prévenir les éventuelles bulles d'air, fatales pour la culture. D'après le tableau 1, la quantité de cellulesensemencée est directement contrôlée par la concentration cellulaire préparée avant la perfusion des cellules dans la chambre. Cette manipulation n'est cependant pas optimal en comparaison du contrôle de la densité réalisable en boîtes de Pétri car à 5.10^6 cellules/mL, la quantité de cellulesensemencée est de $0,5 \pm 0,1.10^6$ cellules/biopuce.

Cette variation importante vient du fait que la biopuce est réalisée avec un matériau souple et déformable. La pression appliquée à l'ensemencement déforme plus ou moins la chambre en hauteur et permet d'introduire plus ou moins de cellules. L'épaisseur des répliques de PDMS joue un rôle important en ce début d'expérience. Plus fines sont les répliques et plus la chambre se déforme sous l'effet de la pression exercée. Pour éviter une trop grande déformation, nous avons choisi d'épaissir les répliques à 2 mm environ, ce qui rigidifie l'ensemble. Ce processus d'épaississement a permis d'arriver à la moyenne d'ensemencement de $0,5 \pm 0,1.10^6$ cellules/biopuce alors qu'auparavant, la

quantité de cellules inoculées passait du simple au double. Cependant, le fait de rigidifier la biopuce par ce procédé comporte quelques inconvénients. Tout d'abord, il est constaté que le chemin optique pour traverser la réplique est plus important avec l'augmentation de l'épaisseur. La visualisation au microscope est plus difficile et les photos des cellules en biopuce sont parfois de moins bonnes qualités. De plus, la faible déformation de la biopuce entraîne des pressions sur le bonding et limite sa durée de vie.

9. Effet de la densité cellulaire d'ensemencement

Avec les C3A, les densités d'ensemencement sont proches. Les quantités de cellules récupérées après 72 heures de culture sont également proches. Ceci induit une légère différence en terme de proliférations et consommations cellulaires qui s'illustre par des différences significatives entre les deux densités extrêmes.

Le nombre de C3A récoltés après 72 heures de culture en biopuce dynamique est de $1,2 \pm 0,2 \cdot 10^6$ cellules. Ceci correspond à $0,6 \cdot 10^6$ cellules/cm². La densité cellulaire en biopuce est 1,5 fois plus élevée au regard des $0,4 \cdot 10^6$ cellules/cm² observées en boîte de culture de 75 cm². La densité volumique est également supérieure en biopuce. Considérant un volume de chambre de 30 µL, la densité volumique à 72 heures est de $4 \cdot 10^7$ cellules/cm³. Cette densité est 16 fois plus élevée que la densité cellulaire en boîte de Pétri si un volume de 2 mL est considéré. *In vivo*, la densité cellulaire hépatique est de $3 \cdot 10^8$ cellules/cm³. La biopuce permet alors de se rapprocher des conditions physiologiques du tissu.

L'augmentation de la densité cellulaire en biopuce peut être expliquée par des conditions de cultures qui favorisent la réorganisation 3D du tissu. Les microstructures sont reconnues pour favoriser la formation d'agrégats²³⁵. Dans la biopuce, des cellules sous forme d'amas sont en effet observables le long des microstructures. La présence d'amas augmente de manière importante le nombre de cellules dans la biopuce. En boîte de Pétri par contre, aucun amas n'est observable. Les hépatocytes en amas présentent une meilleure activité et un maintien plus long des fonctions hépatiques^{211,236,237}. Ceci permet d'expliquer l'activité plus élevée des C3A, descendue dans nos biopuces au regard des cultures sur PDMS+FN. En effet, des C3A cultivés à forte densité derrière une barrière de perfusion présentent des taux de production d'albumine 3 fois supérieurs aux contrôles réalisés en boîte de Pétri après une semaine²¹¹. En biopuce à 25 µL/min et pour une densité d'ensemencement de $0,45 \cdot 10^6$ cellules/biopuce, le taux de synthèse d'albumine après 3 jours est déjà 2 fois plus élevé. Rappelons qu'après 9 jours de culture dans une biopuce similaire et grâce à une réorganisation complète de l'ensemble des cellules HepG2, le taux d'albumine sécrétée est 3 fois supérieur aux contrôles en

Pétri²¹⁰. Il apparaît donc intéressant de tester l'activité métabolique des cultures en biopuce sur plus long terme.

Avec les MDCK, les densités d'ensemencement sont relativement éloignées. Les taux de prolifération en biopuce sont équivalents d'une densité à l'autre. Cela induit que la quantité de cellules MDCK récoltée en fin d'expérience est fonction du nombre de cellulesensemencées au départ. Les taux de consommation de glucose et de production d'ammoniac sont également fonction des densités. Plus la densité est importante, moins la consommation et la production sont élevées. Cette différence est surtout observée entre les densités extrêmes ($0,5$ et 1.10^6 cellules/biopuce).

Ainsi, à la densité d'ensemencement de 1.10^6 cellules/biopuce, il est récolté après 72 heures à $10 \mu\text{L}/\text{min}$, $2,3.10^6$ MDCK. Ceci correspond à $1,1.10^6$ cellules/ cm^2 . La densité en biopuce est également 2 fois plus élevée qu'en boîte de culture standard de 75 cm^2 dans laquelle il est récolté 35.10^6 cellules correspondant alors à $0,5.10^6$ cellules/ cm^2 .

10. Phénomènes de transport et culture dynamique

L'étude présentée consiste à caractériser la biopuce pour différents débits. Les débits étudiés sont de 0, 10 et $25 \mu\text{L}/\text{min}$.

10.1 Cultures statiques

Au débit de $0 \mu\text{L}/\text{min}$, il apparaît que la prolifération cellulaire est bien moins importante en biopuce statique qu'en puits de PDMS+FN. Cette observation est également rencontrée en microcanal pour différents types cellulaires²³⁸. Cette diminution de la prolifération est en effet présente dans nos expériences avec les C3A et les MDCK.

Une première hypothèse expliquant ce développement limité des cellules pourrait être due à un manque de milieu nutritif puisqu'en condition statique, le volume utilisé n'est que de $0,5 \text{ mL}$. Cependant, au regard des valeurs de concentration mesurées après 24 et 72 heures de culture, il peut être constaté que les cellules n'ont pas consommé tout le glucose à disposition dans le milieu. Le milieu initial contient en effet $0,10 \pm 0,05 \text{ g/L}$ de glucose. La concentration de celui-ci après 24 heures de culture statique est à $0,63 \pm 0,09$ et $0,37 \pm 0,14 \text{ g/L}$ après 72 heures de culture pour les C3A. La diminution de la prolifération n'est donc pas liée à un manque nutritionnel.

Le premier paramètre pouvant jouer sur cette différence de prolifération entre biopuce statique et boîte de Pétri est proposé dans la littérature par la dominance de la diffusion sur la convection en microcanaux. Ainsi, dans un environnement confiné, les sécrétions cellulaires sont uniquement

transportées par diffusion. Ceci implique la formation de gradients et la rétention des molécules proche de la cellule excrétrice. Dans les grands volumes tels que peuvent être considérées les cultures standards, les produits de dégradations cellulaires sont dilués et les hormones de croissances sécrétées sont dispersées sur l'ensemble des cellules²³⁸.

Le deuxième paramètre pouvant également influencer une réduction de prolifération pourrait être la pression. En effet, si l'on compare les conditions de culture en Pétri et les conditions de culture en biopuce statique, il apparaît une différence de pression non négligeable. Les biopuces sont légèrement conditionnées sous pression afin d'éviter d'éventuelles bulles d'air. La culture de cellule est donc soumise à une pression statique durant les 72 heures de cultures. Cette pression est supérieure à la pression atmosphérique puisque la biopuce se déforme légèrement. Certains types cellulaires sont naturellement soumis à des pressions dans l'organisme. Par exemple, les chondrocytes présents dans le cartilage dérivent lorsqu'ils ne sont pas stimulés mécaniquement. Cependant il est décrit dans la littérature qu'une pression hydrostatique appliquée pendant plusieurs heures altère l'activité chondrocytaire préférant alors une stimulation dynamique. Dans notre cas, la prolifération des C3A en biopuces statiques est stoppée au regard de la prolifération en boîte de Pétri. De plus, il est apparu durant des essais de culture sur plus long terme (résultats non présentés) que les cultures cellulaires à 0 $\mu\text{L}/\text{min}$ sont difficiles à maintenir au-delà de 7 jours. Ceci peut être corrélé avec un taux de LDH plus important dans ces biopuces dès les premières 72 heures traduisant d'une souffrance cellulaire.

Ainsi, il semble que la condition de biopuce statique ne corresponde pas à la condition de culture standard en Pétri.

10.2 Cultures dynamiques

La perfusion est réalisée à l'aide d'une pompe péristaltique. Des galets viennent écraser par intermittence un tuyau intégré dans le circuit de perfusion. L'incorporation d'une trappe à bulle juste avant la biopuce permet de limiter l'oscillation et réduit le phénomène d'aller-retour des fluides dans la biopuce. L'air emmagasiné en haut de la trappe à bulle sert en effet d'amortisseur. Le fluide est ainsi propulsé en continue dans la biopuce. Même si la vitesse est oscillante durant un cycle complet du rouleau de propulsion, le fluide ne revient pas en arrière grâce à la contre pression de la trappe à bulle.

Au regard des conditions à 0 $\mu\text{L}/\text{min}$, les débits de 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ sont bénéfiques pour les cultures cellulaires étudiées. Les proliférations des C3A et MDCK à ces deux débits sont en effet supérieures aux cultures réalisées en biopuces statiques. La comparaison des biopuces à C3A avec les cultures standards réalisées sur PDMS+FN montre que la prolifération et le taux de LDH des C3A sont comparables. Ceci va dans le sens de l'hypothèse précédente : la perfusion permet de faire circuler par convection les facteurs de croissance sécrétés et évacue dans le même temps les déchets cellulaires. La pression exercée sur les cellules est alors dynamique grâce au péristaltisme de la pompe.

L'effet de la culture en biopuce stimule l'ensemble de l'activité cellulaire au regard des résultats mesurés sur PDMS+FN. Ainsi, à la densité initiale de $0,24 \cdot 10^6$ cellules/cm², la consommation de glucose est doublée, la consommation de glutamine est triplée. Les productions d'ammoniac et d'albumine sont multipliées par un facteur de 1,2 et 1,7 respectivement. De plus, l'activité des CYP 1A2 est présente en biopuce alors qu'il n'est pas possible de la détecter en Pétri standard.

Les hépatocytes sont face à l'espace de disse dans le foie et sont indirectement soumis aux forces mécaniques exercées par le flux sanguin. Une stimulation mécanique modérée est reconnue comme étant bénéfique pour le maintien fonctionnel et structurel du tissu²³⁹. L'augmentation importante du flux engendrée lors d'une opération chirurgicale pour une hépatectomie partielle par exemple, affecte généralement les fonctions métaboliques de ces cellules²⁴⁰. Ceci est montré *in vitro* avec la réduction de production d'albumine et d'urée en bioréacteur plan pour des cisaillements supérieurs à 0,5 Pa¹⁵⁷. Le cisaillement au sein de la biopuce est estimé par simulations numériques entre 0,002 et 0,006 Pa (données non présentées) ce qui est largement inférieur²⁰³. A cette valeur faible de cisaillement, l'ensemble du métabolisme des C3A est plus important qu'en boîte de Pétri. Ceci indique qu'une gamme de valeurs de cisaillements a un effet bénéfique sur la culture des C3A.

Au niveau du tubule rénal, les cisaillements estimés sont compris entre 0,003 et 0,04 Pa. Les cisaillements induits dans la biopuce sont donc proches des contraintes physiologiques. Il est cependant constaté un effet lié au flux dans la biopuce avec une prolifération des MDCK à 10 μ L/min plus élevée que celle à 25 μ L/min. Une grande partie de la réabsorption est réalisée dans le tubule proximal. Ce phénomène s'accompagne d'une diminution de la vitesse et du cisaillement dans le tubule distal. Aussi, les cellules MDCK exposées à des cisaillements compris entre 0,002 et 0,02 Pa ont déjà montré une désorganisation du cytosquelette conduisant à un détachement précoce¹⁵⁸. Cette incapacité à s'adapter aux cisaillements supérieurs à 0,002 Pa explique la faible prolifération dans la biopuce sous un débit de 25 μ L/min.

A ce débit, il est remarqué que la consommation de glucose et la synthèse d'ammoniac sont plus élevées. Les MDCK sont pourvus de mécanorécepteurs, les cils primaires, dont le rôle est de transmettre des signaux intracellulaires concernant le flux exercé sur le pôle apical²⁴¹. La stimulation engendrée par le flux induit un flot de Ca²⁺ dans le cytoplasme et un relargage de nucléotides comme l'ATP (Adénosine triphosphate) par exemple qui est formé par la dégradation du glucose en pyruvate (glycolyse)^{241,242}. En conséquence, le flux augmente la consommation de glucose des MDCK. Ceci est vérifié dans notre étude avec une hausse de la consommation de glucose détectée suivant l'augmentation du débit en biopuce.

11. Apport d'oxygène dans la biopuce

L'apport d'oxygène dans la biopuce se fait par la perfusion du milieu de culture et la diffusion de l'oxygène à travers le PDMS.

L'apport de l'oxygène par la perfusion permet de cultiver un nombre de cellules estimable par l'équation suivante²⁰⁵ :

$$[\text{Eq 13}] \quad N_{\text{cells}} = (Q \cdot \Delta C) / X_{\text{cell}}$$

Q représente le débit. Il est dans notre cas de 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$. Pour une consommation maximale entre l'entrée et la sortie de la biopuce, le gradient ΔC passe de $2,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol O}_2/\text{cm}^3$ à 0. X_{cell} représente la consommation en O_2 d'une cellule. La consommation des C3A est estimée à $1 \cdot 10^{-16} \text{ mol O}_2/\text{s}^{243}$. La consommation des MDCK est de $2 \cdot 10^{-16} \text{ mol O}_2/\text{s}$. L'application numérique nous permet alors d'estimer que la perfusion aux débits de 10 et 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ apporte de l'oxygène pour cultiver entre 340 000 et 850 000 C3A. La consommation des MDCK étant deux fois plus importante que pour les C3A, il est délivré de l'oxygène pour 170 000 à 425 000 cellules MDCK.

La diffusion de l'oxygène dans le PDMS est calculée par l'équation :

$$[\text{Eq 14}] \quad F_{\text{max}} \sim D_{\text{PDMS}} (\Delta C / \Delta z)$$

D_{PDMS} est la perméabilité du PDMS à l'oxygène. Sa valeur est de $4,1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}^{180}$. ΔC représente le gradient de concentration d'oxygène dans le PDMS. Le gradient maximum est de $2,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol O}_2/\text{cm}^3$. Δz représente l'épaisseur de PDMS parcourue par l'oxygène avant d'atteindre l'intérieur de la microchambre. L'épaisseur des 2 répliques qui constituent la biopuce est de 0,2 cm. La valeur de F_{max} est alors de $41 \cdot 10^{-12} \text{ mol O}_2/\text{s}/\text{cm}^2$. Avec deux surfaces projetées sur 1,2 cm^2 , la biopuce en PDMS délivre aux cellules $98 \cdot 10^{-12} \text{ mol O}_2/\text{s}$. Ceci permet d'alimenter en oxygène 980 000 C3A ou 490 000 MDCK.

Par cumul des deux apports d'oxygène, il est estimé que $1,3 \cdot 10^6$ C3A et $0,66 \cdot 10^6$ MDCK ont suffisamment d'oxygène à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ et que $1,83 \cdot 10^6$ C3A et $0,92 \cdot 10^6$ MDCK sont correctement oxygénés à 25 $\mu\text{L}/\text{min}$. L'apport en oxygène semble donc suffisant pour les C3A qui en 72 heures sont de $1,2 \pm 0,2 \cdot 10^6$. Par contre, le nombre de MDCK comptés après 72 heures à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ est de $2,3 \pm 0,4 \cdot 10^6$ cellules. Cette situation risque de provoquer un état d'hypoxie des cultures cellulaires se traduisant par des dysfonctionnements métaboliques ou une mort cellulaire²⁴⁴. Afin de subvenir aux besoins cellulaires, il est possible d'augmenter le débit. Cependant, l'accélération du fluide engendrée

dans la biopuce risque de réduire l'activité cellulaire et la prolifération. L'autre paramètre permettant d'apporter une plus grande quantité d'oxygène sans modifier le flux, est alors de réduire l'épaisseur des répliques de PDMS afin de faciliter la diffusion de l'O₂ à travers la paroi comme avec une membrane. La réduction de l'épaisseur peut alors engendrer une déformation de la biopuce plus importante et modifier le contrôle de l'ensemencement cellulaire comme cela a été dit précédemment. Il est alors nécessaire de trouver un compromis entre rigidité du système et diffusion de l'oxygène.

D'après notre estimation, l'oxygène disponible permet de cultiver dans de bonnes conditions environs 660 000 cellules MDCK à 10 µL/min. Ceci ne devrait pas nous permettre en théorie d'ensemencer les cellules au delà de cette valeur. Or, les cultures réalisées avec des ensemencements à 0,75 et 1.10⁶ cellules/biopuce ont proliféré avec des taux de 2,3 ± 0,1. Il est reconnu dans la littérature que les cellules présentent un taux d'absorption de l'oxygène inférieur lorsqu'elles sont cultivées à forte densité²⁴⁴. Ceci se traduit par une diminution progressive du taux d'absorption²⁴⁴. De plus, la quantification du taux d'absorption de l'oxygène par les cellules est réalisée en système de culture hermétique²⁴⁴. L'oxygénation des cellules se fait donc uniquement par le pôle apical. Dans la biopuce, les cellules MDCK et C3A sont oxygénées par le milieu de culture, au niveau du pôle apical, mais également par le PDMS, sur le pôle basal. Par cette configuration, les mécanismes d'absorption cellulaire de l'O₂ sont peut être modifiés. Le taux de consommation cellulaire en oxygène pourrait être abaissé nous permettant alors de cultiver des cellules à plus forte densité.

12. Effet du NH₄Cl

Les productions de déchets par le métabolisme cellulaire sont toxiques et inhibiteurs de la prolifération. L'ammoniac, issu du métabolisme des acides aminés et en particulier de la glutamine limite de manière importante la prolifération cellulaire. L'effet dépend des conditions de culture et du type cellulaire²²⁰. Nous avons en effet constaté que l'effet du chlorure d'ammonium est différent selon que la culture est réalisée avec des C3A ou des MDCK. A 5mM par exemple, la prolifération cellulaire est diminuée avec les cellules MDCK tandis que les C3A prolifèrent normalement. Par contre, en présence de 10mM de chlorure d'ammonium, la prolifération des deux types cellulaires est fortement atteinte.

Une forte concentration d'ammoniac dans le milieu de culture perturbe les processus de synthèse et d'excrétion des protéines. A pH 7,1-7,5, environ 1% de l'ammoniac est sous forme NH₃. Non chargé et lipophile, la diffusion du NH₃ à travers la membrane est rapide et se fait suivant les gradients de concentrations. Son entrée dans le cytoplasme de la cellule accroît le pH de manière importante ce qui perturbe le fonctionnement des organelles. Afin de rétablir le pH, les ions NH₄⁺ sont transportés dans le cytoplasme par des transporteurs actifs (Na⁺K⁺ ATPase), consommateurs

d'énergie. De plus, les ions NH_4^+ sont en compétition avec les ions H^+ . Ceci perturbe le transport membranaire et la demande en énergie s'accroît pour maintenir les gradients K^+ .

La présence de chlorure d'ammonium perturbe ainsi les transports à travers la membrane et augmente la consommation d'énergie pour le maintien de l'équilibre intracellulaire²²⁰. Ceci est confirmé par la forte augmentation des consommations de glucose et de glutamine dans les biopuces dynamiques à C3A en présence de chlorure d'ammonium. L'augmentation de la consommation de glucose est également décelée avec les MDCK en biopuce à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

13. Synthèses d'albumine et d'ammoniac

La synthèse d'albumine est généralement étudiée pour quantifier l'activité de synthèse des hépatocytes. Certaines études montrent un taux moyen de sécrétion d'albumine de 1,5 $\mu\text{g}/10^6$ cellules/24h durant 20 jours²¹⁸. Il peut être remarqué que la stabilisation du taux de synthèse des C3A ne se fait qu'après 96 heures de culture (figure 64). Cette synthèse oscillante est également remarquée dans nos biopuces durant les 72 heures de culture. Le taux de synthèse des C3A en biopuce est compris entre 1,9 et 4,5 $\mu\text{g}/10^6$ cellules/24h. Ceci est comparable à la synthèse des C3A en éponge d'alginate précédemment citée et supérieur au taux déterminé en micro-puits perforés qui est de 0,06 $\mu\text{g}/10^6$ cellules/24h²¹¹. Par contre, cette production est largement inférieure à la production d'hépatocytes primaires qui est comprise entre 72 et 144 $\mu\text{g}/10^6$ cellules/24h²⁴⁵.

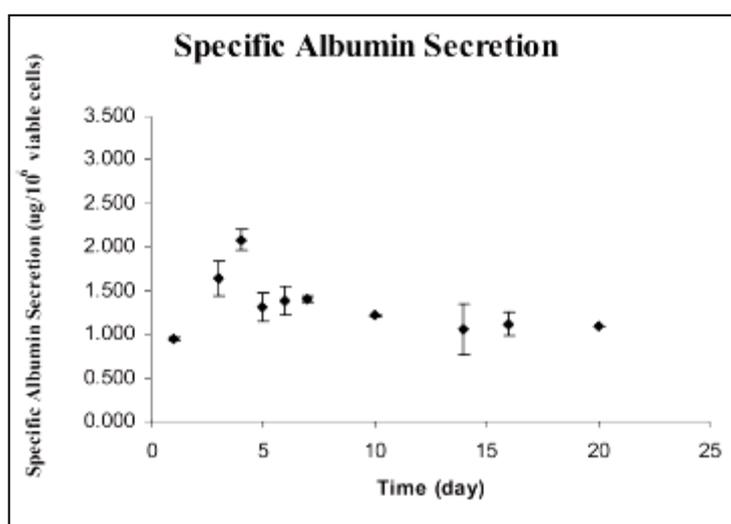


Figure 64 : Sécrétion d'albumine par des C3A cultivés en éponges d'alginate

La synthèse d'ammoniac par les cellules est issue de la dégradation des acides aminés et notamment de la dégradation de la glutamine. La glutamine est dégradée en ammoniac et glutamate par l'enzyme glutaminase. Il est alors intéressant de comparer la consommation de glutamine avec la synthèse d'ammoniac dans nos biopuces. Cette étude a été réalisée avec les C3A. A 0 $\mu\text{L}/\text{min}$, la consommation de glutamine est de $20 \pm 7 \text{ nmol}/10^6 \text{ cellules}/\text{h}$. La synthèse d'ammoniac est de $14 \pm 2 \text{ nmol}/10^6 \text{ cellules}/\text{h}$. En dynamique, la consommation de glutamine est de $60 \pm 8 \text{ nmol}/10^6 \text{ cellules}/\text{h}$. La production d'ammoniac par contre est seulement de $44 \pm 7 \text{ nmol}/10^6 \text{ cellules}/\text{h}$. Il peut être remarqué que la production d'ammoniac est de 30% plus faible que la consommation de glutamine. Cette production faible d'ammoniac en biopuce dynamique peut être expliquée par la perte d'ammoniac observée durant la perfusion sans cellule comme cela a été discuté précédemment. Pour rappel, la perte d'ammoniac en biopuces perfusées est estimée à 27%, ce qui correspond à la différence observée entre la production d'ammoniac et la consommation de glutamine.

En condition de chargement de NH_4Cl , la production d'ammoniac cellulaire est très faible, voir inexistante. Cependant, on peut remarquer que la consommation de glutamine est plus importante pour ces conditions de culture. La consommation de glutamine étant supérieure, il serait logique d'attendre une synthèse cellulaire d'ammoniac également supérieure. La consommation de glutamine est en effet de 100 à 150 $\text{nmol}/10^6 \text{ cellules}/\text{h}$, ce qui devrait correspondre à une production d'ammoniac de 4,8 à 7,2 $\text{nmol}/10^6 \text{ cellules}/48 \text{ heures}$. Devant les chargements de 5 et 10 mM de NH_4Cl , la production cellulaire est 1000 fois moins importante. Cette production semble donc trop faible pour être détectée par notre technique de mesure avec du NH_4Cl dans le milieu.

14. Activité du CYP 1A2

Durant la culture cellulaire *in vitro* d'hépatocytes, des changements phénotypiques apparaissent rapidement, affectant le métabolisme cellulaire et également l'activité enzymatique de phase I et II. Ces changements sont liés au proche environnement cellulaire tels que les facteurs solubles, les composants de la matrice extracellulaire, les interactions cellules-cellules et les facteurs affectant la réplication. Dans la littérature, le maintien des fonctions spécifiques *in vitro* est lié également à la forme tridimensionnelle des cellules. La culture entre deux couches de matrice extracellulaire comme le collagène et la laminine permet de conserver la forme cuboïdale des hépatocytes et de maintenir l'activité enzymatique et métabolique durant quelques jours.

Cependant, cette couche supplémentaire entre le milieu de culture et les cellules est difficilement pénétrable par les sondes fluorescentes comme l'éthoxyrésorufine ce qui complique la quantification de l'activité des CYP450. La culture en agrégats maintient également les fonctions spécifiques hépatiques. Il est alors nécessaire de contrôler la taille des amas afin d'offrir aux cellules

un apport suffisant en nutriments et en oxygène qui se fait par diffusion²⁴⁶. En boîte de culture standard, l'oxygène n'est apporté que par le milieu de culture sur la surface apicale des cellules. De part sa perméabilité à l'oxygène, le PDMS telle une membrane apporte l'O₂ au niveau de la surface basale des cellules. Dans la littérature, il est rapporté que des hépatocytes cultivés sur une membrane de PTFE perméable aux gaz (O₂ et CO₂) augmentent l'activité des CYP 1A2 d'un facteur 4²⁴⁷. Ceci permet d'expliquer l'activité supérieure décelée en biopuce statique en comparaison des cultures standards réalisées en boîte de Pétri. Le taux en biopuce statique est cependant inférieur à l'activité initiale. Cet état traduit une perte d'activité durant les 72 heures de culture. La perfusion qui apporte les nutriments et un supplément d'oxygène aux cultures n'évite pas non plus la diminution de l'activité. Cependant, les taux mesurés dans ces conditions de culture sont relativement proches du taux initial. Au flux s'ajoute la formation d'amas cellulaires le long des microstructures permettant également d'expliquer ce taux d'activité supérieur.

Les CYP 1A2 des C3A sont inductibles avec le methylchonlanthrène²²³ et le β -naphthoflavone²¹⁸. Dans notre étude, il est remarqué que l'activité des CYP 1A2 est également inductible par le chlorure d'ammonium. Les meilleurs taux d'activité sont détectés en biopuces dynamiques avec 10mM de chlorure d'ammonium. A cette concentration, la prolifération cellulaire est cependant ralentie. Par contre, en présence de 5mM de chlorure d'ammonium, la prolifération des C3A en biopuces dynamiques est importante et l'activité des CYP 1A2 est comparable à l'activité initiale. Les taux moyens à 25 μ L/min sont meilleurs au regard des taux calculés à 10 μ L/min, montrant ainsi l'importance de la perfusion pour le maintien de cette activité. A ce stade de l'étude, il ne peut être donné d'explication sur les taux observés. Il serait alors intéressant de confirmer cette induction de l'activité enzymatique par d'autres techniques comme la PCR quantitative⁶⁴, qui traduit dans le temps l'expression des ARNmessagers ou par des techniques de dosage enzymatique intracellulaire.

15. Comparaison de la biopuce avec les systèmes présentés dans la littérature

De nombreux modèles de cultures cellulaires en micro-environnement sont présentés dans la littérature. Ces études présentent la mise en place de nouvelles techniques pour contrôler et guider l'arrangement du tissu^{64,170,179,180,183,184,204,205,207,211}, déterminer la réponse cellulaire à différents chargements chimiques ou biologiques^{167,180,191-193,195,197,201} et paralléliser le nombre des tests^{193,195-197}.

Cependant, les comparaisons entre systèmes sont difficiles à effectuer du fait d'une grande disparité dans les résultats présentés. Tout d'abord, les temps de culture sont variables d'une étude à

l'autre. La faisabilité de ces techniques est démontrée sur quelques heures^{192,193}, quelques jours^{64,179,195,197} et une à deux semaines de culture^{180,184,196,204,205,207,211}. La configuration des cultures cellulaires est également différente. Les techniques mises en jeu cultivent les cellules en 2D^{192,195-197,211}, 3D^{64,179,180,184,204,205,207} ou bien préconisent une reconstruction tridimensionnelle après un ensemencement plan grâce aux microstructures.

Peu de résultats biologiques au niveau des consommations et productions cellulaires sont également présentés. Ceci dépend bien évidemment du type cellulaire étudié. Concernant le type hépatique, la persistance de l'activité cellulaire est montrée par la synthèse d'albumine^{179,204,205,211}. Sur support en PDMS, avec HepG2 ou C3A, les taux d'albumine de la littérature sont compris entre 2,5²¹¹ et 16²⁰⁵ ng/10⁶ cellules/h. Ceci est inférieur à nos valeurs de synthèse qui sont comprises entre 80 et 180 ng/10⁶ cellules/h. Par contre, certains systèmes utilisant des matrices peptidiques (Puramatrix) présentent des résultats à 1600 ng/10⁶ cellules/h.

Les consommations énergétiques cellulaires (taux de glucose, glutamine ...) sont généralement absentes, sauf dans certaines études^{204,205}. Dans ces exemples, la consommation de glucose de cellules HepG2 est évaluée à 13 µg/10⁶ cellules/h²⁰⁵. Dans notre biopuce, avec des C3A, nous avons estimé cette consommation à 30 µg/10⁶ cellules/h.

Plusieurs études présentent l'induction des CYP450 par un ratio de l'activité d'intérêt et de l'activité contrôle^{141,248} ou par intensité de fluorescence lorsque le test est réalisé avec de la résorufine^{64,206}. L'activité est également présentée en pmol/mg protéine/min. La synthèse protéique d'une cellule étant variable dans le temps, il est alors difficile de comparer l'activité d'un système à l'autre. Nous avons par exemple montré qu'après décongélation, des cellules primaires de rats exprimaient environ quatre fois plus de protéines qu'après 48 heures de culture (résultats non présentés). Les activités EROD d'hépatocytes de rats et de HepG2 cultivés durant 4 jours sont de 15 pmol/10⁶ cellules/h²⁴⁹ et 20 pmol/10⁶ cellules/h²⁴⁸ montrant une diminution de l'activité sur le temps de culture. En biopuce, pour un débit de 25 µL/min, l'activité des CYP 1A2 est maintenue puisque le niveau moyen après 96 heures de culture est de 167 ± 88 pmol/10⁶ cellules/h quelles que soient les densités cellulaires.

Notre étude s'inscrit ici dans la mise en place d'une puce à cellules offrant aux cultures un environnement favorable à leur bon développement afin de modéliser de manière plus pertinente l'activité cellulaire *in vitro*. Différents paramètres biologiques sont caractérisés tels que les consommations de glucose et glutamine, les productions d'ammoniac et albumine ainsi que l'activité des CYP 1A2. L'étude du comportement cellulaire est réalisée sur quatre jours. Cette durée de culture nous inclut dans la fourchette de temps précédemment établie par d'autres études. Les travaux précédemment réalisés avec ce type de biopuces ont démontré la faisabilité de temps de culture plus longs compris entre 12 et 15 jours^{204,205}. A ce titre, plusieurs essais avec notre biopuce ont été réalisés

avec les C3A (21 jours) et les MDCK (7jours) montrant des résultats encourageants pour la culture à long terme (résultats non présentés). Ces études sont en cours de réalisation actuellement. L'augmentation de la surface de culture et le réarrangement 3D des cultures par les microstructures permet, comme cela a déjà été discuté, d'augmenter la densité cellulaire. Au vue de la densité cellulaire rencontrée *in vivo*, ce paramètre semble important mais pourtant très peu présenté dans la littérature. De plus, les valeurs disponibles sont de l'ordre des densités cellulaires en boîte de Pétri ($400\ 000\ \text{cellules}/\text{cm}^2$)²¹¹.

CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les techniques de microfabrication appliquées sur un polymère biocompatible comme le PDMS nous ont permis de réaliser des biopuces pour la culture de cellules. Les cultures cellulaires ont été maintenues dans de bonnes conditions d'asepsie durant 4 jours grâce à la fermeture hermétique et à la stérilisation par autoclave de la biopuce.

La préparation de la surface de la biopuce avec la fibronectine garantit une adhésion immédiate des cellules et le contrôle de la densité en biopuce.

L'intégration de la biopuce dans un circuit de perfusion muni d'une pompe à débit variable offre la possibilité de modifier les conditions de cultures.

Enfin, la détermination de concentrations particulières de NH_4Cl , modifiant les morphologies, les proliférations et le métabolisme cellulaire nous a permis de déceler des réponses biologiques.

La caractérisation de la biopuce a donc été réalisée par comparaison des réponses cellulaires aux changements des conditions de culture impliquant trois densités cellulaires, trois débits et trois chargements de NH_4Cl .

En comparant le système de culture classique et la biopuce, il est possible d'établir plusieurs homologues. Ainsi les morphologies et les proliférations cellulaires sont comparables pour les deux types cellulaires en milieu de culture standard. En présence de NH_4Cl à 10 mM, la prolifération des deux types cellulaires est ralentie de manière importante. Il peut être également remarqué que la prolifération des C3A n'est pas altérée avec un chargement à 5 mM tandis que la prolifération des MDCK est diminuée de manière importante. Ces similitudes montrent donc la faisabilité de cultiver des cellules en biopuce par rapport aux cultures en Pétri. Ceci montre également la possibilité de tester l'influence de substances chimiques ou pharmaceutiques sur le métabolisme cellulaire en biopuce.

La culture en biopuce dynamique montre également des taux de consommation et de production supérieurs à la culture en Pétri. Ceci dénote une activité métabolique plus élevée qui s'illustre par exemple par les CYP 1A2.

En effet, la détection de l'activité des CYP 1A2 en biopuce est un argument des bonnes conditions environnementales de culture, mais aussi un atout pour la réalisation de tests liés au métabolisme de détoxification de substances. De plus, le maintien *in vitro* de cette activité est primordial dans le développement de tests d'expositions chroniques, pour l'instant difficiles à mettre en œuvre. Les résultats présentés dans ce rapport montrent que l'activité des CYP450 peut être maintenue dans certaines conditions de culture en biopuce. Il est en effet remarqué que les cellules C3A conservent leur activité durant 72 heures en conditions dynamiques et que l'ajout de chlorure d'ammonium semble induire cette fonction.

De nombreux paramètres rentrent en jeu dans la mise en œuvre des conditions de culture adéquates. Ainsi, la perfusion joue un rôle primordial dans l'apport et l'élimination du milieu de culture, l'oxygénation des cellules, la convection ou la stimulation mécanique. Un autre paramètre important dans cette biopuce en PDMS est la surface microstructurée qui sert de support à la reconstruction tissulaire tout en minimisant les effets de cisaillement sur la surface de culture et diffusant de l'oxygène à la manière d'une membrane. Aussi, de nombreux paramètres sont liés les uns avec les autres et tester l'influence d'un seul paramètre à la fois paraît difficile. Cependant, il pourrait être intéressant de réaliser des cultures en chambres sans microstructures, en Pétri sur PDMS microstructuré ou en biopuces hermétiques à l'oxygène afin de hiérarchiser l'importance de ces paramètres.

Le micro-environnement créé dans la biopuce est favorable au bon développement des cultures cellulaires. Ceci est montré dans cette étude par la prolifération de deux lignées cellulaires hépatiques et rénales. Afin de faire évoluer ce modèle de biopuce vers une utilisation plus pertinente, il est maintenant préconisé de changer de type cellulaire. La culture de cellules primaires pourrait par exemple nous permettre de nous approcher des conditions physiologiques et de caractériser le métabolisme de différents organes comme le rein ou le foie. Cette évolution pourrait alors permettre de transférer notre modèle cellulaire vers l'industrie pharmaceutique. Dans ce cadre, il serait également nécessaire de faciliter la manipulation de la biopuce en intégrant dans un même ensemble les différents éléments (pompe et réservoir) à la manière d'un laboratoire sur puce.

En plus de caractériser le métabolisme de différents micro-organes, la reproduction de fonctions spécifiques en biopuce permettrait d'évoluer vers des systèmes plus complexes. L'inclusion de membranes en biopuce pourrait alors recréer des fonctions d'absorption/réabsorption et modéliser des phénomènes cellulaires difficiles à reproduire *in vitro*. Le couplage entre 2 ou plusieurs biopuces permettrait également de rétablir les interactions entre différents micro-organes comme dans le concept de « Human on chip ». La production et la distribution de métabolites pourraient ainsi être modélisées d'un compartiment à l'autre.

References

1. Devolder T, Garthoff B, Muller K, Pauwels M, Rogiers V, Spielmann H, Webb S. The impact of REACH. The report of CONAM / ecopa Chemical Policy Working Group 2007;Report 1, Brussels 2007.
2. Balls M, Goldberg AM, Fentem JH, Broadhead CL, Burch RL, Festing MF, Frazier JM, Hendriksen CF, Jennings M, van dK, Morton DB, Rowan AN, Russell C, Russell WM, Spielmann H, Stephens ML, Stokes WS, Straughan DW, Yager JD, Zurlo J, van Zutphen BF. The three Rs: the way forward: the report and recommendations of ECVAM Workshop 11. *Altern Lab Anim* 1995;23:838-866.
3. Smith DA, van de WH. Pharmacokinetics and metabolism in early drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 1999;3:373-378.
4. Pang KS. Modeling of intestinal drug absorption: roles of transporters and metabolic enzymes (for the Gillette Review Series). *Drug Metab Dispos* 2003;31:1507-1519.
5. Lin JH, Chiba M, Baillie TA. Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized? *Pharmacol Rev* 1999;51:135-158.
6. Lin JH, Lu AY. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 1997;49:403-449.
7. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower R. Rang & Dale's Pharmacology. 6th edition 2007;Section 1:844 pages.
8. Alternative routes of drug administration--advantages and disadvantages (subject review). American Academy of Pediatrics. Committee on Drugs. *Pediatrics* 1997;100:143-152.
9. Pleuvry BJ. Factors affecting drug absorption and distribution. *Anaesthesia and intensive care medicine* 2005;6:135-138.
10. Kurosaki Y, Kimura T. Regional variation in oral mucosal drug permeability. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2000;17:467-508.
11. Wertz PW, Squier CA. Cellular and molecular basis of barrier function in oral epithelium. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1991;8:237-269.
12. Barennes H, Balima-Koussoube T, Nagot N, Charpentier JC, Pussard E. Safety and efficacy of rectal compared with intramuscular quinine for the early treatment of moderately severe malaria in children: randomised clinical trial. *BMJ* 2006;332:1055-1059.
13. Jantzen JP, Diehl P. Rectal administration of drugs. Fundamentals and applications in anesthesia. *Anaesthesist* 1991;40:251-261.
14. de Boer AG, Breimer DD, Gubbens-Stibbe JM, Bosma A. First-pass elimination of salicylamide in man following oral and rectal administration. *Biopharm Drug Dispos* 1983;4:321-330.
15. de Boer AG, Moolenaar F, de Leede LG, Breimer DD. Rectal drug administration: clinical pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet* 1982;7:285-311.
16. Wadell c. Nasal drug delivery : in vitro studies on factors influencing permeability and implications on absorption. Thèse 2002;55 pages.

17. Hussain A, Ahsan F. The vagina as a route for systemic drug delivery. *J Control Release* 2005;103:301-313.
18. das NJ, Bahia MF. Gels as vaginal drug delivery systems. *Int J Pharm* 2006;318:1-14.
19. van der BP, van Eyk AD. Comparative in vitro permeability of human vaginal, small intestinal and colonic mucosa. *Int J Pharm* 2003;261:147-152.
20. Mills PC, Cross SE. Transdermal drug delivery: basic principles for the veterinarian. *Vet J* 2006;172:218-233.
21. Krause JW. Krause's essential human histology for medical students. Livre 2005;third edition:320 pages.
22. Tsukita S, Furuse M. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:531-536.
23. Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J* 1995;9:910-918.
24. Liebner S, Cavallaro U, Dejana E. The multiple languages of endothelial cell-to-cell communication. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1431-1438.
25. Mullin JM, Agostino N, Rendon-Huerta E, Thornton JJ. Keynote review: epithelial and endothelial barriers in human disease. *Drug Discov Today* 2005;10:395-408.
26. Gilcrease MZ. Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Lett* 2007;247:1-25.
27. Scully C, Bagan JV, Black M, Carrozzo M, Eisen D, Escudier M, Farthing P, Kuffer R, Lo ML, Mignogna M, Porter SR. Epithelial biology. *Oral Dis* 2005;11:58-71.
28. Shojaei AH. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *J Pharm Pharm Sci* 1998;1:15-30.
29. Tronde Ann. Pulmonary drug absorption : in vitro investigations of drug absorption across the lung barrier and its relation to drug physicochemical properties. Thèse 2002;86 pages.
30. Ehrhardt C, Fiegel J, Fuchs S, bu-Dahab R, Schaefer UF, Hanes J, Lehr CM. Drug absorption by the respiratory mucosa: cell culture models and particulate drug carriers. *J Aerosol Med* 2002;15:131-139.
31. Hussain A, Arnold JJ, Khan MA, Ahsan F. Absorption enhancers in pulmonary protein delivery. *J Control Release* 2004;94:15-24.
32. Bishop AE. Pulmonary epithelial stem cells. *Cell Prolif* 2004;37:89-96.
33. Ismail AS, Hooper LV. Epithelial cells and their neighbors. IV. Bacterial contributions to intestinal epithelial barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G779-G784.
34. Powell DW. Barrier function of epithelia. *Am J Physiol* 1981;241:G275-G288.
35. Tuma PL, Hubbard AL. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev* 2003;83:871-932.

36. Morris ME, Lee HJ, Predko LM. Gender differences in the membrane transport of endogenous and exogenous compounds. *Pharmacol Rev* 2003;55:229-240.
37. Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 2003;55:425-461.
38. Jones RT. The pharmacology of cocaine smoking in humans. *NIDA Res Monogr* 1990;99:30-41.
39. Fournier T, Medjoubi N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:157-171.
40. Henry OF, Blacher J, Verdavaine J, Duviquet M, Safar ME. Alpha 1-acid glycoprotein is an independent predictor of in-hospital death in the elderly. *Age Ageing* 2003;32:37-42.
41. Gueguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JM, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M. Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance. *Ann Biol Clin* 2006;64:535-548.
42. Levesque E, Hum DW, Belanger A. Rôle des UDP-glucuronosyltransférases (UGT) dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes. *Médecine/sciences* 2001;17:33-43.
43. Lakehal F, Wendum D, Barbu V, Becquemont L, Poupon R, Balladur P, Hannoun L, Ballet F, Beaune PH, Housset C. Phase I and phase II drug-metabolizing enzymes are expressed and heterogeneously distributed in the biliary epithelium. *Hepatology* 1999;30:1498-1506.
44. Hukkanen J. Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in human lung. Thèse 2001;69 pages.
45. LeCluyse EL. Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur J Pharm Sci* 2001;13:343-368.
46. Catania VA, Sanchez Pozzi EJ, Luquita MG, Ruiz ML, Villanueva SS, Jones B, Mottino AD. Co-regulation of expression of phase II metabolizing enzymes and multidrug resistance-associated protein 2. *Ann Hepatol* 2004;3:11-17.
47. O'Brien PJ, Chan K, Silber PM. Human and animal hepatocytes in vitro with extrapolation in vivo. *Chem Biol Interact* 2004;150:97-114.
48. Radomska-Pandya A, Czernik PJ, Little JM, Battaglia E, Mackenzie PI. Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev* 1999;31:817-899.
49. Shipkova M, Wieland E. Glucuronidation in therapeutic drug monitoring. *Clin Chim Acta* 2005 Aug ;358 (1-2):2-23 2005;358:2-23.
50. van Bladeren PJ. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem Biol Interact* 2000;129:61-76.
51. Habdous M, Siest G, Herbert B, Vincent-viry M, Visvikis S. Polymorphismes des glutathio S-transférases et pathologies humaines : bilan des études épidémiologiques. *Ann Biol Clin* 2004;62:15-24.

52. Hewitt NJ, de KR, LeCluyse E. Induction of drug metabolizing enzymes: a survey of *in vitro* methodologies and interpretations used in the pharmaceutical industry--do they comply with FDA recommendations? *Chem Biol Interact* 2007;168:51-65.
53. Donato MT, Castell JV, Gomez-Lechon MJ. Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models. *J Hepatol* 1999;31:542-549.
54. Taavitsainen P. Cytochrome P450 isoform-specific *in vitro* methods to predict drug metabolism and interactions. Thèse 2001;67 pages.
55. Huang MT, Chang RL, Fortner JG, Conney AH. Studies on the mechanism of activation of microsomal Benzo[a]pyrene hydroxylation by Flavonoids. *The Journal of Biological Chemistry* 1981;256:6829-6836.
56. Turpeinen M. Cytochrome P450 enzymes - *in vitro*, *in vivo*, and *in silico* studies. Thèse 2006;102 pages.
57. Miners JO, McKinnon RA, Mackenzie PI. Genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases and their functional significance. *Toxicology* 2002;181-182:453-456.
58. Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:342-349.
59. Ando Y, Saka H, Asai G, Sugiura S, Shimokata K, Kamataki T. UGT1A1 genotypes and glucuronidation of SN-38, the active metabolite of irinotecan. *Ann Oncol* 1998;9:845-847.
60. Hukkanen J, Jacob P, III, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* 2005;57:79-115.
61. Sica DA. Interaction of grapefruit juice and calcium channel blockers. *Am J Hypertens* 2006;19:768-773.
62. Rouveix B. Antibiotic safety assessment. *Int J Antimicrob Agents* 2003;21:215-221.
63. Tingle MD, Helsby NA. Can *in vitro* drug metabolism studies with human tissue replace *in vivo* animal studies? *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2006;21:184-190.
64. Sivaraman A. A microfabricated 3D tissue engineering "Liver on a chip": High information content assays for *in vitro* drug metabolism studies. Thèse 2004.
65. Pineiro-Carrero VM, Pineiro EO. Liver. *Pediatrics* 2004;113:1097-1106.
66. David B. Mise en place et validation d'un modèle *in vitro* pour l'étude des propriétés mécaniques, diffusives et métaboliques d'un foie bioartificiel à lit fluidisé. Thèse 2002.
67. Kierszenbaum AL. Histologie et biologie cellulaire. Une introduction à l'anatomie pathologique. Livre 2006;638 pages.
68. Pleuvry BJ. Modes of drug elimination. *Anaesthesia and intensive care medicine* 2005;6:277-279.

69. Brochot C. Paramétrisation des modèles physiologiques toxico/pharmacocinétiques. Thèse 2004;160 pages.
70. Fearn RA, Hirst BH. Predicting oral drug absorption and hepatobiliary clearance: Human intestinal and hepatic in vitro models. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2006;21:168-178.
71. Adams MP, Holland LN, Bostwick PM. *Pharmacology for nurses: A pathophysiologic approach* 2nd Ed. Livre 2008.
72. Sherwood L. *Physiologie humaine*. Livre 2006;768 pages.
73. Ekins S, Mestres J, Testa B. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *Br J Pharmacol* 2007;152:9-20.
74. MacGregor JT, Collins JM, Sugiyama Y, Tyson CA, Dean J, Smith L, Andersen M, Curren RD, Houston JB, Kadlubar FF, Kedderis GL, Krishnan K, Li AP, Parchment RE, Thummel K, Tomaszewski JE, Ulrich R, Vickers AE, Wrighton SA. In vitro human tissue models in risk assessment: report of a consensus-building workshop. *Toxicol Sci* 2001;59:17-36.
75. Hillier C, Bunton D. Functional human tissue assays. *Drug Discov Today* 2007;12:382-388.
76. Cezar GG. Can human embryonic stem cells contribute to the discovery of safer and more effective drugs? *Curr Opin Chem Biol* 2007;11:405-409.
77. Operana TN, Nguyen N, Chen S, Beaton D, Tukey RH. Human CYP1A1GFP expression in transgenic mice serves as a biomarker for environmental toxicant exposure. *Toxicol Sci* 2007;95:98-107.
78. Gonzalez FJ, Cheung C. Humanized mouse lines and their application for prediction of human drug metabolism and toxicological risk assessment. *J Pharmacol Exp Ther* 2008 Aug 5 2008.
79. Zhang W, Purchio AF, Chen K, Wu J, Lu L, Coffee R, Contag PR, West DB. A transgenic mouse model with a luciferase reporter for studying in vivo transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene. *Drug Metab Dispos* 2003;31:1054-1064.
80. Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;189:233-246.
81. Lennernas H. Animal data: the contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:1103-1120.
82. Katsura N, Ikai I, Mitaka T, Shiotani T, Yamanokuchi S, Sugimoto S, Kanazawa A, Terajima H, Mochizuki Y, Yamaoka Y. Long-term culture of primary human hepatocytes with preservation of proliferative capacity and differentiated functions. *J Surg Res* 2002 Jul ;106 (1):115 -23 2002;106:115-123.
83. Li AP. Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chem Biol Interact* 2007;168:16-29.
84. Pichard L, Raulet E, Fabre G, Ferrini JB, Ourlin JC, Maurel P. Human hepatocyte culture. *Methods Mol Biol* 2006;320:283-293.

85. Li AP, Jurima-Romet M. Applications of primary human hepatocytes in the evaluation of pharmacokinetic drug-drug interactions: evaluation of model drugs terfenadine and rifampin. *Cell Biol Toxicol* 1997;13:365-374.
86. Chen HL, Wu HL, Fon CC, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Long-term culture of hepatocytes from human adults. *J Biomed Sci* 1998;5:435-440.
87. Ekins S, Ring BJ, Grace J, Robie-Belle DJ, Wrighton SA. Present and future in vitro approaches for drug metabolism. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000;44:313-324.
88. Lam JL, Benet LZ. Hepatic microsome studies are insufficient to characterize in vivo hepatic metabolic clearance and metabolic drug-drug interactions: studies of digoxin metabolism in primary rat hepatocytes versus microsomes. *Drug Metab Dispos* 2004;32:1311-1316.
89. de Kanter R, Monshouwer M, Meijer DK, Groothuis GM. Precision-cut organ slices as a tool to study toxicity and metabolism of xenobiotics with special reference to non-hepatic tissues. *Curr Drug Metab* 2002;3:39-59.
90. Farkas D. Development of a collagen gel sandwich hepatocyte bioreactor for detecting hepatotoxicity of drugs and chemicals. Thèse 2004;174 pages.
91. Martin H, Bournique B, Sarsat JP, Albaladejo V, Lerche-Langrand C. Cryopreserved rat liver slices: a critical evaluation of cell viability, histological integrity, and drug-metabolizing enzymes. *Cryobiology* 2000;41:135-144.
92. de G, I, Draaisma AL, Schoeman O, Fahy GM, Groothuis GM, Koster HJ. Cryopreservation of rat precision-cut liver and kidney slices by rapid freezing and vitrification. *Cryobiology* 2007 Feb ;54 (1):1-12 Epub 2006 Dec 12 2007;54:1-12.
93. de G, I, Draaisma AL, Schoeman O, Fahy GM, Groothuis GM, Koster HJ. Cryopreservation of rat precision-cut liver and kidney slices by rapid freezing and vitrification. *Cryobiology* 2007 Feb ;54 (1):1-12 Epub 2006 Dec 12 2007;54:1-12.
94. Guillouzo A. Liver cell models in *in vitro* toxicology. *Environ Health Respect* 1999;106:511-532.
95. Roymans D, Annaert P, Van HJ, Weygers A, Noukens J, Sensenhauser C, Silva J, Van LC, Hendrickx J, Mannens G, Meuldermans W. Expression and induction potential of cytochromes P450 in human cryopreserved hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2005;33:1004-1016.
96. Zucco F, De A, I, Testai E, Stamatii A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. *Toxicol In Vitro* 2004;18:153-163.
97. Sawada M, Kamataki T. Genetically engineered cells stably expressing cytochrome P450 and their application to mutagen assays. *Mutat Res* 1998;411:19-43.
98. Coecke S, Bogni A, Langezaal I, Worth A, Hartung T, Monshouwer M. The use of genetically engineered cells for assessing CYP2D6-related polymorphic effects. *Toxicology in vitro* 2001;15:553-556.
99. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le SJ, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepco C, Guguen-Guillouzo C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15655-15660.

100. Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaize D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 2007;168:66-73.
101. Davila JC, Cezar GG, Thiede M, Strom S, Miki T, Trosko J. Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicol Sci* 2004;79:214-223.
102. Casteilla L, Dani C. Adipose tissue-derived cells: from physiology to regenerative medicine. *Diabetes Metab* 2006;32:393-401.
103. Snykers S, Vanhaecke T, Papeleu P, Luttun A, Jiang Y, Vander HY, Verfaillie C, Rogiers V. Sequential exposure to cytokines reflecting embryogenesis: the key for in vitro differentiation of adult bone marrow stem cells into functional hepatocyte-like cells. *Toxicol Sci* 2006;94:330-341.
104. McNeish JD. Stem cells as screening tools in drug discovery. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:515-520.
105. Rodolfa K, Di Giorgio FP, Sullivan S. Defined reprogramming: a vehicle for changing the differentiated state. *Differentiation* 2007;75:577-579.
106. Pascal P, Bensiam F, Auxenfans C, Callu MF, Robert O, Damour O, Chapuis F. Legal framework relating to human tissues used for research ends. *Pathol Biol* 2005;53:571-575.
107. Le RN, de MS, di Donato JH, Boccon-Gibod L, Teillac P, Herve C, Berthon P. Collections of human biological resources for research purposes: from regulations to the need of a guide of good collection practices. *Rev Med Interne* 2003;24:803-814.
108. Bhadriraju K, Chen CS. Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. *Drug Discov Today* 2002;7:612-620.
109. Takashi H, Katsumi M, Toshihiro A. Hepatocytes maintain their function on basement membrane formed by epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007.
110. Griffiths MR, Keir S, Burt AD. Basement membrane proteins in the space of Disse: a reappraisal. *J Clin Pathol* 1991;44:646-648.
111. Hansen LK, Mooney DJ, Vacanti JP, Ingber DE. Integrin binding and cell spreading on extracellular matrix act at different points in the cell cycle to promote hepatocyte growth. *Mol Biol Cell* 1994;5:967-975.
112. Hewitt NJ, Buhning KU, Dasenbrock J, Haunschild J, Ladstetter B, Utesch D. Studies comparing in vivo:in vitro metabolism of three pharmaceutical compounds in rat, dog, monkey, and human using cryopreserved hepatocytes, microsomes, and collagen gel immobilized hepatocyte cultures. *Drug Metab Dispos* 2001;29:1042-1050.
113. Shen C, Zhang G, Qiu H, Meng Q. Acetaminophen-induced hepatotoxicity of gel entrapped rat hepatocytes in hollow fibers. *Chem Biol Interact* 2006;162:53-61.
114. Ng S, Han R, Chang S, Ni J, Hunziker W, Goryachev AB, Ong SH, Yu H. Improved hepatocyte excretory function by immediate presentation of polarity cues. *Tissue Eng* 2006;12:2181-2191.
115. Takezawa T. A strategy for the development of tissue engineering scaffolds that regulate cell behavior. *Biomaterials* 2003;24:2267-2275.

116. Takezawa T, Takenouchi T, Imai K, Takahashi T, Hashizume K. Cell culture on thin tissue sections commonly prepared for histopathology. *FASEB J* 2002;16:1847-1849.
117. Hoebe KH, Witkamp RF, Fink-Gremmels J, Van Miert AS, Monshouwer M. Direct cell-to-cell contact between Kupffer cells and hepatocytes augments endotoxin-induced hepatic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G720-G728.
118. Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J* 1999;13:1883-1900.
119. Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. Modulation of functional activities in cultured rat hepatocytes. *Mol Cell Biochem* 1983;53-54:35-56.
120. Guguen-Guillouzo C, Clement B, Baffet G, Beaumont C, Morel-Chany E, Glaise D, Guillouzo A. Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. *Exp Cell Res* 1983;143:47-54.
121. Hirose M, Yamato M, Kwon OH, Harimoto M, Kushida A, Shimizu T, Kikuchi A, Okano T. Temperature-Responsive surface for novel co-culture systems of hepatocytes with endothelial cells: 2-D patterned and double layered co-cultures. *Yonsei Med J* 2000;41:803-813.
122. Tsuda Y, Kikuchi A, Yamato M, Chen G, Okano T. Heterotypic cell interactions on a dually patterned surface. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348:937-944.
123. Tsuda Y, Kikuchi A, Yamato M, Nakao A, Sakurai Y, Umezu M, Okano T. The use of patterned dual thermoresponsive surfaces for the collective recovery as co-cultured cell sheets. *Biomaterials* 2005;26:1885-1893.
124. Tsuda Y, Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Sasagawa T, Sekiya S, Kobayashi J, Chen G, Okano T. Cellular control of tissue architectures using a three-dimensional tissue fabrication technique. *Biomaterials* 2007;28:4939-4946.
125. Lu HF, Chua KN, Zhang PC, Lim WS, Ramakrishna S, Leong KW, Mao HQ. Three-dimensional co-culture of rat hepatocyte spheroids and NIH/3T3 fibroblasts enhances hepatocyte functional maintenance. *Acta Biomater* 2005;1:399-410.
126. Choi S, Nishikawa M, Sakoda A, Sakai Y. Feasibility of a simple double-layered coculture system incorporating metabolic processes of the intestine and liver tissue: application to the analysis of benzo[a]pyrene toxicity. *Toxicol In Vitro* 2004;18:393-402.
127. Morken TS, Sonnewald U, Aschner M, Syversen T. Effects of methylmercury on primary brain cells in mono- and co-culture. *Toxicol Sci* 2005;87:169-175.
128. Dupont S, Robert F, Muller D, Grau G, Parisi L, Stoppini L. An in vitro blood-brain barrier model: cocultures between endothelial cells and organotypic brain slice cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1840-1845.
129. Laitinen L. Caco-2 cell cultures in the assessment of intestinal absorption: Effects of some co-administered drugs and natural compounds in biological matrices. Thèse 2006;73 pages.

130. Blauer M, Heinonen PK, Martikainen PM, Tomas E, Ylikomi T. A novel organotypic culture model for normal human endometrium: regulation of epithelial cell proliferation by estradiol and medroxyprogesterone acetate. *Hum Reprod* 2005;20:864-871.
131. Lombardi BS, Schlupp P, Mehnert W, Schafer-Korting M. In vitro skin absorption and drug release - A comparison of six commercial prednicarbate preparations for topical use. *Eur J Pharm Biopharm* 2007.
132. Choi S, Nishikawa M, Sakoda A, Sakai Y. Feasibility of a simple double-layered coculture system incorporating metabolic processes of the intestine and liver tissue: application to the analysis of benzo[a]pyrene toxicity. *Toxicol In Vitro* 2004;18:393-402.
133. Schmitmeier S, Langsch A, Jasmund I, Bader A. Development and characterization of a small-scale bioreactor based on a bioartificial hepatic culture model for predictive pharmacological in vitro screenings. *Biotechnol Bioeng* 2006;95:1198-1206.
134. Shen C, Zhang G, Meng Q. An *in vitro* model for long-term hepatotoxicity testing utilizing rat hepatocytes entrapped in micro-hollow fiber reactor. *Biochemical Engineering Journal* 2007;34:267-272.
135. Legallais C, Gautier A, Dufresne M, Carpentier B, Baudoin R. The place of adsorption and biochromatography in extracorporeal liver support systems. *J Chromatogr B* 2008;861:171-176.
136. Meng Q, Zhang G, Shen C, Qiu H. Sensitivities of gel entrapped hepatocytes in hollow fibers to hepatotoxic drug. *Toxicol Lett* 2006;166:19-26.
137. Allen JW, Hassanein T, Bhatia SN. Advances in bioartificial liver devices. *Hepatology* 2001;34:447-455.
138. Gebhardt R, Hengstler JG, Muller D, Glockner R, Buenning P, Laube B, Schmelzer E, Ullrich M, Utesch D, Hewitt N, Ringel M, Hilz BR, Bader A, Langsch A, Koose T, Burger HJ, Maas J, Oesch F. New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug Metab Rev* 2003;35:145-213.
139. Sakai Y, fukuda O, Choi SH, Sakoda A. Development of a biohybrid simulator for absorption and biotransformation processes in humans based on in vitro models of small intestine and liver tissues. *J Artif Organs* 2003;6:273-281.
140. Sweeney LM, Shuler ML. A cell culture analogue of rodent physiology : application to naphthalene toxicology. *Toxicol In Vitro* 1995;9:307-316.
141. Choi SH, fukuda O, Sakoda A, Sakai Y. Enhanced cytochrome P450 capacities of Caco-2 and Hep G2 cells in new coculture system under static and perfused conditions: evidence for possible organ-to-organ interactions against exogenous stimuli. *Materials science and engineering* 2004;C24:333-339.
142. El-Ali J, Sorger PK, Jensen KF. Cells on chips. *Nature* 2006;442:403-411.
143. Abgrall P, Gue AM. Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem-a review. *J Micromech Microeng* 2007;17:R15-R49.
144. Hu M, Zengerle R. Microfabricated devices for controlled biochemical release. *Actuator* 2006;10th International Conference on New Actuators 14-16 june, Bremen, Germany:263-271.

145. Meng E, Shih J, Li PY, Lo R, Humayun MS, Tai YC. Electrolysis-driven drug delivery for treatment of ocular disease. The 10th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2006) November 5-9 Tokyo Japan 2006;633-635.
146. Wang Z, Kim MC, Marquez M, Thorsen T. High-density microfluidic arrays for cell cytotoxicity analysis. *Lab Chip* 2007;7:740-745.
147. Nguyen NT, Wu Z. Micromixers-a review. *J Micromech Microeng* 2005;15:R1-R16.
148. Hessel V, Lowe H, Schonfeld F. Micromixers-a review on passive and active mixing principles. *Chemical Engineering Science* 2005;60:2479-2501.
149. Zhang C, Xing D, Li Y. Micropumps, microvalves, and micromixers within PCR microfluidic chips: Advances and trends. *Biotechnology Advances* 2007;25:483-514.
150. Li N, Tourovskaia A, Folch A. Biology on a chip: microfabrication for studying the behavior of cultured cells. *Crit Rev Biomed Eng* 2003;31:423-488.
151. Walker GM, Zeringue HC, Beebe DJ. Microenvironment design considerations for cellular scale studies. *Lab Chip* 2004;4:91-97.
152. Verpoorte E. Microfluidic chips for clinical and forensic analysis. *Electrophoresis* 2002;23:677-712.
153. Weibel DB, Whitesides GM. Applications of microfluidics in chemical biology. *Curr Opin Chem Biol* 2006;10:584-591.
154. Breslauer DN, Lee PJ, Lee LP. Microfluidics-based systems biology. *Mol Biosyst* 2006;2:97-112.
155. Allen JW, Khetani SR, Bhatia SN. In vitro zonation and toxicity in a hepatocyte bioreactor. *Toxicol Sci* 2005;84:110-119.
156. Kim L, Toh YC, Voldman J, Yu H. A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells. *Lab Chip* 2007;7:681-694.
157. Tilles AW, Baskaran H, Roy P, Yarmush ML, Toner M. Effects of oxygenation and flow on the viability and function of rat hepatocytes cocultured in a microchannel flat-plate bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 2001;73:379-389.
158. Bhat VD, Windridge PA, Cherry RS, Mandel LJ. Fluctuating shear stress effects on stress fiber architecture and energy metabolism of cultured renal cells. *Biotechnol Prog* 1995;11:596-600.
159. Park J, Berthiaume F, Toner M, Yarmush ML, Tilles AW. Microfabricated grooved substrates as platforms for bioartificial liver reactors. *Biotechnol Bioeng* 2005;90:632-644.
160. Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, Goodman SL, Nealey PF. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials* 1999;20:573-588.
161. Sarkar S, Dadhania M, Rourke P, Desai TA, Wong JY. Vascular tissue engineering: microtextured scaffold templates to control organization of vascular smooth muscle cells and extracellular matrix. *Acta Biomater* 2005;1:93-100.

162. Leclerc E, Corlu A, Griscom L, Baudoin R, Legallais C. Guidance of liver and kidney organotypic cultures inside rectangular silicone microchannels. *Biomaterials* 2006;27:4109-4119.
163. Grayson ACR, Shawgo RS, Johnson AM, Flynn NT, Li Y, Cima MJ, Langer R. A bioMEMS review: MEMS technology for physiologically integrated devices. *Proceedings of the IEEE* 2004;92:6-21.
164. Duffy DC, McDonald JC, Schueller OJ, Whitesides GM. Rapid prototyping of microfluidic systems in Poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem* 1998;70:4974-4984.
165. Bashir R. BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:1565-1586.
166. Ziaie B, Baldi A, Lei M, Gu Y, Siegel RA. Hard and soft micromachining for BioMEMS: review of techniques and examples of applications in microfluidics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:145-172.
167. Feng X, Castracane J, Tokranova N, Gracias A, Lnenicka G, Szaro BG. A living cell-based biosensor utilizing G-protein coupled receptors: principles and detection methods. *Biosens Bioelectron* 2007;22:3230-3237.
168. Leclerc E, Miyata F, Furukawa KS, Ushida T, Sakai Y, Fujii T. Effect on liver cells of stepwise microstructures fabricated in a photosensitive biodegradable polymer by softlithography. *Materials science and engineering* 2004;C24:349-354.
169. Khademhosseini A, Eng G, Yeh J, Fukuda J, Blumling J, Langer R, Burdick JA. Micromolding of photocrosslinkable hyaluronic acid for cell encapsulation and entrapment. *J Biomed Mater Res* 2006;79A:522-532.
170. Ho CT, Lin RZ, Chang WY, Chang HY, Liu CH. Rapid heterogeneous liver-cell on-chip patterning via the enhanced field-induced dielectrophoresis trap. *Lab Chip* 2006;6:724-734.
171. Chen CS, Breslauer DN, Luna JJ, Grimes A, Chin WC, Lee LP, Khine M. Shrinky-Dink microfluidics: 3D polystyrene chips. *Lab Chip* 2008;8:622-624.
172. Takayama S, McDonald JC, Ostuni E, Liang MN, Kenis PJ, Ismagilov RF, Whitesides GM. Patterning cells and their environments using multiple laminar fluid flows in capillary networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5545-5548.
173. Chiu DT, Jeon NL, Huang S, Kane RS, Wargo CJ, Choi IS, Ingber DE, Whitesides GM. Patterned deposition of cells and proteins onto surfaces by using three-dimensional microfluidic systems. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:2408-2413.
174. Kane RS, Takayama S, Ostuni E, Ingber DE, Whitesides GM. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* 1999;20:2363-2376.
175. Folch A, Toner M. Microengineering of cellular interactions. *Annu Rev Biomed Eng* 2000;02:227-256.
176. Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Microfabrication of hepatocyte/fibroblast co-cultures: role of homotypic cell interactions. *Biotechnol Prog* 1998;14:378-387.
177. Zinchenko YS, Coger RN. Engineering micropatterned surfaces for the coculture of hepatocytes and Kupffer cells. *J Biomed Mater Res A* 2005;75:242-248.

178. Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Probing heterotypic cell interactions: hepatocyte function in microfabricated co-cultures. *J Biomater Sci Polym* 1998;9:1137-1160.
179. Kim MS, Yeon JH, Park JK. A microfluidic platform for 3-dimensional cell culture and cell-based assays. *Biomed Microdevices* 2007;9:25-34.
180. Koh WG, Pishko MV. Fabrication of cell-containing hydrogel microstructures inside microfluidic devices that can be used as cell-based biosensors. *Anal Bioanal Chem* 2006;385:1389-1397.
181. Gunawan RC, Choban ER, Conour JE, Silvestre J, Schook LB, Gaskins HR, Leckband DE, Kenis PJ. Regiospecific control of protein expression in cells cultured on two-component counter gradients of extracellular matrix proteins. *Langmuir* 2005;21:3061-3068.
182. Rhee SW, Taylor AM, Cribbs DH, Cotman CW, Jeon NL. External force-assisted cell positioning inside microfluidic devices. *Biomed Microdevices* 2007;9:15-23.
183. Leclerc E, El Kirat K, Griscom L. In situ micropatterning technique by cell crushing for co-cultures inside microfluidic biochips. *Biomed Microdevices* 2007;10:169-177.
184. Lee PJ, Hung PJ, Lee LP. An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture. *Biotechnol Bioeng* 2007;97:1340-1346.
185. Toh YC, Zhang C, Zhang J, Khong YM, Chang S, Samper VD, van ND, Hutmacher DW, Yu H. A novel 3D mammalian cell perfusion-culture system in microfluidic channels. *Lab Chip* 2007;7:302-309.
186. Underhill GH, Chen AA, Albrecht DR, Bhatia SN. Assessment of hepatocellular function within PEG hydrogels. *Biomaterials* 2007;28:256-270.
187. Revzin A, Russell RJ, Yadavalli VK, Koh WG, Deister C, Hile DD, Mellott MB, Pishko MV. Fabrication of poly(ethylene glycol) hydrogel microstructures using photolithography. *Langmuir* 2001;17:5440-5447.
188. Tsang VL, Bhatia SN. Three-dimensional tissue fabrication. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:1635-1647.
189. Koh WG, Itle LJ, Pishko MV. Molding of hydrogel microstructures to create multiphenotype cell microarrays. *Anal Chem* 2003;75:5783-5789.
190. Kim DN, Lee W, Koh WG. Micropatterning of proteins on the surface of three-dimensional poly(ethylene glycol) hydrogel microstructures. *Anal Chim Acta* 2008;609:59-65.
191. Wang F, Wang H, Wang J, Wang HY, Rummel PL, Garimella SV, Lu C. Microfluidic delivery of small molecules into mammalian cells based on hydrodynamic focusing. *Biotechnol Bioeng* 2008;100:150-158.
192. Wada K, Taniguchi A, Kobayashi J, Yamato M, Okano T. Live cells-based cytotoxic sensorchip fabricated in a microfluidic system. *Biotechnol Bioeng* 2008 Apr 15 ;99 (6):1513 -7 2008;99:1513-1517.
193. Luo C, Zhu X, Yu T, Luo X, Ouyang Q, Ji H, Chen Y. A fast cell loading and high-throughput microfluidic system for long-term cell culture in zero-flow environments. *Biotechnol Bioeng* 2008;101:190-195.

194. Ye N, Qin J, Shi W, Liu X, Lin B. Cell-based high content screening using an integrated microfluidic device. *Lab Chip* 2007;7:1696-1704.
195. King KR, Wang S, Irimia D, Jayaraman A, Toner M, Yarmush ML. A high-throughput microfluidic real-time gene expression living cell array. *Lab Chip* 2007;7:77-85.
196. Hung PJ, Lee PJ, Sabounchi P, Aghdam N, Lin R, Lee LP. A novel high aspect ratio microfluidic design to provide a stable and uniform microenvironment for cell growth in a high throughput mammalian cell culture array. *Lab Chip* 2005;5:44-48.
197. Sugiura S, Edahiro J, Kikuchi K, Sumaru K, Kanamori T. Pressure-driven perfusion culture microchamber array for a parallel drug cytotoxicity assay. *Biotechnol Bioeng* 2008 Aug 15 ;100 (6):1156 -65 2008;100:1156-1165.
198. Yoon JS, Choi JW, Lee IH, Kim MS. A valveless micropump for bidirectional applications. *Sensors and Actuators* 2007;A 135:833-838.
199. Oh KW, Ahn CH. A review of microvalves. *J Micromech Microeng* 2006;16:R13-R39.
200. Yi C, Li CW, Ji S, Yang M. Microfluidics technology for manipulation and analysis of biological cells. *Analytica Chimica Acta* 2006;560:1-23.
201. Viravaidya K, Sin A, Shuler ML. Development of a microscale cell culture analog to probe naphthalene toxicity. *Biotechnol Prog* 2004;20:316-323.
202. Viravaidya K, Shuler ML. Incorporation of 3T3-L1 cells to mimic bioaccumulation in a microscale cell culture analog device for toxicity studies. *Biotechnol Prog* 2004;20:590-597.
203. Baudoin R, Griscom L, Monge M, Legallais C, Leclerc E. Development of a renal microchip for in vitro distal tubule models. *Biotechnol Prog* 2007;23:1245-1253.
204. Leclerc E, Sakai Y, Fujii T. Cell culture in 3-Dimensional microfluidic structure of pdms (polydimethylsiloxane). *Biomedical Microdevices* 2003;5:109-114.
205. Leclerc E, Sakai Y, Fujii T. Microfluidic PDMS (polydimethylsiloxane) bioreactor for large-scale culture of hepatocytes. *Biotechnol Prog* 2004;20:750-755.
206. Domansky K, Sivaraman A, Griffith LG. Micromachined Bioreactor for in Vitro Cell Self-Assembly and 3D Tissue Formation. *Lab-on-chips for cellomics* 2004;Chap 13:319-346.
207. Powers MJ, Domansky K, Kaazempur-Mofrad MR, Kalezi A, Capitano A, Upadhyaya A, Kurzawski P, Wack KE, Stolz DB, Kamm R, Griffith LG. A microfabricated array bioreactor for perfused 3D liver culture. *Biotechnol Bioeng* 2002;78:257-269.
208. Park J, Li Y, Berthiaume F, Toner M, Yarmush ML, Tilles AW. Radial flow hepatocyte bioreactor using stacked microfabricated grooved substrates. *Biotechnol Bioeng* 2008;99:455-467.
209. Leclerc E, David B, Griscom L, Lepioufle B, Fujii T, Layrolle P, Legallais C. Study of osteoblastic cells in a microfluidic environment. *Biomaterials* 2006;27:586-595.
210. Leclerc E, Sakai Y, Fujii T. Perfusion culture of fetal human hepatocytes in microfluidic environments. *Biochemical Engineering Journal* 2004;20:143-148.

211. Zhang MY, Lee PJ, Hung PJ, Johnson T, Lee LP, Mofrad MR. Microfluidic environment for high density hepatocyte culture. *Biomed Microdevices* 2008;10:117-121.
212. Anderson JR, Chiu DT, Jackman RJ, Cherniavskaya O, McDonald JC, Wu H, Whitesides SH, Whitesides GM. Fabrication of topologically complex three-dimensional microfluidic systems in PDMS by rapid prototyping. *Anal Chem* 2000;72:3158-3164.
213. Jackman RJ, Wilbur JL, Whitesides GM. Fabrication of submicrometer features on curved substrates by microcontact printing. *Science* 1995;269:664-666.
214. Linder V, Wu H, Jiang X, Whitesides GM. Rapid prototyping of 2D structures with feature sizes larger than 8 microm. *Anal Chem* 2003;75:2522-2527.
215. Li S, Chen S. Polydimethylsiloxane Fluidic Interconnects for Microfluidic Systems. *IEEE Transactions on advanced Packaging* 2003;26:242-247.
216. Briquet F, Colas A, Thomas X. Silicones à usage médical. Dow Corning France - Division Santé Europe 1996;1-11.
217. Filippi C, Keatch SA, Rangar D, Nelson LJ, Hayes PC, Plevris JN. Improvement of C3A cell metabolism for usage in bioartificial liver support systems. *J Hepatol* 2004;41:599-605.
218. Elkayam T, mitay-Shaprut S, Dvir-Ginzberg M, Harel T, Cohen S. Enhancing the drug metabolism activities of C3A--a human hepatocyte cell line--by tissue engineering within alginate scaffolds. *Tissue Eng* 2006;12:1357-1368.
219. Krasteva N, Seifert B, Albrecht W, Weigel T, Schossig M, Altankov G, Groth T. Influence of polymer membrane porosity on C3A hepatoblastoma cell adhesive interaction and function. *Biomaterials* 2004;25:2467-2476.
220. Schneider M, Marison IW, von SU. The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J Biotechnol* 1996;46:161-185.
221. Kemp CW, Shiloach J. A simple colorimetric assay for the determination of L-glutamine in samples of tissue culture medium. *Am Biotechnol Lab* 1993;11:12.
222. Burke MD, Mayer RT. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos* 1974;2:583-588.
223. Kelly JH, Sussman NL. A fluorescent cell-based assay for cytochrome P-450 isozyme 1A2 induction and inhibition. *Journal of biomolecular screening* 2000;5:249-253.
224. Siegel S, Castellan Jr NJ. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. McGraw-Hill Humanities/Social Sciences/Languages 1988;2nd edition:399 pages.
225. Geogin JP, Gouet M. *Statistiques avec Excel 2000*. 1ère édition 2000;Eyrolles:352 pages.
226. Mavri-Damelin D, Damelin LH, Eaton S, Rees M, Selden C, Hodgson HJ. Cells for bioartificial liver devices: the human hepatoma-derived cell line C3A produces urea but does not detoxify ammonia. *Biotechnol Bioeng* 2008;99:644-651.
227. Gillmor SD, Larson BJ, Braun JM, Mason CE, Cruz-Barba LE, Denes F, Lagally MG. Low-contact-angle polydimethyl siloxane (PDMS) membranes for fabricating micro-

- bioarrays. *Microtechnologies in Medicine & Biology 2002;2nd annual international IEEE-EMB special topic conference*:51-56.
228. Eddington DT, Puccinelli JP, Beebe DJ. Thermal aging and reduced hydrophobicity recovery of polydimethylsiloxane. *Sensors and Actuators* 2006;114:170-172.
229. Sanchez A, Alvarez AM, Pagan R, Roncero C, Vilaro S, Benito M, Fabregat I. Fibronectin regulates morphology, cell organization and gene expression of rat fetal hepatocytes in primary culture. *J Hepatol* 2000;32:242-250.
230. Trautwein C, Davies M, Elias E, Strain A, Manns MP. Extracellular matrix proteins modulate cytochrome P450 2D6 expression in human hepatocytes. *J Hepatol* 1995;22:50-56.
231. Jiang ST, Chuang WJ, Tang MJ. Role of fibronectin deposition in branching morphogenesis of Madin-Darby canine kidney cells. *Kidney Int* 2000 May ;57 (5):1860 -7
2000;57:1860-1867.
232. Masumoto A, Arao S, Otsuki M. Role of beta1 integrins in adhesion and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 1999;29:68-74.
233. Schoenenberger CA, Zuk A, Zinkl GM, Kendall D, Matlin KS. Integrin expression and localization in normal MDCK cells and transformed MDCK cells lacking apical polarity. *J Cell Sci* 1994;107 (Pt 2):527-541.
234. Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *J Biomed Mater Res A* 2003;66:247-259.
235. Leclerc E, Furukawa KS, Miyata F, Sakai Y, Ushida T, Fujii T. Fabrication of microstructures in photosensitive biodegradable polymers for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2004;25:4683-4690.
236. Fukuda J, Khademhosseini A, Yeo Y, Yang X, Yeh J, Eng G, Blumling J, Wang CF, Kohane DS, Langer R. Micromolding of photocrosslinkable chitosan hydrogel for spheroid microarray and co-cultures. *Biomaterials* 2006;27:5259-5267.
237. Nyberg SL, Hardin J, Amiot B, Argikar UA, Rimmel RP, Rinaldo P. Rapid, large-scale formation of porcine hepatocyte spheroids in a novel spheroid reservoir bioartificial liver. *Liver Transpl* 2005;11:901-910.
238. Yu H, Meyvantsson I, Shkel IA, Beebe DJ. Diffusion dependent cell behavior in microenvironments. *Lab Chip* 2005;5:1089-1095.
239. Torii T, Miyazawa M, Koyama I. Effect of continuous application of shear stress on liver tissue: continuous application of appropriate shear stress has advantage in protection of liver tissue. *Transplant Proc* 2005;37:4575-4578.
240. Nakatsuka H, Sokabe T, Yamamoto K, Sato Y, Hatakeyama K, Kamiya A, Ando J. Shear stress induces hepatocyte PAI-1 gene expression through cooperative Sp1/Ets-1 activation of transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:G26-G34.
241. Jensen ME, Odgaard E, Christensen MH, Praetorius HA, Leipziger J. Flow-induced [Ca²⁺]_i increase depends on nucleotide release and subsequent purinergic signaling in the intact nephron. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2062-2070.

-
242. Praetorius HA, Frokiaer J, Leipziger J. Transepithelial pressure pulses induce nucleotide release in polarized MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288:F133-F141.
 243. Rotem A, Toner M, Tompkins RG, Yarmush ML. Oxygen uptake rates in cultured rat hepatocytes. *Biotechnol Bioeng* 1992;40:1286-1291.
 244. Balis UJ, Behnia K, Dwarakanath B, Bhatia SN, Sullivan SJ, Yarmush ML, Toner M. Oxygen consumption characteristics of porcine hepatocytes. *Metab Eng* 1999;1:49-62.
 245. Guillouzo A, Guyomard C, Fautrel A, Chesné C. Storage of isolated hepatocytes. *The hepatocyte review 2000*;M.N. Berry and A.M. Edwards (eds):125-145.
 246. Bayliss MK, Cross DM. The importance of hepatocytes in drug metabolism studies : an industrial perspective. *The hepatocyte review 2000*;M.N. Berry and A.M. Edwards (eds):365-389.
 247. Schmitmeier S, Langsch A, Bader A. A membrane-based small-scale bioreactor for accelerated in vitro drug screenings with primary hepatocytes. *Desalination* 2006;199:258-260.
 248. Alexandre E, David P, Viollon C, Wolf P, Jaeck D, Azimzadeh A, Nicod L, Boudjema K, Richert L. Expression of cytochromes P-450 2E1, 3A4 and 1A1/1A2 in growing and confluent human HepG2 hepatoma cells_Effect of ethanol. *Toxicology in vitro* 1999;13:427-435.
 249. Schaeffner I, Petters J, Aurich H, Frohberg P, Christ B. A microtiterplate-based screening assay to assess diverse effects on cytochrome P450 enzyme activities in primary rat hepatocytes by various compounds. *Assay Drug Dev Technol* 2005;3:27-38.

