



Conception d'un microsysteme pour l'évaluation du passage de biomolécules à travers la barrière pulmonaire

Ludivine Bol

► To cite this version:

Ludivine Bol. Conception d'un microsysteme pour l'évaluation du passage de biomolécules à travers la barrière pulmonaire. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112118 . tel-01061867

HAL Id: tel-01061867

<https://theses.hal.science/tel-01061867>

Submitted on 8 Sep 2014

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.

UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE de CHIMIE PARIS-SUD (ED 470)

Discipline : Chimie

Laboratoire des Protéines et Nanotechnologies en Sciences Séparatives

Institut Galien Paris-Sud – UMR 8612 CNRS

UFR de Pharmacie

THESE DE DOCTORAT

Soutenue le 20/06/2014

par

Ludivine BOL

Conception d'un microsysteme pour l'évaluation du passage de biomolécules à travers la barrière pulmonaire

Composition du jury :

Bruno Le Pioufle	Professeur à l'ENS Cachan	Rapporteur
Olivier Tillement	Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Elias Fattal	Professeur à l'Université Paris Sud	Président
Anne-Marie Haghiri-Gosnet	Directrice de recherche au CNRS	Examinatrice
Nicolas Moniotte	Industriel chez GlaxoSmithKline Vaccines (Belgique)	Examineur
Myriam Taverna	Professeur à l'Université Paris Sud	Directrice de thèse
Isabelle Le Potier	Maître de Conférences à l'Université Paris Sud	Co-directrice de thèse

Remerciements

Je tiens à commencer ces lignes en remerciant avant tout mes deux directrices de thèse, *Myriam Taverna* et *Isabelle Le Potier*, pour qui j'ai une grande affection. Elles m'ont permis d'évoluer et de prendre confiance en moi en ne cessant de m'accorder leur confiance. Merci pour votre bienveillance, que vous m'avez exprimée chacune à votre manière, votre disponibilité malgré des emplois du temps parfois très chargés, et la transmission de votre savoir à travers les nombreuses discussions que nous avons eu. Vous vous êtes très bien complétées toutes les deux, tant sur le plan scientifique qu'humain, et je ne saurais comment vous remercier, sinon en vous exprimant ma plus sincère reconnaissance.

Je remercie ensuite les différents membres du jury, qui me font l'honneur d'avoir accepté de juger mon travail.

En travaillant entre trois équipes de recherche, et à l'interface entre plusieurs disciplines, j'ai côtoyé de nombreuses personnes grâce auxquelles ce travail a été possible et que je voudrais remercier très sincèrement.

Je remercie en premier lieu *Elias Fattal* et *Anne-Marie Haghiri-Gosnet* pour m'avoir accueillie au sein de leurs équipes, respectivement l'équipe « Vectorisation pharmaceutique des molécules fragiles » de l'Institut Galien Paris-Sud et l'équipe « Nanotechnologie et dispositifs microfluidiques » du Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, et grâce à qui ce projet de thèse en collaboration a pu voir le jour. Merci à Elias pour son écoute et ses encouragements.

Ce travail de thèse n'aurait pas eu la même valeur sans l'aide précieuse et les compétences scientifiques en matière de micro et nanotechnologie de *Jean-Christophe Galas*. Merci pour ton implication importante dans ce travail de thèse. J'ai beaucoup appris à ton contact et tu m'as fait découvrir un monde qui m'était alors si lointain au commencement de cette thèse. J'en profite pour remercier les nombreux doctorants et chercheurs de l'équipe du LPN, avec *Anne-Claire Louër* comme ambassadrice principale, qui m'ont accueilli à bras-ouverts à chacune de mes visites.

J'ai été très heureuse de travailler aux côtés d'*Hervé Hillaireau*, qui par son encadrement et ses nombreux conseils a beaucoup apporté à ce travail. Merci pour ta disponibilité, tes encouragements réguliers et ton enthousiasme constant vis-à-vis du projet.

Je tiens également à remercier très chaleureusement les nombreuses personnes de l'Institut Galien Paris-Sud qui se sont intéressées à ce projet, et qui par leurs compétences scientifiques ont

participé à différents aspects de ce travail. Merci à *Simona Mura* qui, à mon arrivée, m'a formé à la culture cellulaire et m'a transmis le flambeau des cellules Calu-3. Merci à *Valérie Nicolas* pour sa participation et son aide en microscopie confocale. Merci à *Hélène Chacun* pour sa formation à la manipulation des produits radioactifs et ses conseils. Merci à *Stéphanie Denis* pour son aide en culture cellulaire, et à *Juliette Vergnaud* pour ses conseils en tests ELISA. Enfin, merci à *Walban Alshaer* pour le temps qu'il m'a accordé pour m'apporter des conseils sur la manipulation des aptamères et à *Anne-Lise Marie* pour sa participation enthousiaste aux études d'affinité en électrophorèse capillaire.

Merci également à trois étudiantes, qui par le biais de leur stage ou échange universitaire ont grandement contribué à ce travail : *Inah Ndiaye* et *Jeanne Bataille* avec qui j'ai eu particulièrement plaisir à travailler, et *Paula Chellini*.

Cette thèse a également été l'occasion pour moi de faire de l'enseignement et je tiens à remercier les différents enseignants-chercheurs aux côtés desquels j'ai découvert et expérimenté ce beau métier : *Jean-Philippe Michel*, *Sinda Lepêtre*, *Karine Andrieux*, *Vincent Faivre*, *Hervé Hillaireau*, *Isabelle Le Potier* et *Claire Smadja*.

Il me tient particulièrement à coeur de remercier mes deux compères doctorants de la première heure, *Kiarach Mesbah* et *Sonia Korchane*, avec qui j'ai pour ainsi dire tout partagé pendant ces années au laboratoire. Aujourd'hui une belle amitié nous lie et je ne doute pas qu'elle perdurera. J'aimerais également remercier en particulier *Nadège Grabowski*, qui par sa bonne humeur a rendu beaucoup moins routinières les nombreuses heures passées ensemble en salle de culture cellulaire, et qui, à plusieurs reprises, m'a permis de partir en week-end en s'occupant de mes cellules.

J'adresse d'immenses mercis chaleureux aux différents membres, actuels ou anciens, de l'équipe du Laboratoire des Protéines et Nanotechnologies en Sciences Séparatives de l'Institut Galien Paris-Sud, que je n'ai pas encore cités mais qui ont beaucoup compté et avec qui il a été si agréable d'évoluer pendant toutes ces années : *Dimitri Brinet*, *Emmanuel Jaccoulet*, *Romain Verpillot*, *Giang Phuong Ly*, *Alison Alazard*, *Monica Araya*, *Nacéra Abboud*, *Antoine Pallandre*, *Thuy Tran* et *Marie-Claude Anmella*.

Enfin, j'aimerais remercier mes parents et mes trois sœurs, qui me voient évoluer dans un monde si obscur à leurs yeux, celui de la science. Ils n'en ont pas moins compris les difficultés qu'un étudiant en thèse peut parfois rencontrer, et je les remercie du fond du cœur pour leur soutien et leurs encouragements à répétition, notamment pendant la phase de rédaction.

Abréviations

Ac	Anticorps
Ag	Antigène
ACE	Electrophorèse capillaire d'affinité (<i>Affinity Capillary Electrophoresis</i>)
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AIC	Culture en interface air-liquide (<i>Air-Interface Culture</i>)
ARN	Acide RiboNucléique
APCE	<i>Affinity Probe Capillary Electrophoresis</i>
ARNm	ARN messenger
ATCC	Banque de données biologiques (<i>American Type Culture Collection</i>)
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BPCO	Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
¹⁴C	Carbone 14
CEIA	<i>Capillary Electrophoresis-based ImmunoAssays</i>
COC	<i>Cyclic Olefin Copolymer</i>
CS	Chitosane
CV	Coefficient de variation
Cy5.5	Cyanine 5.5
Da	Dalton
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOTA	<i>1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
dpm	Nombre de désintégrations par minute
EC	Electrophorèse Capillaire
ECZ	Electrophorèse Capillaire de Zone
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EMA	Agence européenne des médicaments (<i>European Medicines Agency</i>)
EpDMA	Epoxy-poly-(diméthylacrylamide)
F-actin	Filaments d'actine
FBS	Sérum de vœu fœtal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (<i>Food and Drug Agency</i>)
FI	Force ionique
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
FP 488	Fluoprobes 488 NHS-ester
FQ	3-(2-furoyl)-quinoline-2-carboxaldehyde
Gd	Gadolinium
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HRP	Peroxydase de raifort (<i>Horseradish peroxidase</i>)
Ig(G/A)	Immunoglobuline (de type A/G)
IM	Intra-Musculaire

IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IV	Intra-Veineuse
JAM	<i>Junctional Adherent Molecule</i>
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MET	Microscopie Electronique en Transmission
LCC	Culture en interface liquide-liquide (<i>Liquid Covered Culture</i>)
LIF	Fluorescence induite par laser (<i>Laser Induced Fluorescence</i>)
LOC	Laboratoire sur puce (<i>Lab-On-a-Chip</i>)
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
m_{eo}	Mobilité électroosmotique
m_{ep}	Mobilité électrophorétique
MRP	<i>Multi-drug Resistance associated Protein</i>
MUC	Mucine
NBD-F	4-fluoro-7-nitrobenzofurazan
NP	Nanoparticule
OATP	Polypeptides transporteurs d'anions organiques (<i>Organic Anion-Transporting Polypeptide</i>)
OCT	Protéine de transport de cations organiques (<i>Organic Cation Transporter protein</i>)
PA	Principe Actif
PAA	<i>poly(acrylic acid)</i>
P_{app}	Coefficient de perméabilité apparent
PBS	Tampon phosphate salin (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PC	Polycarbonate
PCR	Amplification en chaîne par polymérase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PdI	Indice de polydispersité
PDMS	Poly-diméthylsiloxane
PEG	Polyéthylène glycol
PEPT	Transporteurs de peptides (<i>Peptide Transporters</i>)
PET	PolyEthylène Téréphtalate
PF68	Poloxamère 188
PLGA	Acide poly-(lactique-co-glycolique)
PMMA	Poly(méthylméthacrylate)
PVA	Alcool poly(vinyle)
QSP	Quantité Suffisante Pour
RhodB	Rhodamine B
SC	Sous-Cutanée
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment</i>
SP-A/C	Protéine du surfactant de type A/C
TEER	Résistance électrique trans-épithéliale (<i>Trans-Epithelial Electric Resistance</i>)
TGI	Tractus gastro-intestinal
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
UI	Unité Internationale
UV	Ultra-Violet
VIP	Peptide vasoactif intestinal (<i>Vasoactive Intestinal Peptide</i>)
ZO-1	Protéine Zonula Occludens-1

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	11
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	15
I. La voie pulmonaire et son positionnement vis-à-vis des autres voies d'administration des peptides et protéines thérapeutiques	15
I.1. La voie parentérale et ses limites	15
I.1.1. Pharmacocinétique des peptides et protéines thérapeutiques administrés par voie parentérale	16
I.1.1.1. Rappels sur la structure des peptides et protéines	16
I.1.1.2. Absorption et distribution.....	16
I.1.1.3. Métabolisme et élimination.....	18
I.1.2. Limites de la voie parentérale.....	19
I.2. Les voies d'administration alternatives autres que la voie pulmonaire.....	20
I.2.1. La voie orale.....	20
I.2.2. La voie buccale	21
I.2.3. La voie nasale.....	22
I.3. La voie pulmonaire et ses promesses.....	23
I.3.1. Avantages de la voie pulmonaire	23
I.3.2. Anatomie pulmonaire.....	24
I.3.3. Principales barrières et mécanismes de défense s'opposant au passage systémique des biomolécules thérapeutiques	26
I.3.3.1. Épithélium bronchique et clairance muco-ciliaire.....	26
I.3.3.2. Épithélium alvéolaire et prise en charge par les macrophages	28
I.3.4. Devenir des biomolécules administrées par voie pulmonaire : métabolisation et biodisponibilité	29
I.3.5. Absorption et mécanismes de transport à travers l'épithélium pulmonaire	30
I.3.5.1. Transport paracellulaire.....	31
I.3.5.2. Transport transcellulaire.....	33
II. Modèles <i>in vitro</i> d'épithélium pulmonaire.....	35
II.1. Les supports commerciaux dédiés aux tests <i>in vitro</i> de transport de molécules	36
II.2. Les différentes lignées épithéliales pulmonaires.....	38
II.2.1. Lignée alvéolaire A549.....	39
II.2.2. Lignée bronchique 16HBE14o-	40
II.2.3. Lignée bronchique Calu-3	41

II.3. Méthodes de caractérisation des modèles <i>in vitro</i> d'épithélium	43
II.3.1. Technique électrique	43
II.3.2. Etudes de perméabilité aux petites molécules hydrophiles.....	45
II.3.3. Techniques d'imagerie	47
II.3.4. Techniques de biologie moléculaire et immunologiques	52
II.4. Utilisation de la lignée Calu-3 pour des applications biopharmaceutiques	53
III. Microsystèmes et cellules : les « cells-on-chip ».....	54
III.1. Miniaturisation : avantages des « cells-on-chip »	56
III.2. Contraintes de fabrication spécifiques aux « cells-on-chip »	57
III.3. Les « cells-on-chip » comme outils pour le développement pharmaceutique.....	59
III.3.1. Criblage à haut débit et tests de toxicité de molécules thérapeutiques.....	60
III.3.2. Modèles de barrières cellulaires pour l'évaluation de la perméabilité et du transport de molécules thérapeutiques	65
III.3.3. Modèles pulmonaires miniaturisés	68
PARTIE EXPERIMENTALE	73
 <u>Chapitre 1 :</u>	
Fabrication, mise au point et caractérisation du microsystème	75
 I. Optimisation des conditions de culture à l'échelle macroscopique en systèmes perméables..	
I.1. Optimisation des conditions de culture	76
I.1.1. Milieu de culture et lot de sérum	76
I.1.2. Concentration cellulaire d'ensemencement.....	80
I.2. Etude de l'impact du type de membrane support	81
I.2.1. Suivi de la TEER.....	82
I.2.2. Relation entre TEER et morphologie des tapis cellulaires.....	84
I.2.3. Relation entre TEER et perméabilité au ¹⁴ C-sucrose.....	85
I.3. Discussion.....	88
II. Microfabrication : mise au point et optimisation du microsystème	92
II.1. Plateforme de culture pour la croissance des barrières pulmonaires	93
II.1.1. Méthodes d'intégration de la membrane servant de support à la culture.....	94
II.1.1.1. Collage de la membrane sous irradiation UV.....	94
II.1.1.2. Collage thermique de la membrane	96
II.1.2. Support pour la plateforme de culture lors de la croissance des barrières cellulaires.....	98
II.2. Support recueil à la plateforme de culture pour les études de perméabilité	99
II.2.1. Principe du support recueil	100
II.2.2. Assemblage du support recueil avec la plateforme de culture.....	101

III. Culture miniaturisée : mise au point et caractérisation du microsystème	104
III.1. Essais de mise en culture.....	104
III.2. Caractérisation du microsystème final.....	106
IV. Conclusion.....	125

Chapitre 2 :

Evaluation du passage de nanoparticules et protéines à travers le modèle de barrière pulmonaire à l'échelle macroscopique et en microsystème	129
---	------------

I. Etude du passage de nanoparticules biodégradables de PLGA utilisées pour la vectorisation de molécules thérapeutiques.....	130
--	------------

I.1. Quelques notions générales sur les nanoparticules pour la délivrance de molécules thérapeutiques	130
I.2. Préparation et caractérisation des nanoparticules de PLGA	132
I.2.1. Préparation	132
I.2.2. Caractérisation	133
I.3. Evaluation du passage des nanoparticules PLGA à travers le modèle Calu-3 en systèmes Transwell®	134
I.3.1. Etalonnage des nanoparticules de PLGA par spectrofluorimétrie	134
I.3.2. Exposition des barrières Calu-3 aux nanoparticules de PLGA	136
I.3.3. Quantification des nanoparticules de PLGA par spectrofluorimétrie.....	136

II. Etude du passage de nanoparticules utilisées comme agents de contraste pour l'imagerie médicale	139
--	------------

II.1. Description des nanoparticules étudiées	139
II.2. Evaluation du passage des nanoparticules DOTA-Gd-Cy5.5 à travers le modèle Calu-3 en microsystème.....	140
II.2.1. Etalonnage des nanoparticules DOTA-Gd-Cy5.5 par spectrofluorimétrie	140
II.2.2. Exposition des barrières Calu-3 aux nanoparticules DOTA-Gd-Cy5.5.....	141
II.2.3. Quantification des nanoparticules DOTA-Gd-Cy5.5 par spectrofluorimétrie	142

III. Etude du passage de l'insuline	144
--	------------

III.1. Evaluation du passage de l'insuline à travers le modèle Calu-3 en microsystème.....	144
III.1.1. Exposition des barrières Calu-3 à l'insuline.....	144
III.1.2. Quantification par test ELISA.....	145

IV. Conclusion.....	147
----------------------------	------------

Chapitre 3 :

Quantification de l'insuline par électrophorèse capillaire 149

I. Electrophorèse capillaire de zone (ECZ)151

I.1. Principe : phénomènes de transport 151

I.1.1. Electroosmose 151

I.1.2. Electromigration..... 152

I.2. Particularités spécifiques à l'analyse des protéines et peptides 154

I.2.1. Phénomènes d'adsorption 154

I.2.2. Dérivation de protéines et peptides par fluorescence 155

I.3. Les immunoessais en ECZ pour la quantification de protéines (« EC-based immunoassay »)..... 157

II. Quantification directe de l'insuline..... 159

II.1. Insuline non marquée et détection UV..... 159

II.2. Insuline marquée et détection LIF 162

II.2.1. Optimisation des conditions de dérivation 163

II.2.2. Dérivation de l'insuline au FITC par chauffage 165

III. Quantification de l'insuline par CE-based immunoassay et détection LIF..... 170

III.1. Complexation de l'insuline avec un anticorps..... 170

III.2. Complexation de l'insuline avec un aptamère..... 172

III.2.1. Structure et propriétés de l'aptamère anti-insuline 173

III.2.2. Choix des tampons de séparation et d'incubation..... 174

III.2.3. Evaluation des conditions d'incubation du mélange aptamère/insuline 176

III.2.4. Etude de l'affinité de l'aptamère anti-insuline avec l'insuline 177

IV. Conclusion..... 179

CONCLUSION GENERALE.....181

Références 187

ANNEXES 203

Matériels et méthodes relatifs au chapitre 1 203

Matériels et méthodes relatifs au chapitre 2..... 211

Matériels et méthodes relatifs au chapitre 3..... 213

INTRODUCTION GENERALE

Aujourd'hui, les innovations thérapeutiques majeures sont issues ou bénéficient en grande partie des biotechnologies. Les biomédicaments au sens strict du terme ont la caractéristique d'être produits à partir d'organismes vivants ou de leurs composants cellulaires. Ils se répartissent dans de nombreuses catégories pharmacologiques dont les principales sont les vaccins, les protéines thérapeutiques et les anticorps monoclonaux, une majorité d'entre eux étant issue du génie génétique. En 30 ans, depuis la fabrication d'insuline humaine en 1978, les médicaments issus des biotechnologies ont profondément modifié le diagnostic et le traitement de nombreuses pathologies (cancers, maladies inflammatoires, diabète, etc.) en apportant de nouveaux traitements que l'industrie du médicament « classique » ne savait pas produire.

De nombreux défis restent cependant encore à relever. Notamment, il apparaît aujourd'hui nécessaire de se concentrer sur la formulation de ces médicaments et tenter de renouveler les modes d'administration. Issus du vivant, les biomédicaments sont essentiellement des protéines ou des peptides et présentent des structures particulièrement fragiles et sujettes à la dégradation dans de nombreux compartiments de l'organisme. Contrairement aux principes actifs chimiques pour lesquels la voie orale est la voie d'administration privilégiée, celle-ci ne peut être appliquée aux biomédicaments en raison de la forte présence d'enzymes métabolisantes dans le tractus digestif. Les biomédicaments sont de plus des molécules hydrophiles de grande taille, et peinent à traverser les membranes biologiques très lipophiles, conduisant en général à une faible biodisponibilité et à une absorption limitée. La voie d'administration privilégiée des biomédicaments est donc la voie parentérale, malgré l'inconfort parfois important qu'elle entraîne chez les patients, source d'une mauvaise compliance notamment dans le cas de pathologies chroniques.

Les industries recherchent de plus en plus des voies d'administration alternatives, non invasives, parmi lesquelles la voie pulmonaire représente la plus grande potentialité. L'administration à travers l'appareil respiratoire est une voie intéressante à la fois pour la délivrance locale et systémique de biomolécules fragiles et/ou faiblement absorbées. Les poumons représentent en effet une très grande surface d'absorption potentielle, la perméabilité de la barrière pulmonaire serait plus perméable que d'autres muqueuses de l'organisme, et son activité protéolytique est relativement faible.

Le recours à cette nouvelle voie d'administration doit s'accompagner du développement d'une formulation adaptée, pour éviter les mécanismes de défense de l'organisme vis-à-vis des particules étrangères, pour protéger la molécule de la dégradation et pour favoriser le passage de l'épithélium, ce dernier représentant la barrière physique majeure s'opposant à l'absorption des biomédicaments au niveau pulmonaire.

La complexité des mécanismes biologiques mis en jeu au niveau pulmonaire rend cependant particulièrement difficile la prédiction de leur absorption chez l'homme. Des modèles de barrières *in vitro* sont aujourd'hui communément cultivés au sein de systèmes perméables commerciaux, pour faciliter la prédiction de la perméabilité des épithéliums vis-à-vis des molécules candidates. Parmi les modèles d'épithéliums pulmonaires développés, les cellules Calu-3, dérivées d'un adénocarcinome bronchique humain, ont récemment émergé comme étant l'un des modèles les plus représentatifs de l'épithélium natif, en étant capables de former des épithéliums polarisés et jointifs tout en sécrétant du mucus. Ces systèmes restent néanmoins lourds à manipuler et sont consommateurs de temps, ce qui les rend peu adaptés pour des études de criblage à haut débit.

Récemment, les systèmes microfluidiques appliqués à l'étude et à la manipulation de cellules que l'on appelle les « cells-on-chip » ont émergés, et constituent des outils aux valeurs ajoutées très attractives. Les dimensions à l'échelle du micromètre, la maîtrise de la structuration des matériaux et la manipulation de fluides offrent notamment un meilleur contrôle spatio-temporel du microenvironnement cellulaire, plus adapté à l'échelle de la cellule. Dans le même temps, la miniaturisation permet d'envisager de manière beaucoup plus aisée la parallélisation des essais, tout en réduisant la consommation des échantillons à tester.

Dans ce contexte, ce travail de thèse a consisté à concevoir un microsystème pour l'évaluation du passage de biomolécules, formulées ou non, à travers un modèle de barrière épithéliale pulmonaire (cellules Calu-3) miniaturisé. L'objectif du développement de ce système s'est focalisé principalement sur la capacité de criblage de molécules candidates à une administration pulmonaire, pour faciliter et accélérer la sélection des meilleurs candidats lors de la phase amont de la découverte de médicaments.

La première partie de ce manuscrit comprend une partie bibliographique dans laquelle nous exposons dans un premier temps les particularités spécifiques de l'administration des peptides et protéines thérapeutiques. La voie parentérale actuellement privilégiée possède des limites et certaines voies d'administration non invasives pourraient y répondre. Nous nous intéressons tout particulièrement à la voie pulmonaire pour laquelle nous démontrons les nombreux intérêts

qu'elle représente pour l'administration systémique des biomédicaments. Nous discutons ensuite de l'utilité des modèles *in vitro* d'épithélium pulmonaire pour aider au développement de nouvelles thérapeutiques pour une administration pulmonaire. En exposant notamment les systèmes disponibles pour réaliser les tests *in vitro* de transport de molécules et les différentes techniques mises en œuvre pour leur caractérisation, nous démontrons la pertinence de l'utilisation de la lignée cellulaire épithéliale bronchique Calu-3 comme modèle pour évaluer le transport de molécules à travers la barrière pulmonaire. Enfin, nous discutons, à travers de multiples exemples tirés de la littérature, des performances atteignables grâce à l'utilisation des « cells-on-chip », essentiellement pour l'établissement de modèles de barrières biologiques. Nous établissons ensuite un état de l'art sur l'utilisation de ces systèmes miniaturisés dans le domaine de la recherche pulmonaire.

La deuxième partie de ce manuscrit est consacrée au travail expérimental réalisé dans le cadre de cette thèse. Le chapitre 1 est dédié à la fabrication, mise au point et caractérisation du microsystème développé pour réaliser des études de transport de biomolécules et formulations à travers le modèle de barrière pulmonaire Calu-3. Une première étude préliminaire consacrée à l'évaluation du comportement et à l'optimisation des conditions de culture des cellules Calu-3 en systèmes perméables à l'échelle macroscopique est présentée. Nous détaillons ensuite les différentes mises au point et optimisations de la microfabrication ayant permis d'aboutir au microsystème dans sa version définitive, capable d'évaluer la perméabilité de différentes molécules en parallèle. Enfin, à travers l'évaluation des performances du microsystème développé, nous démontrons sa pertinence comme outil *in vitro* pour l'évaluation du transport de biomolécules à travers la barrière épithéliale pulmonaire.

Le chapitre 2 s'intéresse à l'évaluation du passage de différents analytes à travers le modèle de barrière pulmonaire Calu-3. La perméabilité de l'épithélium vis-à-vis de deux types de nanoparticules aux propriétés et fonctions très différentes, à l'échelle macroscopique ou en microsystème sont testées à travers le modèle de barrière Calu-3. Des nanoparticules polymériques et biodégradables à visée thérapeutique, et des nanoparticules hybrides à composante métallique utilisées pour l'imagerie biomédicale sont décrites. Une étude du passage de l'insuline à travers le modèle d'épithélium en microsystème est également détaillée, pendant laquelle nous avons évalué l'effet mucopénétrant d'un polymère et son éventuelle capacité à favoriser le passage de l'insuline à travers l'épithélium pulmonaire. Nous discutons de la compatibilité des différentes méthodes analytiques employées pour quantifier le passage des différents analytes testés, avec notre microsystème.

Enfin, le chapitre 3 présente différents essais de mise au point d'une méthode d'analyse de l'insuline en électrophorèse capillaire de zone (ECZ), en vue de son application pour quantifier son passage à travers la barrière pulmonaire en microsysteme. Après avoir explicité les principes généraux de l'ECZ, ses particularités spécifiques dans le cas de l'analyse de protéines et peptides, nous présentons également les méthodes d'immunodosage en ECZ. Nous exposons ensuite les résultats obtenus pour chaque stratégie de quantification envisagée. Une première concerne la mise au point d'une méthode de dérivation de l'insuline par marquage covalent avec un fluorophore pour une détection sensible par fluorescence induite par laser (LIF). Une deuxième présente les essais préliminaires réalisés pour la mise au point d'une méthode d'immunodosage en ECZ de l'insuline à l'aide de deux molécules complexantes, un anticorps et un aptamère.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La voie pulmonaire et son positionnement vis-à-vis des autres voies d'administration des peptides et protéines thérapeutiques

Dans cette première partie bibliographique, nous étudions la problématique globale de l'administration des biomédicaments. Nous expliquons dans un premier temps pourquoi la nature même des protéines et peptides font de la voie parentérale la voie d'administration de choix de ces molécules thérapeutiques particulières. Nous évoquons ensuite la faisabilité de différentes voies alternatives d'administration, non invasives, pour palier aux nombreux inconvénients de la voie parentérale. Nous nous intéressons tout particulièrement à la voie pulmonaire pour laquelle nous démontrons les nombreux intérêts qu'elle représente pour l'administration systémique des biomédicaments. Après un rappel sur l'anatomie pulmonaire, nous nous attachons à décrire les différents mécanismes de barrière et de défense rencontrés au niveau pulmonaire, ainsi que les mécanismes de transport impliqués dans le devenir des peptides et protéines thérapeutiques administrés par inhalation.

I.1. La voie parentérale et ses limites

La voie parentérale reste à l'heure actuelle la voie majeure d'administration des peptides et protéines thérapeutiques. Une très large majorité, pour ne pas dire une exclusivité quasi-totale des biomédicaments sont à l'heure actuelle administrés par la voie parentérale, essentiellement par injections intraveineuse (IV), sous-cutanée (SC) et intramusculaire (IM). Pour des raisons spécifiques qui sont développées dans ce chapitre, la communauté scientifique internationale et les industries pharmaceutiques cherchent à rendre possible l'administration des biomédicaments à l'aide de voies alternatives non invasives, notamment par voie pulmonaire qui fait l'objet d'intenses recherches.

I.1.1. Pharmacocinétique des peptides et protéines thérapeutiques administrés par voie parentérale

I.1.1.1. Rappels sur la structure des peptides et protéines

Comparées aux substances actives chimiques, les biomédicaments sont des molécules très complexes, dont l'activité thérapeutique dépend d'une conformation spécifique organisée en structure primaire, secondaire et tridimensionnelle. Les propriétés physico-chimiques des peptides et protéines sont guidées essentiellement par leur taille et leur séquence primaire. La nature des différents acides aminés confèrent un état de charge et un degré d'hydrophobie spécifique à chaque peptide ou protéine. Bien qu'aucun consensus ne soit clairement établi, on parle généralement de peptide pour les séquences polypeptidiques composées jusqu'à une cinquantaine d'acides aminés (< 5 kDa), et de protéines au-delà de 50 acides aminés (>5 kDa). Les acides aminés interagissent entre eux par des liaisons hydrogènes, permettant aux chaînes primaires de s'organiser en structures secondaires stabilisantes, principalement sous la forme d'hélices alpha, feuillets beta et coudes. La conformation tridimensionnelle finale qu'adopte la chaîne polypeptidique constitue la structure tertiaire de la protéine. Celle-ci est due à la présence de ponts disulfures ainsi qu'à un ensemble de liaisons non covalentes plus ou moins fragiles, telles que les liaisons hydrogènes, les ponts salins, ou les interactions hydrophobes, et confère à la protéine son activité biologique.

De par leur nature protéique, les biomédicaments possèdent donc des propriétés physico-chimiques particulières qui vont directement impacter leurs propriétés pharmacocinétiques, soit dicter leur absorption, distribution, métabolisme et élimination (profil ADME). Les peptides et protéines thérapeutiques sont des molécules particulièrement fragiles et sujettes à de nombreuses dégradations tant physiques que chimiques qui peuvent fortement modifier leur devenir dans l'organisme. Cette grande fragilité peut également avoir un impact sur la structure conformationnelle indispensable à leur activité biologique.

I.1.1.2. Absorption et distribution

Une fois administrée, toute substance active (chimique ou biologique) doit traverser les membranes biologiques du site d'absorption vers le sang, pour pénétrer dans la circulation systémique et être distribuée aux différents sites cibles de l'organisme où elle exercera son activité thérapeutique. Les profils d'absorption et de biodistribution des biomédicaments sont hautement reliés aux propriétés anatomiques du site d'absorption (lui-même dépendant du site d'administration) ainsi qu'aux propriétés physico-chimiques des molécules administrées. La

liaison aux protéines plasmatiques (ex : albumine) peut également influencer la biodistribution des biomédicaments. Dans le cas des petites protéines par exemple, le même mécanisme que pour les petites molécules chimiques s'applique : seule la fraction libre traverse les membranes endothéliales et est alors distribuée dans l'organisme. La fraction liée, en équilibre constant avec la fraction libre, reste dans la circulation sanguine. Pour d'autres protéines en revanche, et celles notamment dont le passage membranaire s'effectue par transport actif, les protéines plasmatiques peuvent alors faciliter l'interaction des protéines thérapeutiques avec leur récepteur cellulaire spécifiques, favorisant ainsi leur biodistribution (Braeckman 2002).

En raison de leur haut poids moléculaire et de leur forte hydrophilie, les biomédicaments peinent à traverser les membranes biologiques très lipophiles, conduisant en général à une faible biodisponibilité et à une absorption limitée (Antosova *et al.* 2009). Il a en effet été démontré que pour les molécules dont la masse moléculaire dépasse les 700 Da, la biodisponibilité décroît fortement (Donovan *et al.* 1990). Le degré d'hydrophobie des molécules joue également un rôle prépondérant dans les mécanismes d'absorption. Un degré minimum de lipophilie est en effet nécessaire aux molécules pour pénétrer les membranes cellulaires organisées en bicouches lipidiques, pour ensuite traverser les barrières biologiques par la voie transcellulaire. Sans ce caractère lipophile, l'absorption passive des molécules ne peut avoir lieu que par la voie paracellulaire (entre deux cellules adjacentes), mais celle-ci est très restrictive et ne laisse passer que les molécules relativement petites (Goldberg & Gomez-Orellana 2003).

Cette problématique principale est facilement contournée grâce à l'administration par voie parentérale, qui permet d'injecter directement ou presque (selon le mode utilisé : IV, SC ou IM) les protéines dans la circulation systémique. Une fois celle-ci atteinte, les macromolécules doivent traverser les surfaces endothéliales tapissant la paroi des vaisseaux sanguins, pour atteindre l'espace interstitiel puis les différents tissus de l'organisme. Le passage à travers les capillaires est sélectif et basé sur la taille, la forme et l'état de charge des macromolécules. Les grosses molécules comme les protéines possèdent un volume de distribution¹ relativement faible, ce qui conduit à une faible distribution dans les tissus périphériques, ou au niveau des sites anatomiques où le flux sanguin local est limité. La pénétration dans les tissus se restreint généralement à la capacité des protéines à se lier à des récepteurs spécifiques et à interagir par liaisons électrostatiques avec les surfaces cellulaires chargées négativement (Braeckman 2002). Les molécules protéiques sont également peu stables dans le flux sanguin où leur solubilité est parfois limitée.

¹ Le volume de distribution se définit comme le volume fictif ou « apparent » dans lequel se distribue une quantité de médicament pour être en équilibre avec la concentration plasmatique.

I.1.1.3. Métabolisme et élimination

Les biomédicaments sont éliminés par métabolisation *via* les mêmes voies cataboliques que les peptides et protéines endogènes. Ils sont donc métabolisés par protéolyse en fragments peptidiques ou acides aminés libres, essentiellement au niveau hépatique, rénal et gastro-intestinal. Néanmoins, le caractère ubiquitaire des enzymes protéolytiques responsables de leur dégradation (peptidases ou protéases) exposent les biomédicaments à une possible élimination dans de nombreux autres compartiments de l'organisme, et notamment au niveau vasculaire (Braeckman 2002). Cette instabilité dans la circulation sanguine combinée au caractère immunogène des peptides et protéines diminue leur temps de demi-vie et nécessite de répéter les administrations pour maintenir une concentration thérapeutique.

Le rein est l'organe majeur responsable de la clairance² et du catabolisme des peptides et petites protéines (Maack *et al.* 1979). L'élimination rénale peut avoir lieu selon trois mécanismes principaux: (i) filtration glomérulaire puis excrétion urinaire de la protéine dégradée ou inchangée, (ii) catabolisme membranaire au niveau de la lumière tubulaire, et (iii) absorption tubulaire puis dégradation intracellulaire (Rabkin & Dahl 1993). La barrière glomérulaire est chargée négativement du fait de la présence de nombreux glycosaminoglycanes (chaînes polysaccharidiques composées de résidus glucidiques présentant des charges négatives). Elle est alors très sélective en fonction de la charge, et laisse passer préférentiellement les protéines neutres et cationiques. Le foie contribue également significativement au métabolisme des protéines thérapeutiques, où leur clairance a lieu par absorption médiée par des transporteurs (notamment les récepteurs de l'endocytose) ou par pinocytose non-sélective suivie d'un métabolisme intracellulaire à l'aide de peptidases, et/ou exocytose dans la bile (Braeckman 2002). Les grosses protéines sont principalement éliminées par opsonisation (adsorption à leur surface de protéines plasmatiques ou fragments du complément nommés opsonines), et par phagocytose.

Les mécanismes de clairance des peptides et protéines sont principalement dictés par leurs propriétés physico-chimiques, le site d'élimination étant principalement dépendant du poids moléculaire des molécules administrées (Tableau 1). D'autres paramètres comme la charge globale, le degré d'hydrophobie, la présence et la nature des chaînes glycosylées, les structures secondaire et tertiaire ou encore la tendance à l'agrégation vont quant à eux être à l'origine de mécanismes préférentiels de clairance mis en place aux différents sites d'élimination (Tang & Meibohm 2006).

² On entend par clairance la capacité d'un tissu, organe ou organisme à éliminer d'un fluide de l'organisme (plasma, lymphe...) une substance déterminée.

Poids moléculaire	Site d'élimination	Mécanisme majeur d'élimination	Caractéristique physico-chimique impliquée
< 500 Da	Sang, foie	Hydrolyse extracellulaire Diffusion passive	Structure, lipophilie
500–1000 Da	Foie	Absorption médiée par un transporteur Diffusion passive	Structure, lipophilie
1–50 kDa	Rein	Filtration glomérulaire puis dégradation	Poids et diamètre moléculaires, charge
50–200 kDa	Rein, foie	Endocytose médiée par un récepteur	Sucres, charge
200–400 kDa		Opsonisation (α_2 -macroglobuline, IgG)	
> 400 kDa		Phagocytose	Agrégation

Tableau 1. Sites et mécanismes d'élimination des peptides et protéines selon le poids moléculaire.
Adapté de Tang & Meibohm (2006)

I.1.2. Limites de la voie parentérale

La voie parentérale possède des inconvénients majeurs qui ont conduit les industries et la recherche académique à étudier, avec plus ou moins de succès, des voies alternatives pour l'administration des biomédicaments telles que les voies orale, buccale, nasale, pulmonaire, intradermique, intraoculaire, rectale et vaginale. Ces voies d'administration non invasives sont de plus en plus étudiées pour espérer améliorer la compliance des traitements. Les traitements nécessitant des injections sont en effet particulièrement contraignants pour le patient, avec des effets négatifs sur la compliance aux traitements car source importante d'inconfort et de douleur. Les biomédicaments nécessitent souvent des injections régulières et répétées, d'une part parce qu'ils sont souvent indiqués pour traiter des maladies chroniques, d'autre part parce qu'ils ont la particularité d'avoir des temps de demi-vie faible. La voie parentérale représente de plus un coût non négligeable à la fois pour les industries et les systèmes de santé. Cette voie d'administration est invasive et exige donc que le produit soit strictement stérile et apyrogène, ce qui entraîne des contraintes très particulières de fabrication et qui peut également nécessiter l'intervention d'un personnel et/ou d'une structure spécialisés pour assurer les administrations.

I.2. Les voies d'administration alternatives autres que la voie pulmonaire

Bien que les voies intraoculaire, rectale et vaginale citées précédemment offrent certains avantages pour l'administration systémique de peptides et protéines, elles restent très peu acceptées par les patients, ce qui les réserve davantage à une administration locale et ne sont pas évoquées dans ce manuscrit. Les avantages et inconvénients des voies orale, nasale et buccale qui font l'objet d'une recherche intense et pour qui le futur à moyen terme semble plus prometteur pour l'administration systémique des biomédicaments sont ici évoquées succinctement à travers leurs avantages et inconvénients.

I.2.1. La voie orale

La voie orale reste la voie préférentielle d'administration des médicaments parce qu'elle assure un très bon niveau de compliance en permettant au patient de gérer lui-même ses administrations et parce qu'elle ne pose aucun problème d'inconfort particulier.

Elle reste cependant un véritable défi en ce qui concerne l'administration des biomédicaments, qui sont sujets à une dégradation massive dans le tractus gastro-intestinal (TGI). La dégradation des protéines est initiée dès l'estomac à l'environnement très acide (pH 2) avec la présence de pepsines, puis dans la lumière intestinale sous l'action de trypsines, chymotrypsines, élastases et lipases. De nombreuses peptidases sont également présentes dans la bordure en brosse de l'épithélium intestinal (Peppas & Carr 2009; Braeckman 2002; Tang & Meibohm 2006). Comme n'importe quelle protéine apportée par l'alimentation, les biomédicaments sont donc rapidement dégradés en di- et tri-peptides puis en acides aminés assimilables par l'organisme, alors qu'ils nécessitent d'être absorbés intacts pour conserver leur activité thérapeutique. Malgré une surface d'absorption potentielle considérable (plus de 200 m²), la muqueuse gastro-intestinale s'oppose massivement à la perméabilité des grosses molécules hydrophiles que sont les peptides et les protéines (Pauletti *et al.* 1996). La très faible fraction de peptides et protéines absorbés intacts au niveau intestinal est ensuite drainée par la veine porte jusqu'au foie, où une métabolisation importante a lieu avant d'atteindre la circulation systémique. En s'ajoutant aux deux paramètres précédents, cet effet de premier passage hépatique est responsable de l'absence quasi-totale de biodisponibilité systémique des biomédicaments après administration par voie orale.

Malgré une faisabilité qui semble très compromise pour l'administration de biomédicaments, la voie orale ne cesse d'être étudiée et de nombreuses stratégies sont régulièrement mises en œuvre pour tenter de prévenir de la dégradation ou améliorer la perméabilité intestinale (Gupta *et al.*

2013; Renukuntla *et al.* 2013; Park *et al.* 2011): ajout de promoteurs d'absorption (acides gras (Mesiha *et al.* 1994), sels biliaires, tensioactifs, polymères (El-Shabouri 2002) ; modification chimique des séquences peptidiques (substitution d'acides aminés) ; conjugaison au poly-éthylène glycol (PEG) ; co-administration d'inhibiteurs de protéases ; encapsulation dans des systèmes micro-ou nano-particulaires, etc.

Très récemment, les sociétés InCube Labs et Rani Therapeutics ont dévoilés la mise au point d'une forme galénique innovante pour l'administration de l'insuline par voie orale. Une gélule (baptisée Robotic Pill) à base d'un polymère sensible aux variations de pH renferme un dispositif avec des microaiguilles à base de sucres contenant l'insuline. Après ingestion, le polymère se dissout dans l'intestin grêle et laisse place à un compartiment renfermant de l'acide citrique et du bicarbonate de sodium, qui en réagissant entre eux, produisent du CO₂ qui propulse les microaiguilles dans l'épithélium tapissant la paroi intestinale. L'insuline est ainsi directement libérée au plus proche des vaisseaux sanguins et échappe à la dégradation enzymatique au niveau de la lumière intestinale. En phase d'essais pré-clinique, ce dispositif aurait d'ores et déjà montré des taux d'absorption équivalents aux injections SC d'insuline chez l'animal (www.incubelabs.com).

I.2.2. La voie buccale

La cavité buccale présente des caractéristiques physiologiques *a priori* favorables à l'administration systémique de peptides ou protéines. Les muqueuses buccales sont en effet très bien vascularisées et permettent d'accéder à une surface d'absorption potentielle de 100 à 200 cm², avec une activité protéolytique faible comparée au TGI, et un effet de premier passage hépatique évité (Mathias & Hussain 2010; Tang & Meibohm 2006). Leur accès très aisé rend de plus cette voie d'administration très bien acceptée par les patients. Cependant en pratique, la structure en multicouches de l'épithélium buccal, combiné à un flux continu et variable de salive constitue une barrière élevée à l'absorption. La perméabilité aux macromolécules hydrophiles n'est observée qu'à des poids moléculaires inférieurs à 20 kDa, et reste modérée comparée à la voie nasale évoquée plus loin (Mathias & Hussain 2010). La cavité buccale est composée de deux types de muqueuses dont les perméabilités sont très différentes (Shojaei 1998). La muqueuse sub-linguale située sous la langue, plus perméable, permet d'obtenir des effets thérapeutiques rapides, mais est particulièrement exposée au flux de salive. La muqueuse tapissant l'intérieur des joues, bien que moins perméable, est préférée pour l'administration systémique, plus adaptée à une délivrance contrôlée de molécules. Elle offre de plus une surface adaptée au dépôt de systèmes bioadhésifs,

utilisés pour prolonger le temps de contact des molécules faiblement perméables pour augmenter leur taux d'absorption.

Une insuline délivrée par voie buccale est aujourd'hui commercialisée sous le nom de Oral-LynTM (société Generex, Canada) en Inde et en Equateur, et en essai clinique de phase III pour l'approbation sur les marchés nord américains et européens notamment. Cette insuline est destinée aux patients atteints de diabète de type 1 et 2 et indiquée pour réguler la glycémie post-prandiale.

I.2.3. La voie nasale

La muqueuse nasale très vascularisée est plus perméable que les muqueuses intestinales et buccales, et représente une surface d'absorption de 150 cm². Malgré un effet de premier passage hépatique évité, la biodisponibilité des peptides et protéines administrés par voie nasale peut cependant être diminuée de par la présence d'enzymes protéolytiques dans les muqueuses et au niveau de l'épithélium bordant les cavités nasales (Duan & Mao 2010; Kushwaha *et al.* 2011). La clairance muco-ciliaire (cf. §I.3.3.1) représente également un obstacle important à l'absorption des molécules administrées par voie nasale (Antosova *et al.* 2009; Mathias & Hussain 2010). De manière générale, les peptides jusqu'à environ 2 kDa sont facilement absorbés au niveau de la muqueuse nasale. Pour des poids moléculaires plus importants en revanche (entre 2 et 6 kDa), une absorption efficace nécessite l'emploi de promoteurs d'absorption (Tang & Meibohm 2006).

La faisabilité de cette voie d'administration pour la délivrance de biomolécules de faibles poids moléculaires est aujourd'hui démontrée, puisque quelques peptides synthétiques sont aujourd'hui commercialisés sous forme de spray nasal : la calcitonine pour le traitement de l'ostéoporose (3,4 kDa), la nafaréline et la buséréline (1,3 kDa) pour le traitement de l'endométriose, et la desmopressine (1,2 kDa) pour le traitement de l'hémophilie.

Tout comme pour la voie pulmonaire que nous détaillons juste après, l'état physiologique de l'individu et la variabilité inter-individuelle sont des sources majeures de manque de reproductibilité des doses administrées par voie nasale. De plus, la fragilité de la muqueuse nasale la rend très facilement irritable suite à des administrations répétées.

I.3. La voie pulmonaire et ses promesses

La voie pulmonaire est certainement la voie alternative la plus prometteuse pour l'administration de protéines et peptides thérapeutiques. Comparée aux différents modes d'administration cités précédemment, elle possède de nombreux avantages qui font d'elle une porte d'entrée privilégiée vers la circulation systémique pour les macromolécules.

I.3.1. Avantages de la voie pulmonaire

Les poumons sont très richement vascularisés et offrent une très grande surface d'absorption de l'ordre de la centaine de m². La très grande finesse de l'épithélium alvéolaire facilite l'absorption systémique des molécules. L'activité enzymatique au niveau pulmonaire est bien plus faible qu'au niveau intestinal, et l'administration directement au niveau des poumons permet d'éviter l'effet de premier passage hépatique (Agu *et al.* 2001; Del Valle *et al.* 2009; Mathias & Hussain 2010).

La région pulmonaire est hautement perméable aux petites comme aux grosses protéines, avec des biodisponibilités pouvant être de 10 à 200 fois supérieures à celles obtenues avec les autres modes d'administration alternatifs (Carafa *et al.* 2012; Andrade *et al.* 2011). Cette grande perméabilité s'explique par le fait que la quantité de fluides est plus faible au niveau pulmonaire, ce qui permet d'obtenir des concentrations importantes de molécules administrées, et ce à proximité immédiate de la circulation sanguine (Cleland *et al.* 2001). Les poumons sont de plus le seul organe à drainer la totalité du volume sanguin en provenance du cœur.

Un médicament délivré aux poumons par inhalation doit être formulé sous forme d'aérosols. Les aérosols sont des dispersions ou des suspensions stables de matières solides ou de gouttelettes liquides dans un milieu gazeux. Le médicament est ainsi déposé dans les voies respiratoires par sédimentation gravitationnelle, impaction inertielle ou diffusion brownienne (Shoyele & Slowey 2006). La taille, la forme, la densité des particules aérosolisées (paramètres regroupés sous le terme de diamètre aérodynamique), ainsi que leur charge vont jouer un rôle crucial en dictant le site de déposition des particules dans le tractus respiratoire (Antosova *et al.* 2009). Ainsi, une bonne biodistribution pulmonaire requiert des particules avec un diamètre aérodynamique moyen situé entre 1 et 5 µm. Si la région alvéolaire doit être spécifiquement ciblée, le diamètre aérodynamique ne doit pas excéder les 3 µm. Les particules >6 µm sont déposées au niveau de l'oropharynx, alors que les particules < 1µm sont exhalées pendant les mouvements de la respiration (Agu *et al.* 2001).

Au-delà de ces nombreux avantages, le manque de reproductibilité des doses administrées par voie pulmonaire reste la faiblesse principale de ce mode d'administration. L'efficacité thérapeutique des médicaments inhalés dépend en effet grandement de la dose et du site de déposition dans le tractus respiratoire. L'atteinte de l'une ou l'autre partie du poumon dépend de nombreux facteurs, notamment du type de formulation ou du type de dispositif de délivrance utilisé et sa capacité à produire des aérosols. L'efficacité des traitements inhalés dépend également fortement de facteurs physiologiques comme la capacité respiratoire du patient et sa manière d'inhaler le produit (Andrade *et al.* 2011).

La pertinence de la voie pulmonaire pour l'administration de protéines thérapeutiques a été concrétisée avec la mise sur le marché en 2006 de l'insuline Exubera® commercialisée par la société Pfizer (New-York, USA), malgré son retrait du marché très rapide pour cause, entre autres, de rentabilité économique insuffisante. Cette insuline inhalée a montré une efficacité similaire à l'insuline injectée par voie SC.

I.3.2. Anatomie pulmonaire

Le tractus respiratoire humain a pour fonction essentielle la réalisation des échanges gazeux entre le sang de l'organisme et l'air atmosphérique. Ces échanges alimentent le sang en dioxygène et permettent l'élimination du dioxyde de carbone. Le tractus respiratoire se divise en deux zones majeures (Weibel & Gomez 1962):

- les voies aériennes supérieures, comprenant les cavités nasale et buccale, le pharynx, et le larynx ;
- les voies aériennes inférieures (Figure 1), qui sur le plan fonctionnel se composent de :
 - la zone de conduction comprenant la trachée, les bronches et les bronchioles ;
 - la zone respiratoire comprenant les bronchioles terminales, les bronchioles respiratoires, les conduits alvéolaires et enfin les sacs alvéolaires.

L'air inhalé pénètre les poumons où il est filtré, humidifié et réchauffé au niveau de la zone de conduction, puis véhiculé jusqu'aux alvéoles où ont lieu les échanges gazeux avec le sang. Les voies aériennes inférieures se divisent de manière dichotomique en 24 générations (Figure 1), de la trachée (génération 0) jusqu'aux sacs alvéolaires, chacun d'entre eux regroupant plusieurs alvéoles (génération 23).

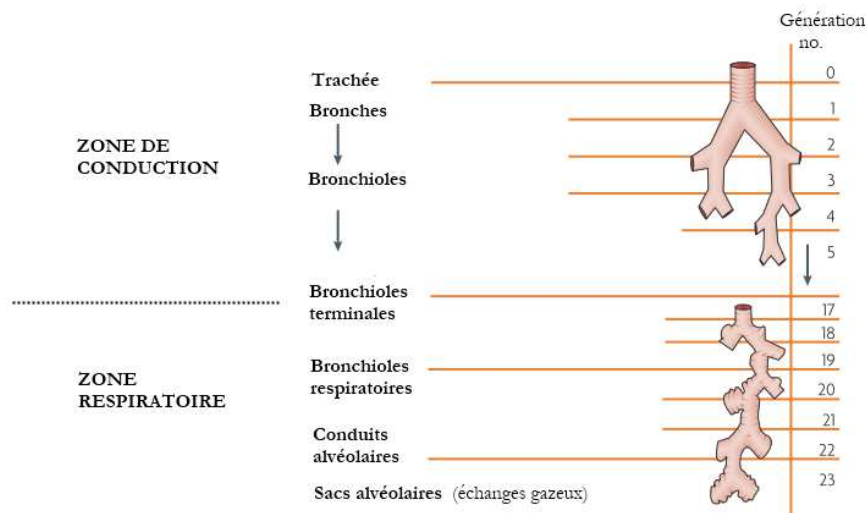


Figure 1. Représentation schématique des voies aériennes inférieures.
Adapté de (Patton & Byron 2007)

A chaque génération, le diamètre des conduits diminue et la surface spécifique augmente de manière significative. De la même manière, les artères et les veines pulmonaires suivent étroitement l'arbre aérien et ses ramifications, et les vaisseaux terminaux pénètrent les parois alvéolaires et aboutissent au réseau capillaire (Figure 2). Ce réseau capillaire extrêmement fin (diamètre d'environ $8\ \mu\text{m}$) représente une surface d'environ $110\text{-}140\ \text{m}^2$ (contre environ $4\ \text{m}^2$ pour la zone de conduction) au sein de laquelle le sang est séparé de l'air par une membrane tissulaire extrêmement fine ($0,2\ \mu\text{m}$) qui forme la paroi des millions d'alvéoles (Gehr *et al.* 1978). L'ensemble constitue la « barrière alvéolo-capillaire » où ont lieu les échanges gazeux.

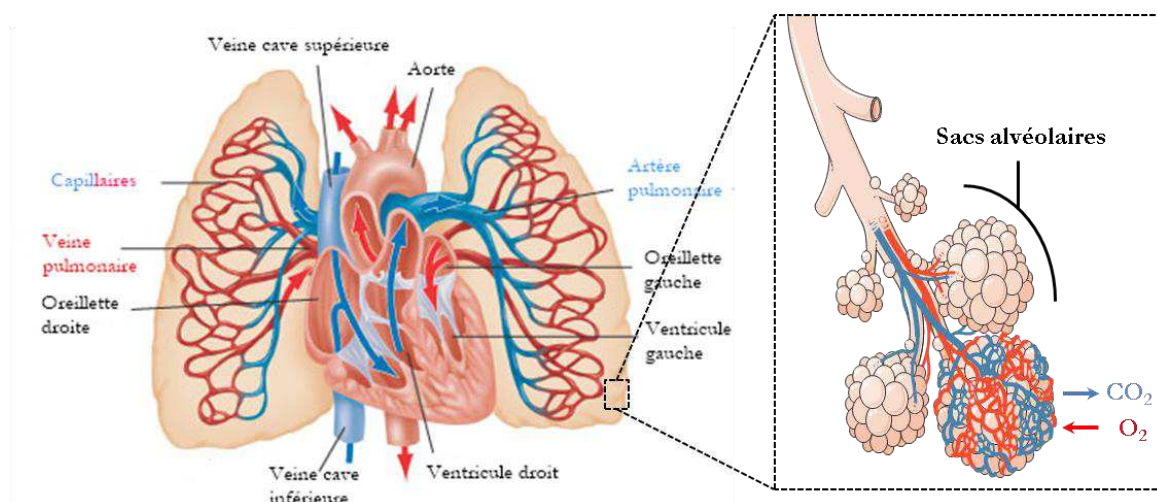


Figure 2. Illustration de la circulation pulmonaire (gauche) et des échanges gazeux au niveau des sacs alvéolaires (droite).

I.3.3. Principales barrières et mécanismes de défense s'opposant au passage systémique des biomolécules thérapeutiques

Les macromolécules administrées par voie pulmonaire rencontrent plusieurs barrières dynamiques qui s'opposent à leur absorption, la principale étant l'épithélium pulmonaire (Patton 1996). Les particules inhalées doivent dans un premier temps échapper aux différents mécanismes naturels de défense mis en place au niveau pulmonaire : la clairance muco-ciliaire au niveau trachéo-bronchique et la prise en charge par les macrophages alvéolaires. L'épithélium pulmonaire constitue ensuite la barrière principale à traverser pour atteindre par la suite la circulation sanguine.

En fonction de la région anatomique, l'épithélium pulmonaire recouvrant les voies respiratoires présente des caractéristiques bien distinctes, conférant ainsi des fonctions spécifiques à chaque zone du système respiratoire.

I.3.3.1. Epithélium bronchique et clairance muco-ciliaire

Epithélium bronchique

La surface épithéliale bronchique de la zone de conduction est caractérisée par un épithélium d'une épaisseur d'environ 60 μm , pseudo-stratifié de type colonnaire, composé de trois types cellulaires majeurs : les *cellules basales*, les *cellules ciliées* permettant la propulsion et l'élimination du mucus vers les voies aériennes supérieures, et les *cellules en gobelet* sécrétrices de mucus. A partir des bronchioles, l'épithélium devient progressivement cubique, puis simple cuboïde d'une épaisseur d'environ 10 μm au niveau des bronchioles terminales (Figure 3). A ce niveau, le nombre de cellules ciliées a diminué et ceci de manière progressive, les cellules en gobelet ayant été remplacées par les *cellules de Clara* qui sécrètent des lipides et protéines qui participent à la composition du surfactant alvéolaire.

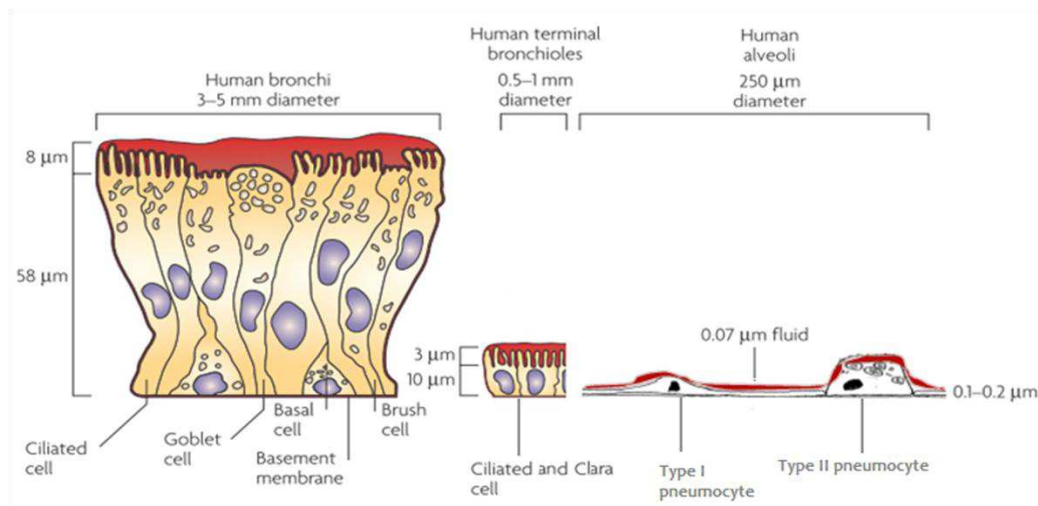


Figure 3. Représentation des différents types d'épithéliums retrouvés aux différents niveaux des voies aériennes inférieures. De gauche à droite : bronches, bronchioles terminales, alvéoles. Sont représentés en rouge les fluides des voies aériennes : mucus au niveau bronchique, surfactant au niveau alvéolaire.
Adapté de Patton & Byron (2007); Forbes (2000)

Mucus et clairance muco-ciliaire

L'épithélium bronchique représente la première ligne de défense de l'appareil respiratoire contre le milieu extérieur en participant notamment au mécanisme de clairance muco-ciliaire. La production de mucus est principalement assurée par les glandes séro-muqueuses, avec l'aide des cellules en gobelet, toutes deux sécrétant de nombreuses mucines (glycoprotéines de type MUC5AC et MUC5B) qui forment un réseau tri-dimensionnel visqueux capable de piéger les particules inhalées insolubles. Majoritairement aqueux (95%), le mucus contient également des lipides (1%), des glycoprotéines (mucines, 2%), des protéines (1%) dont des molécules antimicrobiennes (défensines, lysosyme, IgA), des cytokines impliquées dans la réponse immunitaire, et enfin des sels inorganiques (1%) (Fahy & Dickey 2010; Evans & Koo 2009). Le mucus recouvre toute la surface de la zone de conduction, de la trachée aux bronchioles terminales en diminuant progressivement d'épaisseur au fur et à mesure que le pourcentage de cellules ciliées diminue. Le mucus, qui repose sur une fine couche de liquide péricillaire aqueux et très peu visqueux, a pour fonction principale de piéger et limiter la pénétration de particules exogènes vers l'épithélium pulmonaire et de les éliminer en les faisant remonter vers le pharynx puis l'oropharynx grâce aux mouvements coordonnés des cils de l'épithélium, où elles seront dégluties ou expectorées.

I.3.3.2. Epithélium alvéolaire et prise en charge par les macrophages

Epithélium alvéolaire

La paroi alvéolaire est constituée d'un épithélium simple pavimenteux constitué de seulement deux types cellulaires : les *pneumocytes de type I* et *de type II* (Figure 3). Les pneumocytes de type I sont des cellules très larges et très fines, et recouvrent plus de 93% de l'espace alvéolaire. Les échanges gazeux se font à ce niveau. Bien qu'aussi nombreux, les pneumocytes de type II ont une morphologie plus cubique et ne représentent que 7% de la surface alvéolaire restante. Ils sont en charge de synthétiser et sécréter les constituants du surfactant alvéolaire, régulent le transport d'ions et de solutés, et participent à la réparation alvéolaire en étant capables de se différencier en pneumocytes de type I (Patton 1996).

Surfactant et macrophages alvéolaires

Le surfactant pulmonaire est essentiellement composé de phospholipides (90%) qui lui confèrent des propriétés tensio-actives, permettant de réduire la tension de surface à l'interface air-épithélium et de limiter le risque d'affaissement des alvéoles lors des mouvements de la respiration. Les nombreux macrophages présents à la surface de l'épithélium alvéolaire (~10 macrophages pour chacune des 500 millions d'alvéoles) assurent la première ligne de défense vis-à-vis des particules et pathogènes inhalés dans la région alvéolaire. Les macrophages phagocytent notamment les particules insolubles ou lentes à se dissoudre au niveau de l'espace broncho-alvéolaire. Une fois la reconnaissance effectuée, les macrophages internalisent les particules puis les métabolisent, avec l'aide de peptidases dans le cas des protéines. La phagocytose est facilitée par l'intervention, entre autres, de protéines du surfactant (protéines SP-A et SP-C principalement) qui se lient aux particules étrangères et augmentent ainsi la reconnaissance et la prise en charge de ces dernières par les macrophages (opsonisation) (Dombu & Betbeder 2013). Les macrophages activés sont ensuite soit évacués vers les voies aériennes supérieures *via* le mécanisme de clairance muco-ciliaire, soit éliminés de l'espace alvéolaire *via* le système lymphatique (Labiris & Dolovich 2003). Les protéines thérapeutiques, souvent formulées sous forme liquide ou sous forme de particules aérosolisées hydrosolubles, se dissolvent rapidement dans les fluides pulmonaires et de ce fait échappent plus aisément à la prise en charge par les macrophages (Labiris & Dolovich 2003).

En fonction de leur taille, de leur forme géométrique ou encore de leur propriété de surface, les particules inhalées seront plus ou moins sensibles à la phagocytose par les macrophages. Ainsi, il semblerait que les particules au dessus de 6 μm ou en dessous de 0,2 μm évitent le processus d'élimination par phagocytose (Groneberg *et al.* 2003).

I.3.4. Devenir des biomolécules administrées par voie pulmonaire : métabolisation et biodisponibilité

Les poumons présentent un niveau de métabolisation nettement inférieur à ceux observés dans le TGI et le foie, lieux majeurs de métabolisation des peptides et protéines. La dégradation des peptides et protéines est essentiellement réalisée par les peptidases (ou protéases selon les nomenclatures). On retrouve deux types de peptidases : les endopeptidases capables de fragmenter les chaînes polypeptidiques en milieu de chaîne (aussi appelées protéinases), et les exopeptidases agissant en fin de chaîne en éliminant les acides aminés C- ou N-terminaux (respectivement carboxy- et amino-peptidases) (Barrett & McDonald 1986).

Les exopeptidases se distribuent à la surface des différents types cellulaires des tissus pulmonaires, et notamment au niveau des cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires, des glandes séro-muqueuses, des muscles lisses et du tissu conjonctif sous-jacents, ainsi que des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins pulmonaires (Carafa *et al.* 2012). Des peptidases sont également présentes dans les lysosomes intracellulaires et le cytosol des cellules pulmonaires, et peuvent être sécrétées dans les espaces bronchiques et alvéolaires par les macrophages en cas de réactions inflammatoires. Les lysosomes sont des vésicules cytoplasmiques dont le pH interne est acide (4,5 à 5,5). Ils assurent la destruction de tous les types de macromolécules récupérées à partir des milieux intra- et extra-cellulaires grâce à l'action complémentaire des endo- et exopeptidases. Ils sont le lieu préférentiel de dégradation des protéines.

Peptides

L'hydrolyse enzymatique des peptides au niveau pulmonaire peut être très élevée. Les peptides de moins de 30 acides aminés (<3-4 kDa) sont ainsi particulièrement sensibles à l'action des peptidases et ont, de fait, des biodisponibilités et des taux d'absorption en général assez faibles. Afin de contrer cette hydrolyse quasi systématique, des peptides modifiés chimiquement sont généralement mis au point pour échapper à l'action des peptidases, notamment en modifiant les extrémités C- et N-terminales, en cyclisant les peptides, ou en effectuant des substitutions, additions ou délétions d'acides aminés.

Protéines

Au fur et à mesure que la masse moléculaire augmente, et que les peptides deviennent des protéines avec des structures tertiaires cachant l'accès aux sites d'action des peptidases, la sensibilité aux peptidases diminue fortement voire devient inexistante (Patton & Byron 2007).

Ainsi, les protéines de 6 à 40 kDa (dont le diamètre moyen équivalent est environ <5-6 nm), moins sensibles à ces enzymes, possèdent en général de meilleures biodisponibilités (Patton *et al.* 2004) et sont rapidement absorbées après inhalation. Par exemple, le pic plasmatique de l'insuline dont le poids moléculaire est de 5,8 kDa, est obtenu entre 15 et 60 min après inhalation (Labiris & Dolovich 2003). La région pulmonaire est de plus riche en anti-protéases, ce qui limite véritablement la dégradation de nombreuses protéines. La dégradation par protéolyse est d'ailleurs loin d'être le mécanisme majeur de clairance, puisqu'il est estimé que plus de 95% des protéines restent intactes jusqu'à leur absorption (Folkesson *et al.* 1996).

La faible activité métabolique régnant dans le poumon permet d'obtenir, pour certaines grosses protéines inhalées (>40 kDa), des concentrations plasmatiques suffisantes, mais avec des temps d'absorption sensiblement plus longs que pour les peptides et petites protéines, allant de plusieurs heures à quelques jours (Byron & Patton 1994). Contrairement aux petites protéines, les grosses protéines ont en effet plus de difficultés à traverser les épithéliums pulmonaires. Cette lenteur relative entraîne un temps d'exposition plus long au niveau des fluides recouvrant les épithéliums pulmonaires, où les grosses protéines peuvent alors avoir tendance à précipiter ou à s'agréger (dans le surfactant alvéolaire notamment). Ceci favorise leur séquestration par les macrophages dans lesquels elles subiront une dégradation enzymatique intracellulaire (Patton *et al.* 2004; Patton 1996).

I.3.5. Absorption et mécanismes de transport à travers l'épithélium pulmonaire

Différents mécanismes de transport existent au niveau de l'épithélium pulmonaire : les molécules peuvent passer entre deux cellules adjacentes (transport paracellulaire) ou pénétrer les bicouches lipidiques de la membrane plasmique des cellules (transport transcellulaire) et traverser l'épithélium par simple diffusion passive ou en faisant intervenir des mécanismes plus complexes comme la transcytose ou le transport médié par des récepteurs (Figure 4) (Hillery 2001).

Les mécanismes précis d'absorption des macromolécules restent néanmoins encore en grande partie non expliqués. Au point où en est la recherche, il en ressort néanmoins que les voies d'absorption privilégiées des protéines thérapeutiques seraient la voie paracellulaire et la transcytose (Patton & Byron 2007), parfois même une combinaison des deux mécanismes, ce qui semblerait être le cas pour l'insuline par exemple (Pezron *et al.* 2002).

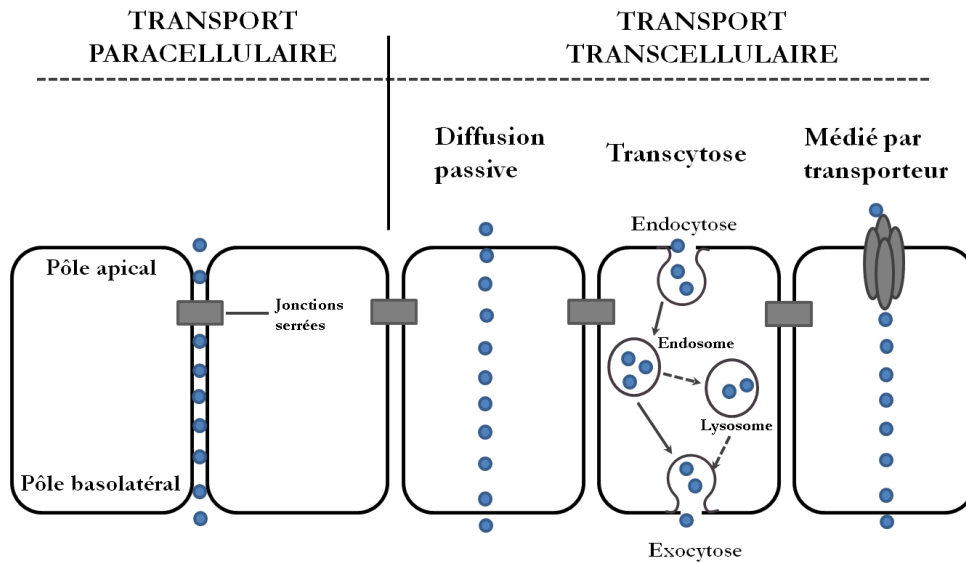


Figure 4. Mécanismes de transport des protéines à travers l'épithélium pulmonaire.
Adapté de Hillery (2001)

I.3.5.1. Transport paracellulaire

L'intégrité des épithéliums est assurée par la présence de complexes jonctionnels intercellulaires spécifiques, qui permettent l'attachement mécanique des cellules entre elles. On retrouve ainsi les desmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées, capables de limiter la perméabilité de l'épithélium (Schneeberger & Lynch 2004) (Figure 5).

Les jonctions serrées sont les composants majeurs de la régulation de la voie paracellulaire, en créant une barrière semi-perméable qui laisse facilement passer les ions et l'eau pour assurer l'étanchéité de l'épithélium, mais qui est très sélective vis-à-vis de toute autre molécule et notamment des macromolécules.

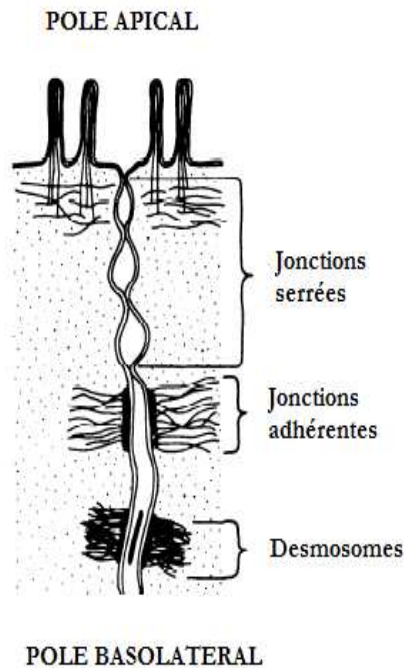


Figure 5. Complexes jonctionnels des cellules épithéliales impliqués dans la perméabilité paracellulaire.
Adapté de Powell (1981)

Localisées au pôle apical des cellules épithéliales, elles créent, en certains points, des zones de fusion partielle entre les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes par l'intermédiaire de protéines spécifiques entrant en contact direct (Hillery 2001). Les jonctions serrées forment un réseau de fibrilles constitué en bandes circonférentielles continues qui ceinture le domaine apical des cellules épithéliales (Figure 6). Le nombre de bandes varie en fonction du type d'épithélium, les épithéliums bronchiques et alvéolaires en présenteraient entre 2 et 7 par cellule épithéliale (Patton 1996). Le nombre de jonctions serrées semble être corrélé à la résistance électrique transépithéliale (Itallie & Anderson 2004; Anderson & Itallie 2009; Claude 1978), rendant compte d'un épithélium plus ou moins « serré ».

Les jonctions serrées sont des complexes multi-protéiques, associant diverses protéines transmembranaires (claudines, occludines et/ou Junctional Adhesion Molecules (JAM)) et cytosoliques (essentiellement les Zonula Occludens ZO-1, ZO-2 et ZO-3). Ces dernières sont à leur tour liées au cytosquelette cellulaire par l'intermédiaire des filaments d'actine (Furuse 2010). Les protéines transmembranaires s'associant dans l'espace intercellulaire s'organisent de manière à former des pores de diamètres différents par lesquels le transport paracellulaire sélectif s'effectue (Figure 6) (Itallie & Anderson 2004).

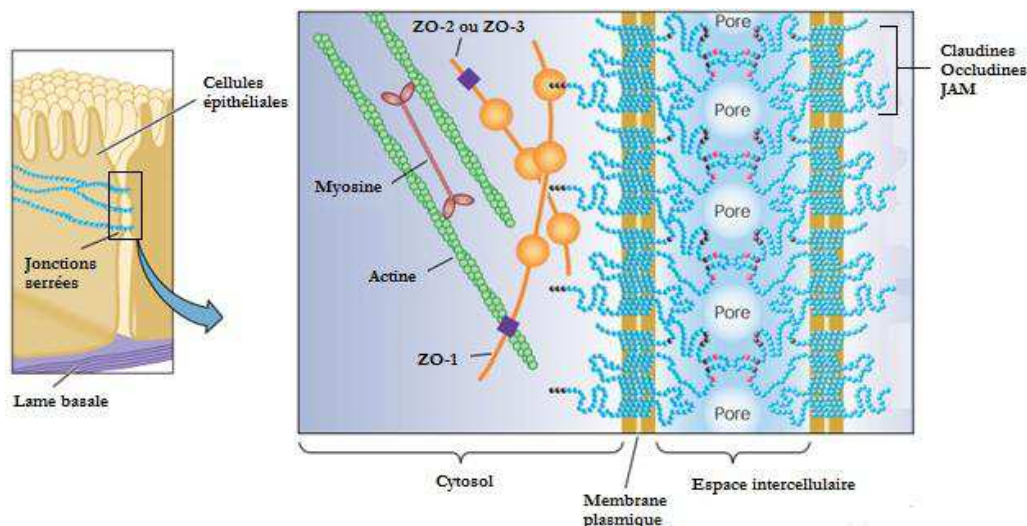


Figure 6. Schématisation des jonctions serrées présentes au pôle apical des cellules épithéliales pulmonaires. A gauche une vue latérale des jonctions serrées organisées en bandes circumférentielles au pôle apical des cellules épithéliales ; à droite une vue du dessus des complexes multi-protéiques impliqués dans les jonctions serrées. Adapté de Itallie & Anderson (2004)

Les jonctions serrées sont également responsables du maintien de la polarité des cellules épithéliales, en marquant la frontière entre le domaine apical et le domaine basolatéral de la membrane plasmique. En empêchant la diffusion de protéines et lipides d'un domaine à l'autre, les jonctions serrées confèrent des fonctionnalités propres à chacun de ces domaines (Miyoshi & Takai 2005).

Le transport paracellulaire est un mécanisme de diffusion passive guidée par un gradient de concentration (Hillery 2001). Seuls les peptides et les protéines de faible poids moléculaire sont capables de traverser les jonctions serrées et donc d'être absorbés par transport paracellulaire, leur perméabilité étant inversement proportionnelle à leur taille (Andrade *et al.* 2011).

I.3.5.2. Transport transcellulaire

Les protéines de plus haut poids moléculaire (> 40 kDa) n'étant pas capables de pénétrer les espaces intercellulaires, elles empruntent alors la voie transcellulaire (Figure 4). La diffusion passive concerne très peu les protéines car très hydrophiles. Elles sont préférentiellement absorbées par transcytose, qui permet leur transport d'un pôle à l'autre de la cellule, à l'aide de mécanismes conjoints d'endocytose et d'exocytose (Figure 4). Les macromolécules pénètrent ainsi l'intérieur de la cellule épithéliale par invagination de la membrane plasmique et formation de vésicules recouvertes de clathrine, ou à l'aide de cavéoles (Patton 1996). Certaines protéines seraient également transportées à travers l'épithélium à l'aide de transporteurs spécifiques présents à la surface de la membrane plasmique. De nombreux transporteurs retrouvés au niveau

des reins, du foie et du TGI, et impliqués dans les mécanismes de distribution, élimination et absorption des médicaments sont également présents dans les poumons. On y retrouve notamment certaines protéines d'efflux (glycoprotéine P-gp, protéines MRP ou « multi-drug resistance associated protein»), les transporteurs de cations organiques (OCT), les transporteurs de peptides (PEPT) ou encore les polypeptides transporteurs d'anions organiques (OATP) (Bosquillon 2010; Gumbleton *et al.* 2011). Néanmoins, leur localisation et leur rôle précis au niveau pulmonaire reste encore largement inconnus, et plus encore vis-à-vis des macromolécules thérapeutiques.

Le site exact pour une absorption pulmonaire maximale, facteur clé pour une administration pulmonaire efficace, reste également non élucidé à l'heure actuelle. Certains principes généraux semblent cependant émerger (Patton *et al.* 2010; Patton & Byron 2007). Il semblerait que dans le cas des peptides et des petites protéines (comme l'insuline), les meilleurs profils d'absorption soient obtenus dans les parties les plus distales de l'arbre pulmonaire plutôt qu'au niveau trachéo-bronchique. Pour les grosses protéines en revanche, comme les anticorps (150 kDa), il semblerait que l'absorption soit plus efficace au niveau trachéo-bronchique, où des récepteurs spécifiques impliqués dans des mécanismes de transcytose sont exprimés (Spiekermann *et al.* 2002). Jusqu'à présent, la plupart des succès d'administration de protéines par voie pulmonaire ont été obtenus avec des peptides et protéines de poids moléculaires relativement faibles, tels que par exemple l'insuline (5,8 kDa), l'ocytocine (1 kDa), la calcitonine (3,4 kDa), le peptide vasoactif intestinal (VIP, 3,3 kDa), ou encore des fragments d'IgG (~ 25 kDa).

La grande complexité de l'épithélium pulmonaire dont la composition cellulaire varie énormément d'une région anatomique à l'autre, le manque de données *in vivo* chez l'homme et le peu de modèles *in vitro* pertinents disponibles à l'heure actuelle pour étudier les mécanismes de transport au niveau pulmonaire sont les raisons principales de ces incertitudes. Ces modèles *in vitro* pulmonaire font l'objet de la partie suivante de l'introduction bibliographique de ce manuscrit.

II. Modèles *in vitro* d'épithélium pulmonaire

Dans le cadre du développement pharmaceutique de nouveaux médicaments, la sécurité et l'efficacité des molécules destinées à une administration pulmonaire doivent être démontrées avant toute administration à l'homme. La complexité des mécanismes biologiques mis en jeu au niveau pulmonaire en réponse à la présence de molécules étrangères à l'organisme rend particulièrement difficile la prédiction de leur absorption chez l'homme. Idéalement, un criblage de perméabilité des différentes molécules candidates réalisé dans un premier temps sur des modèles d'épithéliums pulmonaires *in vitro*, permettrait de sélectionner les candidats les plus prometteurs pour une étude d'absorption *in vivo* chez l'animal. En effet, l'expérimentation animale fait l'objet d'une préoccupation éthique croissante, et son coût très élevé motive les industries à réduire de plus en plus son emploi. En alternative, ces mêmes industries cherchent à mettre au point des modèles cellulaires les plus représentatifs possibles de l'état *in vivo*. L'utilisation de modèles *in vitro* de culture de cellules épithéliales offre un certain nombre d'avantages permettant de réduire les coûts liés à l'expérimentation animale. En effet, les quantités bien plus faibles de produits nécessaires et la rapidité des études menées dans ces systèmes *in vitro* les rendent plus économiques tout en facilitant le screening à haut débit des molécules candidates (Forbes 2000). L'utilité des modèles de barrières *in vitro* est reconnue par la Food and Drug Administration (FDA) et l'Agence Européenne du Médicament (EMA), qui ont chacune publié une directive approuvant l'emploi de la lignée épithéliale intestinale Caco-2 comme l'une des méthodes de référence utilisable pour la prédiction de l'absorption *in vivo* de molécules solides administrées par voie orale (FDA 2000; EMA 2000).

La plus grande complexité de l'anatomie pulmonaire comparée au tractus intestinal, et le nombre relativement faible de molécules administrées par voie pulmonaire commercialisées limitent les données de pharmacocinétiques *in vivo*, ce qui explique l'absence de modèle *in vitro* pulmonaire reconnu par les instances réglementaires. Il existe encore aujourd'hui un retard à rattraper sur la compréhension des mécanismes d'absorption de molécules au niveau pulmonaire (Forbes & Ehrhardt 2005). Un nombre croissant de modèles d'épithéliums pulmonaires a émergé ces dernières décennies, aidant à la compréhension des mécanismes structuraux, cellulaires et moléculaires ou à la découverte des phénomènes de régulation mis en jeu au niveau pulmonaire.

Dans cette partie nous discutons de l'utilité des modèles *in vitro* d'épithélium pulmonaire pour aider au développement de nouvelles thérapeutiques pour une administration pulmonaire. Nous détaillons l'utilisation de ces modèles cellulaires pour l'étude du transport de molécules à travers la barrière pulmonaire, en évoquant les systèmes utilisés pour réaliser ce type d'étude, les

principaux modèles cellulaires d'épithélium pulmonaires disponibles et les différentes méthodes de caractérisation couramment employées pour valider les modèles cellulaires employés. Enfin, nous nous focalisons sur un modèle d'épithélium pulmonaire particulier, la lignée cellulaire épithéliale bronchique Calu-3, qui fait l'objet de ces travaux de thèse. Nous résumons succinctement les nombreuses applications pour lesquelles elle est utilisée comme modèle pulmonaire, pour évaluer la faisabilité et la pertinence de nouvelles formulations pour faciliter l'administration de peptides et protéines par voie pulmonaire.

II.1. Les supports commerciaux dédiés aux tests *in vitro* de transport de molécules

Les tests *in vitro* de transport de molécules sont réalisés conventionnellement dans des systèmes de culture dits perméables (Figure 7). Les cellules y sont mises en culture sur des membranes microporeuses à la base d'inserts suspendus dans les puits d'une plaque multi-puits. Ce type de support favorise la différenciation des cellules épithéliales cultivées en mode liquide-liquide (LCC, liquid-covered culture), ou en interface air-liquide (AIC, air-interface culture), grâce à la délimitation de deux compartiments distincts : un compartiment apical côté insert, et un compartiment basolatéral au niveau du puits sous-jacent. Cette configuration favorise la polarisation des cellules ce qui rend ce type de systèmes particulièrement adapté à l'étude de la perméabilité des modèles de barrières de cellules épithéliales vis-à-vis de différentes substances à travers. Ces systèmes représentent également un environnement plus proche de l'environnement physiologique en permettant des échanges de substances au niveau des membranes apicales et basolatérales, contrairement aux flasques ou boîtes de Petri qui ne favorisent que les échanges aux pôles apicaux. Certains modèles cellulaires nécessitent un traitement spécifique des membranes à l'aide par exemple de collagène pour favoriser l'adhérence et la croissance des cellules.

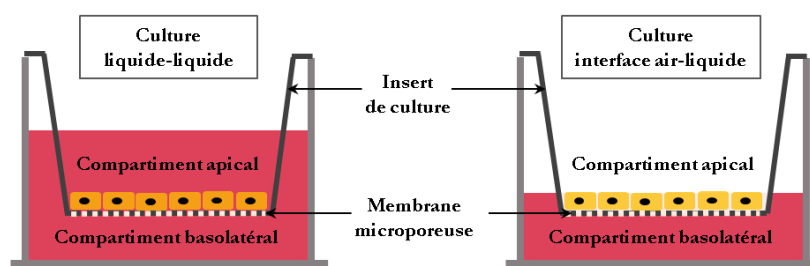


Figure 7. Schéma des systèmes de culture perméables et illustration des conditions de culture liquide-liquide (LCC) ou en interface air-liquide (AIC).

Une grande variété d'inserts de tailles différentes (0,143 à 44 cm²) et de porosité variable (pores de 0,4 à 8 µm de diamètre) est disponible dans divers matériaux (polycarbonate (PC), polyester, polyéthylène téréphtalate (PET)) auprès de plusieurs sociétés (systèmes BD FalconTM de BD Biosciences, systèmes Transwell[®] de Corning Costar et systèmes Millicell[®] de Millipore).

Le type de membrane utilisée doit faire l'objet d'un choix bien réfléchi en fonction de l'application envisagée. Par exemple, un faible diamètre de pores est préférable pour des études de transport de molécules ou à l'inverse, une taille de pores plus importante doit être choisie pour des études de migration cellulaire. Pour les études de transport, il est essentiel de conduire des études de contrôle sur les membranes microporeuses seules, qui assureront que les molécules à tester diffusent librement à travers les membranes et que le mécanisme de barrière restreignant la diffusion est uniquement dû à la présence de la couche cellulaire.

Ces systèmes de culture perméables sont également utilisés pour mettre au point des modèles de co-culture dans lesquels le deuxième type cellulaire peut être cultivé au fond des puits (contact indirect) ou de l'autre côté de la membrane de l'insert (contact direct). *Hermanns et al. (2004)* ont par exemple reproduit un modèle de barrière alvéolo-capillaire en cultivant une lignée alvéolaire en contact indirect avec des cellules primaires endothéliales. Des cellules épithéliales alvéolaires (lignée A549) ont été cultivées avec des macrophages par *Wottrich et al. (2004)* pour étudier le rôle des macrophages après exposition à des particules en suspension dans l'air. Enfin, *Rothen-Rutishauser et al. (2005)* ont établi un modèle de culture triple, en co-cultivant de chaque côté de l'insert cellules des épithéliales alvéolaires, des cellules dendritiques (cellules impliquées dans le système immunitaire), et des macrophages différenciés ajoutés à la surface apicale de l'épithélium. Ce modèle a été utilisé pour évaluer l'effet de nanoparticules non biodégradables en conditions alvéolaires (*Müller et al. 2010*).

Enfin, depuis 2006, la société Epithelix (Suisse) exploite ces systèmes commerciaux perméables pour livrer un modèle cellulaire 3D de l'épithélium respiratoire humain sous le nom de MucilAirTM. Différents modèles cellulaires de cultures primaires humaines, issues de biopsies de patients sains ou atteints d'asthme, de BPCO (Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive) ou de mucoviscidose sont disponibles. Les modèles 3D MucilAirTM sont reconstitués et vendus dans des inserts de culture prêts à l'emploi. Une fois différenciés, leurs modèles sont capables de se maintenir dans un état homéostatique pendant plus d'une année, ce qui, pour des cultures primaires (nous l'évoquons plus loin) est totalement innovant. MucilAirTM est alors capable de fournir un outil d'étude sur le long terme.

II.2. Les différentes lignées épithéliales pulmonaires

Deux types majeurs de culture cellulaires sont utilisés pour mimer les barrières épithéliales pulmonaires *in vitro* : les cultures primaires et les lignées cellulaires.

Les cultures primaires sont des cultures de cellules directement isolées d'organes ou de tissus. Ces cultures primaires peuvent être composées d'une population hétérogène de cellules issues de différents types cellulaires, ce qui leur confère la caractéristique principale de relativement bien mimer l'épithélium natif. Cependant, le nombre de cellules obtenues après isolement est relativement faible et leur mise en place ainsi que leur maintien en culture sont des procédures très complexes. En effet, des cellules fraîchement isolées ne peuvent être gardées en culture que quelques jours, car le caractère de différenciation des cellules est rapidement perdu après seulement 1 ou 2 passages (repiquages). Ces contraintes nécessitent de réaliser des prélèvements fréquents, le plus souvent à partir d'organismes différents, ce qui rend impossible leur standardisation et altère la reproductibilité des expériences d'une culture à l'autre (Gstraunthaler & Hartung 2003). De plus, l'accès difficile aux tissus humains, notamment à partir de patients sains, rend la mise en place de cultures primaires humaines particulièrement délicate.

Ces limitations ont été contournées par la mise au point de **lignées cellulaires**, obtenues soit à partir de cellules cancéreuses prélevées sur des patients, soit à partir de cellules modifiées génétiquement et immortalisées. Contrairement aux cultures primaires, les lignées cellulaires présentent la capacité de se multiplier sur de très longues périodes et peuvent ainsi être cultivées en théorie indéfiniment grâce à la cryoconservation de banques de cellules. Les lignées cellulaires se composent en général d'une population cellulaire homogène, plus stable et plus reproductible dans le temps grâce à l'utilisation de milieux et de protocoles de culture plus facilement standardisables que pour la culture de cellules primaires. Dans le cas des lignées cellulaires pulmonaires, il n'existe néanmoins aucun consensus sur les protocoles, ce qui entraîne une variabilité inter-laboratoire parfois importante (Sakagami 2006). Le développement cellulaire est en effet fortement dépendant des conditions de culture appliquées, notamment du type de surface sur lequel sont déposées les cellules, la densité cellulaireensemencée, le type et la composition du milieu de culture ou encore le nombre de passage déjà effectué (Grainger *et al.* 2006; Forbes & Ehrhardt 2005). Les résultats publiés pour une lignée cellulaire donnée sont donc toujours à prendre avec un certain recul si les milieux et conditions de culture employés sont différents.

A l'heure actuelle, il n'existe que quelques lignées pulmonaires suffisamment caractérisées pour avoir été reconnues par la communauté scientifique comme utiles et représentatives des différents épithéliums pulmonaires (Forbes & Ehrhardt 2005; Sakagami 2006; Sporty *et al.* 2008). Nous ne nous focaliserons ici que sur trois lignées pulmonaires d'origine humaine, modèles d'épithélium alvéolaire (cellules A549) et d'épithélium bronchique (cellules 16HBE14o- et Calu-3), toutes trois très représentées dans la littérature. La lignée Calu-3 faisant l'objet de cette étude, celle-ci sera plus particulièrement détaillée.

II.2.1. Lignée alvéolaire A549

La lignée cellulaire A549 est issue d'un adénocarcinome d'épithélium alvéolaire humain prélevé chez un patient de 58 ans (Giard *et al.* 1973; Lieber *et al.* 1976). Les cellules A549 présentent les caractéristiques morphologiques et biochimiques des cellules alvéolaires de type II, et en particulier, présentent des corps lamellaires responsables de la production de surfactant pulmonaire (Shapiro *et al.* 1978), mélange de phospholipides et de protéines sécrétés au niveau de la lumière alvéolaire. Cette fine couche de surfactant pulmonaire (0,2 μm) joue le rôle très important de réducteur de tension de surface à l'interface air-épithélium afin de limiter le risque d'affaissement des alvéoles lors des mouvements de la respiration. Il est également mis en jeu dans le transport d'ions et de solutés ainsi que dans certains mécanismes de réparation alvéolaire. La lignée A549, disponible à l'American Type Culture collection (ATCC), est une lignée pulmonaire reconnue et certainement la plus utilisée comme modèle d'étude de toxicité pulmonaire, notamment pour la détermination de la toxicité de nanomatériaux développés comme éventuels véhicules de molécules actives dans les voies respiratoires (Grabowski *et al.* 2013; Davoren *et al.* 2007; Simon-Deckers *et al.* 2008). Cette lignée a également été exploitée pour des études d'interactions cellules-particules (Ehrhardt *et al.* 2002), de métabolismes (Foster *et al.* 1998; Yang *et al.* 2000) ou pour étudier le transport de protéines et peptides (Kobayashi *et al.* 1995; Wang *et al.* 2004). Cette lignée fait cependant débat quant à sa pertinence comme modèle d'absorption pulmonaire. En effet, les cellules A549, bien que capables de se développer en monocouche et de se polariser, n'expriment pas de jonctions serrées fonctionnelles ni de transport transépithélial actif d'ions (Foster *et al.* 1998; Elbert *et al.* 1999). De plus, *in vivo*, les cellules alvéolaires de type II ne représentent qu'environ 10% de la surface alvéolaire totale, rendant ce modèle d'épithélium inapproprié pour la prédiction de l'absorption alvéolaire de molécules *in vivo*.

II.2.2. Lignée bronchique 16HBE14o-

La lignée 16HBE14o- a été générée par transformation de cellules épithéliales bronchiques, isolées d'un patient de 1 an ayant subi une transplantation cœur-poumons puis immortalisées à l'aide du virus simien 40 porteur d'une oncoprotéine, la SV 40 T-antigène (Cozens *et al.* 1994). En culture, les cellules 16HBE14o- conservent une morphologie épithéliale en formant des couches de cellules polarisées (Gruenert *et al.* 1995), et présentent un phénotype cuboïdal représentatif des cellules basales bronchiques (Forbes & Ehrhardt 2005) (Figure 8). Lorsqu'elles sont cultivées en condition liquide-liquide, les cellules 16HBE14o- sont relativement comparables à l'épithélium bronchique natif en formant un tapis confluent d'une épaisseur variant de 1 à 5 cellules, aux jonctions serrées fonctionnelles (Ehrhardt *et al.* 2002), et en exprimant plusieurs protéines de transport ainsi qu'un transport actif d'ions (Ehrhardt *et al.* 2003; Cozens *et al.* 1994). Cependant, ces cellules ne sécrètent pas de mucus (Forbes *et al.* 2000) et lorsqu'elles sont cultivées à l'interface air-liquide, se développent en multicouches (10-16 couches) avec des jonctions serrées distribuées de manière très irrégulière (Ehrhardt *et al.* 2003), les rendant ainsi moins pertinentes pour réaliser des études de perméabilité de molécules dans les conditions de culture reproduisant pourtant au plus proche la situation *in vivo*. La lignée 16HBE14o- n'étant pas disponible dans le commerce, son utilisation est moins répandue que la lignée Calu-3 mais a servi à l'étude de transport de quelques molécules et à l'étude de l'interaction de particules avec l'épithélium bronchique (Ahsan *et al.* 2003; Manford *et al.* 2005; Nilsson *et al.* 2010; Forbes *et al.* 2002; Hussain *et al.* 2010).

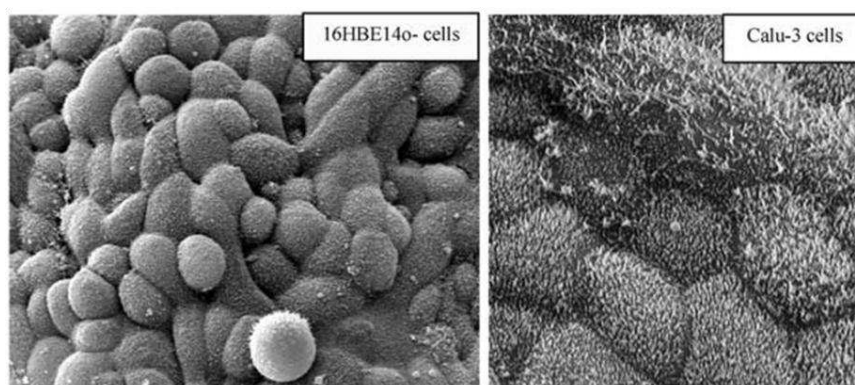


Figure 8. Images en microscopie électronique à balayage (MEB) des lignées épithéliales bronchiques 16HBE14o- et Calu-3 cultivées sur système Transwell®. (Forbes & Ehrhardt 2005)

II.2.3. Lignée bronchique Calu-3

La lignée cellulaire Calu-3 est une lignée immortalisée dérivée après isolement de cellules provenant d'un adénocarcinome bronchique humain chez un patient de 25 ans (Fogh *et al.* 1977). Les cellules Calu-3 exhibent des propriétés similaires aux cellules séreuses et sont actuellement définies comme étant les plus représentatives de l'épithélium bronchique natif, faisant de cette lignée un modèle *in vitro* de choix pour réaliser des études de transport de molécules au niveau bronchique. Cultivée sur supports perméables, la lignée Calu-3 forme des monocouches de cellules polarisées avec un phénotype mixte de cellules ciliées et de cellules sécrétrices, caractéristique de l'épithélium bronchique des voies aériennes inférieures (Shen *et al.* 1994). Plusieurs études ont mis en évidence que la morphologie des cellules Calu-3 cultivées en interface air-liquide était plus proche de l'état *in vivo* que lorsqu'elles étaient cultivées en interface liquide-liquide. En effet, en condition immergée, les cils présents au pôle apical des cellules ciliées ont été observés plus fins et plus courts (Florea *et al.* 2003; Grainger *et al.* 2006). La production de mucus semble également favorisée lorsque les cellules sont cultivées en interface air-liquide (Pezron *et al.* 2002; Fiegel *et al.* 2003; Grainger *et al.* 2006; Florea *et al.* 2002). Ces différences morphologiques sont illustrées Figure 9.

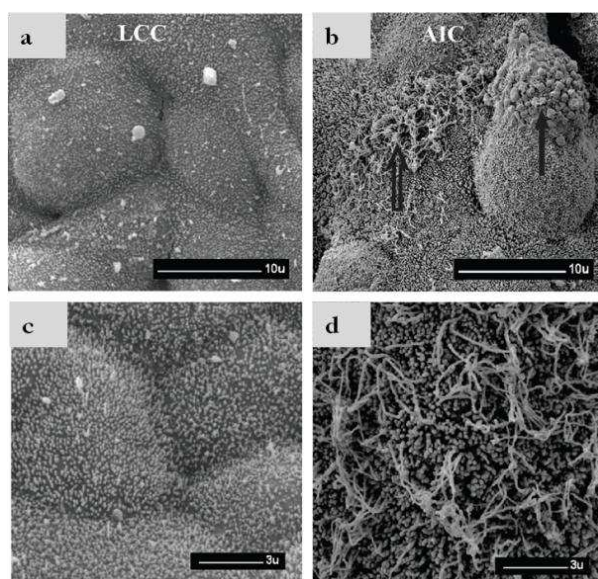


Figure 9. Différences morphologiques des cellules Calu-3 cultivées sur systèmes Transwell® selon le mode de culture utilisé et observées en microscopie électronique à balayage (MEB). (a,c) Culture immergée (liquide-liquide, LCC) avec présence de microvillosités courtes et fines. (b,d) Culture en interface air-liquide (AIC) avec mise en évidence d'une population hétérogène de microvillosités courtes et de cils plus étendus. La présence de mucus est indiqué avec la flèche pleine sur l'image b. (Grainger *et al.* 2006)

Dans une moindre mesure, mais au même titre que la lignée 16HBE14o-, les cellules Calu-3 ont tendance à se développer en épaisseur (1-5 couches de cellules) lorsqu'elles sont exposées à l'air (Grainger *et al.* 2006; Stentebjerg-Andersen *et al.* 2011). La lignée Calu-3 exprime un grand nombre de protéines intervenant dans les complexes jonctionnels intercellulaires majeurs, tels que les jonctions serrées, les desmosomes et les zonula adherens (Forbes 2000). En particulier, les cellules Calu-3 mettent en place des jonctions serrées fonctionnelles, apparaissant en motifs continus au niveau des espaces intercellulaires entre deux cellules adjacentes (Winton *et al.* 1998; Wan *et al.* 2000; Pezron *et al.* 2002; Ehrhardt *et al.* 2002). La lignée Calu-3 exprime également nombre des protéines et transporteurs présents dans l'épithélium bronchique natif (Ehrhardt *et al.* 2002; Florea *et al.* 2003; Haghi *et al.* 2010; Vllasaliu *et al.* 2011; Babu *et al.* 2004; Bridges 2012). Une corrélation entre des données de perméabilité *in vitro* et d'absorption *in vivo* chez le rat a été démontrée par Mathias *et al.* (2002). Ces auteurs ont évalué la perméabilité de l'épithélium pulmonaire Calu-3 vis-à-vis de nombreux composés différant par leur propriétés physico-chimiques (taille, charge, degré d'hydrophobie) et par leur mode de transport (passif ou actif). Ils ont établi une corrélation linéaire entre le logarithme des constantes d'absorption déterminées chez le rat et le logarithme des perméabilités testées sur le modèle Calu-3. En se basant sur cette relation, les auteurs ont ainsi estimé que les molécules ayant un coefficient de perméabilité $>5.10^{-7}$ cm/s à travers le modèle *in vitro* seraient totalement absorbées au niveau pulmonaire, celles avec un coefficient de perméabilité $<2.10^{-7}$ cm/s seraient absorbées à 50%, et les molécules peu perméables et/ou les macromolécules avec des coefficients de perméabilité $<0,1.10^{-7}$ cm/s ne seraient pas absorbées à plus de 10%. Il a également été démontré que plus les molécules sont lipophiles, plus celles-ci sont aptes à traverser les barrières Calu-3 et présentent donc des perméabilités élevées (Mathias *et al.* 2002; Grainger *et al.* 2006). Dans le cas des molécules hydrophiles, leur taux de transport est inversement proportionnel à leur masse moléculaire (Mathias *et al.* 2002; Foster *et al.* 2000), comme illustrée dans la Figure 10.

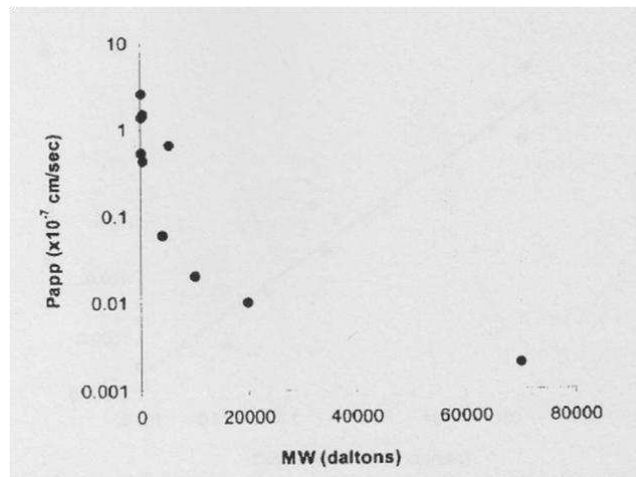


Figure 10. Représentation des coefficients de perméabilité (P_{app}) de molécules hydrophiles à travers les cellules Calu-3 en fonction de leur poids moléculaire (MW). Molécules hydrophiles testées : ^3H -mannitol, ^3H -acide para-amino hippurique, théophylline, caféine, ^{14}C -bromure de tétraméthylammonium, sodium-fluorescéine, jaune lucifer, inulin, FITC-dextrans de différents poids moléculaires. (Mathias *et al.* 2002)

En regroupant la plupart des caractéristiques essentielles de l'épithélium natif – phénotype pseudostratifié avec présence de jonctions serrées séparant les cellules en un pôle apical et un pôle basolatéral, expression de transporteurs et de systèmes d'efflux, et sécrétion de mucus - la lignée Calu-3 semble être le modèle de lignée le plus pertinent d'épithélium bronchique pulmonaire humain.

II.3. Méthodes de caractérisation des modèles *in vitro* d'épithélium

Afin d'obtenir des résultats exploitables, il est fondamental de pouvoir définir et reproduire les performances et caractéristiques essentielles du modèle cellulaire utilisé (Gstraunthaler & Hartung 2003). La vérification de l'intégrité du modèle de barrière épithéliale utilisé est essentielle lorsque celui-ci est exploité pour des études de transport. Les trois techniques les plus communément utilisées pour estimer les propriétés de barrière des cellules épithéliales sont la mesure de la résistance trans-épithéliale (TEER), la perméabilité aux molécules hydrophiles et la microscopie. L'évaluation de la qualité d'un modèle d'épithélium passe également par la caractérisation de ses propriétés métaboliques, grâce à différentes techniques de biologie moléculaire et de biochimie qui permettent de définir l'expression de marqueurs spécifiques.

II.3.1. Technique électrique

La mesure de la résistance trans-épithéliale (TEER) est une technique utilisée en routine pour estimer l'intégrité d'un modèle *in vitro* d'épithélium. La TEER développée mesurée de part et d'autre des cellules épithéliales est liée à la diffusion d'ions au niveau des espaces intercellulaires, reflétant ainsi la fonctionnalité des jonctions serrées entre cellules adjacentes (Godfrey 1997). Les

barrières épithéliales développent ainsi une résistance d'autant plus forte que la perméabilité aux ions est faible. La société WPI (World Precision Instruments) a été la première à développer un appareillage adapté pour la mesure de TEER en systèmes type Transwell® en commercialisant l'EVOM (Epithelial Voltohmmeter) et les électrodes STX2 (Figure 11).

Les électrodes STX2 sont composées d'une double paire d'électrodes Ag/AgCl disposées de chaque côté de l'épithélium. Un voltage (U) est appliqué aux deux électrodes, et le courant mesuré (I) est converti en résistance (R) selon la loi d'Ohm ($R=U/I$).

La TEER correspond à cette valeur de résistance mesurée à travers l'épithélium (R_E) à laquelle est soustraite la résistance de la membrane de l'insert en absence de cellules (R_M), et est exprimée en fonction de la surface (S) de l'épithélium selon la formule suivante:

$$TEER (\Omega.cm^2) = (R_E - R_M) \times S \quad \text{Equation (1)}$$

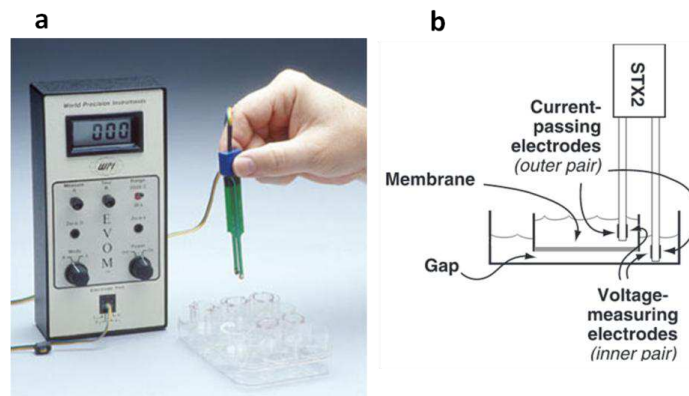


Figure 11. Appareillage pour la mesure de résistance transépithéliale en systèmes de culture type Transwell®. (a) Photographie de l'appareillage EVOM™ et du système d'électrodes de chez WPI Inc. **(b)** Schéma de principe de disposition des électrodes STX2. (<http://www.wpiinc.com>)

La mesure de TEER est une technique simple, rapide, non-invasive et permet de réaliser des mesures points par points pendant toute la durée de la culture. Néanmoins, cette technique de mesure est fortement dépendante de nombreux paramètres tels que les conditions de culture (LCC ou AIC) (Grainger *et al.* 2006), le type et le revêtement de surface des membranes support (Lo *et al.* 1999), la nature et composition du milieu nutritif, ou encore la densité cellulaire ensemencée (Geys *et al.* 2007). Tous ces paramètres diffèrent d'un laboratoire à l'autre et expliquent la grande variabilité inter-laboratoire observée dans la littérature. En effet des valeurs de TEER allant de 100 à 2500 $\Omega.cm^2$ ont été reportées pour la lignée Calu-3. Le positionnement manuel des électrodes et la température à laquelle sont effectuées les mesures (Tavelin *et al.* 2002) peuvent également être la source d'une variabilité entre différentes études conduites au sein d'un

même laboratoire. Néanmoins, la plupart des études montrent que la TEER mesurée sur les Calu-3 cultivées en condition LCC est généralement plus élevée (900-2300 $\Omega\cdot\text{cm}^2$) qu'en AIC (350-700 $\Omega\cdot\text{cm}^2$). Aucune valeur de résistance épithéliale n'est disponible pour les poumons humains natifs, néanmoins des valeurs de TEER ont été publiées chez le lapin atteignant les 260-300 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ (Bhat *et al.* 1993; Rojanasakul *et al.* 1992), plus proches des valeurs obtenues en AIC.

II.3.2. Etudes de perméabilité aux petites molécules hydrophiles

Une méthode complémentaire d'évaluation de l'intégrité d'un modèle d'épithélium est l'étude de la perméabilité des barrières épithéliales aux molécules hydrophiles, connues pour traverser faiblement les épithéliums par transport passif. Ce type de transport à travers l'épithélium peut à la fois avoir lieu à travers les cellules (transport transcellulaire) et à travers les jonctions serrées (transport paracellulaire). Néanmoins, les molécules hydrophiles ne sont pas, ou très peu distribuées au sein des membranes cellulaires lipophiles, leur transport à travers l'épithélium se restreignant donc essentiellement à la voie paracellulaire. Le taux de transport de ces marqueurs de transport paracellulaire doit en principe décroître avec le temps en culture, puis atteindre un taux de transport minimal lorsque les jonctions serrées sont entièrement mises en place au sein de l'épithélium.

Les calculs de perméabilité s'effectuent en déposant le composé à étudier dans le compartiment donneur des systèmes perméables (le plus souvent au niveau de la surface apicale des cellules) (Figure 12). Après incubation, l'analyse des contenus du compartiment receveur permet de déterminer l'intensité du transport du composé d'un pôle à l'autre de l'épithélium pulmonaire, ainsi que sa vitesse.

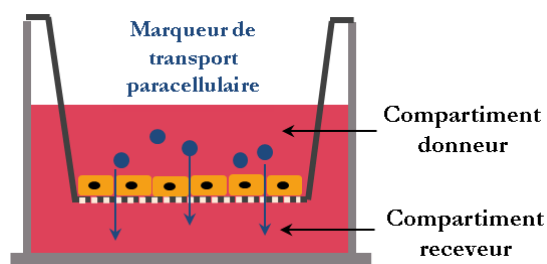


Figure 12. Schéma de principe des études de perméabilité en systèmes perméables du type Transwell®.

Ce transport est exprimé sous la forme d'un coefficient de perméabilité apparent (P_{app}), déterminé expérimentalement à partir de l'accroissement linéaire, en fonction du temps, de la concentration (Equation (2.1)) ou de la quantité (Equation (2.2)) du composé dans le

compartiment receveur. Les P_{app} s'expriment en cm.s^{-1} et sont calculés selon les relations suivantes (issues de la loi de Fick simplifiée) :

$$P_{app} = \left(\frac{dC}{dt} \right) \left(\frac{V}{A C_0} \right) \quad \text{Equation (2.1)}$$

ou

$$P_{app} = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \left(\frac{1}{A C_0} \right) \quad \text{Equation (2.2)}$$

où dC/dt et dQ/dt le flux linéaire de marqueur du compartiment donneur vers le compartiment receveur, V le volume dans le compartiment receveur, A la surface de l'épithélium et C_0 la concentration initiale de marqueur déposé dans le compartiment donneur.

De nombreuses molécules sont communément utilisées comme marqueurs de transport paracellulaire des épithéliums, telles que le mannitol ou le sucrose marqués au carbone 14 (^{14}C) ou au tritium (^3H), les dextrans marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), la fluorescéine sodium (Flu-Na), ou encore le jaune Lucifer. La sensibilité de détection offerte par le comptage radioactif à l'aide de compteurs à scintillation est nettement supérieure à celle des spectrofluorimètres de fluorescence et permet donc d'améliorer la quantification dans les cas où le passage à travers l'épithélium est très faible. De plus, la présence d'un fluorophore lié de manière covalente peut conduire à un changement des propriétés chimiques de la molécule d'intérêt (masse, charge, hydrophobie), pouvant affecter sa perméabilité. Néanmoins, peu de laboratoires possèdent les appareillages et autorisations nécessaires pour la manipulation de produits radioactifs, contrairement aux spectrofluorimètres de fluorescence aisément accessibles.

In vitro, les valeurs de P_{app} obtenues pour le marqueur de référence mannitol sont généralement de l'ordre de $1 \text{ à } 10 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ pour la lignée bronchique Calu-3 (Forbes & Ehrhardt 2005; Pezron *et al.* 2002; Stentebjerg-Andersen *et al.* 2011; Mathias *et al.* 2002; Winton *et al.* 1998; Wang *et al.* 2011). Il existe cependant de nombreuses contradictions dans la littérature quant à l'impact des conditions de culture sur la perméabilité de ces traceurs de référence. Selon certaines études, le mode de culture (AIC ou LCC) n'influe pas de façon significative sur la perméabilité (Ehrhardt *et al.* 2002; Fiegel *et al.* 2003), alors que d'autres affirment le contraire (Cooney *et al.* 2004; Grainger *et al.* 2006).

Cette perméabilité aux molécules hydrophiles, majoritairement transportées par la voie paracellulaire, dépend de la présence effective des jonctions serrées au sein des monocouches épithéliales et peut être reliée aux valeurs de TEER mesurées tel qu'illustré Figure 13. Une

tendance nette est observée sur ce graphique : au fur et à mesure que la TEER augmente, la perméabilité des marqueurs hydrophiles diminue jusqu'à un certain seuil de valeur de TEER, au delà duquel la perméabilité de l'épithélium se stabilise ($\sim 300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ pour la lignée Calu-3). Cette relation inversement proportionnelle entre le P_{app} et la TEER a été démontré par de nombreux auteurs (Mathias *et al.* 2002; Stentebjerg-Andersen *et al.* 2011; Grainger *et al.* 2006; Ehrhardt *et al.* 2002; Fiegel *et al.* 2003; Florea *et al.* 2003; Patel *et al.* 2002; Pezron *et al.* 2002).

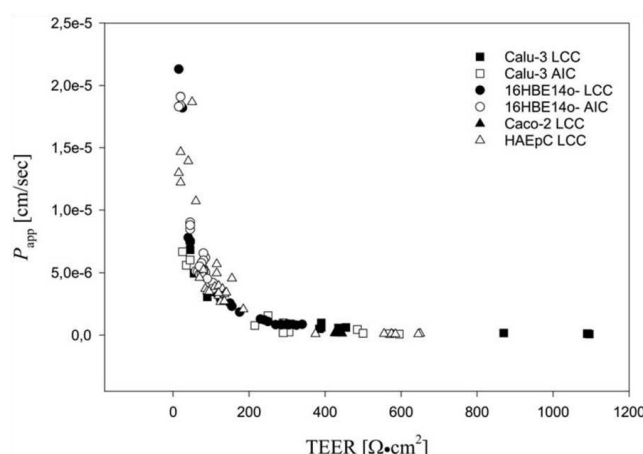


Figure 13. Interdépendance des coefficients de perméabilité (P_{app}) de la fluorescéine et les valeurs de résistance transépithéliale (TEER) mesurées. Comparaison de différents modèles humains d'épithélium (lignées bronchiques Calu-3 et 16HBE14o-; lignée intestinale Caco-2; cellules primaires alvéolaires HAEpC), cultivés en condition liquide-liquide (LCC) ou à l'interface air-liquide (AIC). (Steimer *et al.* 2005)

II.3.3. Techniques d'imagerie

La caractérisation des modèles *in vitro* d'épithélium est également effectuée à l'aide de techniques d'observations microscopiques, intéressantes aussi bien pour évaluer la morphologie cellulaire que l'intégrité des épithéliums.

La microscopie optique est sans nul doute la technique la plus simple d'utilisation puisqu'à l'aide d'un simple microscope optique inversé, elle permet de visualiser les tapis cellulaires directement dans les puits de culture (Figure 14), à condition que le support utilisé pour la culture soit suffisamment transparent. Cette technique ne permet cependant qu'un suivi macroscopique à l'échelle de la cellule (résolution $0,2 \mu\text{m}$), mais est utilisée de manière systématique pour suivre l'établissement de la confluence et s'avère également très utile pour estimer la viabilité cellulaire après coloration à l'aide de bleu de Trypan.

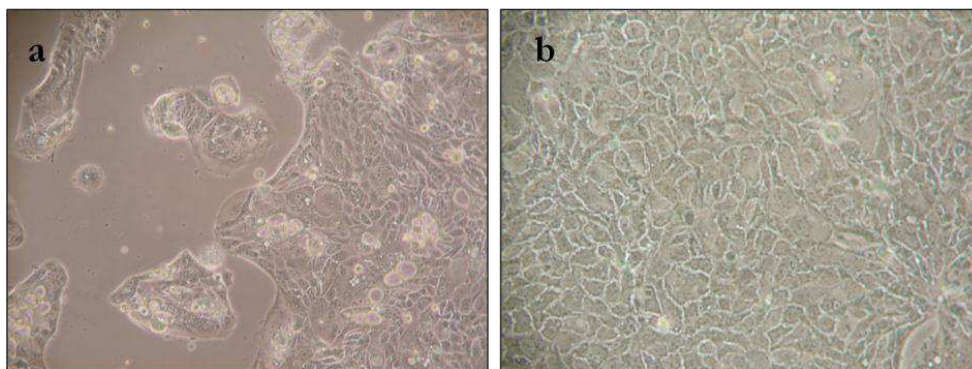


Figure 14. Photographies de cultures Calu-3 observées au microscope optique.
Tapis cellulaires (a) non confluent et (b) confluent.

La résolution nettement supérieure atteinte par *la microscopie électronique* permet d'obtenir des images à l'échelle de la molécule et de mettre en évidence des structures moléculaires non visibles à l'aide de la microscopie optique.

On distingue la *microscopie électronique en transmission (MET)* qui permet l'observation de coupes ultrafines d'échantillons (60 à 100 nm) en utilisant un faisceau d'électrons à haute tension pour illuminer l'échantillon. Ce faisceau traverse l'échantillon et les atomes qui le constituent en produisant différentes sortes de rayonnements. Les électrons transmis sont alors analysés par le détecteur, qui traduit le signal en image contrastée. Cette technique permet d'observer des organites intracellulaires ou de localiser des structures moléculaires (protéines, acides nucléiques) à l'aide de marqueurs spécifiques grâce à une résolution de l'ordre de 0,1 nm. Elle a notamment permis de mettre en évidence l'expression par la lignée Calu-3 de protéines intervenant dans les complexes jonctionnels, ou encore la présence de granules sécrétrices de mucus (Figure 15) (Florea *et al.* 2003; Mathias *et al.* 2002; Foster *et al.* 2000; Shen *et al.* 1994; Grainger *et al.* 2006). Cette technique requiert néanmoins un prétraitement lourd de l'échantillon, qui doit à la fois conserver sa structure et être conducteur pour laisser passer le faisceau d'électrons. Plusieurs étapes de coloration, déshydratation, coupes à l'ultramicrotome et métallisation sont en effet nécessaires avant d'observer l'échantillon.

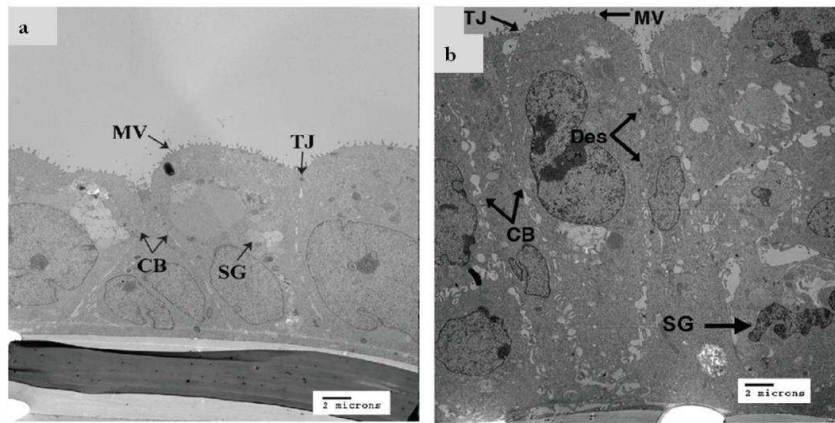


Figure 15. Images de microscopie électronique à transmission (MET) de monocouches de cellules Calu-3 cultivées en (a) LCC ou (b) AIC. Mise en évidence d'un tapis cellulaire plus épais, pseudostratifié dans le cas d'une culture AIC. Localisation de granules sécrétrices (SG), jonctions serrées (TJ), microvillosités (MV), desmosomes (DES) et jointures entre cellules adjacentes (CB). (Grainger *et al.* 2006)

La microscopie électronique à balayage (MEB) utilise quant à elle un fin faisceau d'électrons, émis par un canon à électrons. Des lentilles électromagnétiques permettent de focaliser le faisceau sur l'échantillon. L'interaction entre les électrons et l'échantillon provoque la formation d'électrons secondaires de plus faible énergie. Ils sont amplifiés, détectés puis convertis en un signal électrique. Ce processus est réalisé en chaque point de l'échantillon par un balayage du microscope. L'ensemble des signaux permet de reconstruire la typographie de l'échantillon et de fournir une image en relief, avec une résolution de l'ordre du nm. La préparation des échantillons est également très contraignante, ceux-ci devant être fixés, colorés, déshydratés et devant subir un traitement pour devenir conducteur. Cette technique a permis de différencier la morphologie des cellules Calu-3 cultivées en LCC ou AIC (Florea *et al.* 2003; Grainger *et al.* 2006) en mettant notamment en évidence la présence de cils aux pôles apicaux (cf Figure 8 et Figure 9), ou encore, comme illustré en Figure 16, de caractériser le dépôt de microparticules polymériques délivrées par aérosolisation sur le modèle Calu-3 (Fiegel *et al.* 2003).

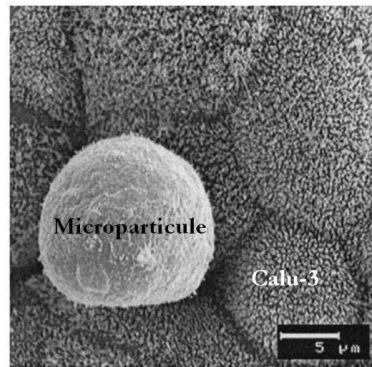


Figure 16. Image de microscopie électronique à balayage (MEB) mettant en évidence une microparticule polymérique présente à la surface d'une monocouche Calu-3 cultivée en système Transwell®.
(Fiegel *et al.* 2003)

Une meilleure compréhension de la distribution ou de la localisation de biomarqueurs et protéines différentiellement exprimés au sein des épithéliums peut être atteinte grâce aux techniques d'**immunofluorescence** (ou immunomarquage fluorescent). Celles-ci sont fondées sur le principe de la détection d'antigènes au moyen d'anticorps, marqués avec un agent fluorescent. La détection se fait grâce à l'utilisation d'un **microscope à épifluorescence** ou d'un **microscope confocal à balayage laser**. En microscopie confocale, un faisceau laser illumine ponctuellement une petite surface de l'échantillon sur toute son épaisseur. Les fluorophores contenus dans le champ illuminé, sont excités et émettent de la fluorescence. Un diaphragme (pinhole) filtre le signal de fluorescence. Seule l'information issue du plan focal arrive sur le détecteur. Cette technique permet de faire une reconstruction 3D d'un échantillon en faisant l'acquisition de plusieurs coupes optiques en z , contrairement à l'épifluorescence qui ne permet de faire des acquisitions que sur une très faible épaisseur de l'échantillon. La microscopie confocale possède l'immense avantage de pouvoir caractériser des structures à la fois de surface mais également intracellulaires.

La microscopie de fluorescence est une technique puissante pour examiner l'intégrité et les éventuels changements des propriétés de barrière des modèles *in vitro* d'épithélium. Certaines structures cellulaires caractéristiques peuvent être marquées directement à l'aide d'agents fluorescents qui vont s'accumuler dans des régions spécifiques. Par exemple, les noyaux cellulaires peuvent être marqués à l'aide d'agents intercalants des acides nucléiques comme le DAPI ou l'iodure de propidium, et les membranes cellulaires à l'aide de phospholipides fluorescents. L'observation de la distribution des filaments d'actine marqués à la phalloïdine-rhodamine est également fréquemment employée pour observer l'homogénéité des tapis cellulaires en formation (Figure 17). Les filaments d'actine sont en effet des composants essentiels du cytosquelette et jouent un rôle important dans la génération et le maintien de la

morphologie cellulaire. Le marquage des tapis cellulaires avec la phalloïdine est également utilisé comme méthode indirecte pour étudier l'intégrité des jonctions serrées, la distribution de l'actine intracellulaire ayant été corrélée aux changements de propriétés des jonctions serrées (Anderson & Van Itallie 1995; Balda & Matter 1998). L'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre des protéines appartenant aux complexes des jonctions serrées reste cependant la méthode la plus spécifique pour caractériser les jonctions serrées au sein d'un modèle d'épithélium, et notamment les anticorps dirigés contre la protéine zona occludens-1 (ZO-1) ou l'occludine. Enfin, Vllasaliu *et al.* (2011) ont utilisé cette technique pour révéler la distribution de mucus aux pôles apicaux des cellules Calu-3 en ciblant spécifiquement deux glycoprotéines appartenant à la famille des mucines (Figure 18).

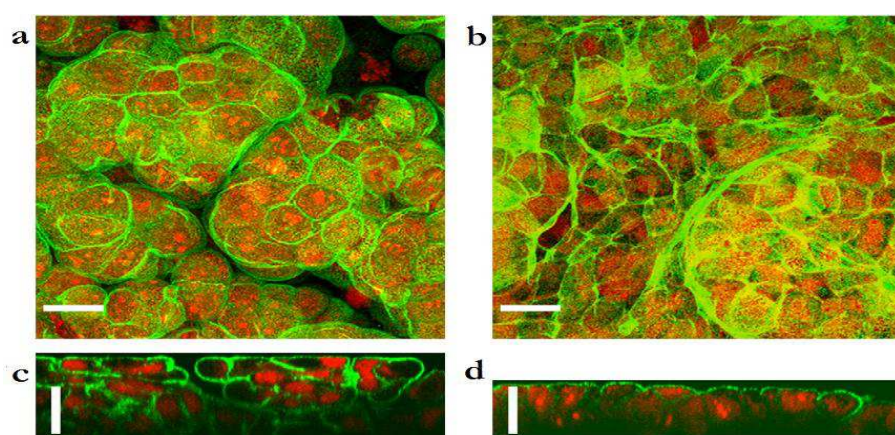


Figure 17. Images confocales de tapis cellulaires Calu-3 cultivées en condition AIC (à gauche) ou LCC (à droite). (a, b) Projections des coupes focales xy représentant la totalité de l'épaisseur des tapis cellulaires. (c,d) Coupes xz des tapis cellulaires. Marquage de l'actine avec AlexaFluor488-phalloïdine (canal vert), marquage des noyaux cellulaires avec iodure de propidium (canal rouge). Les barres représentent 20 μm.
(Stentebjerg-Andersen *et al.* 2011)

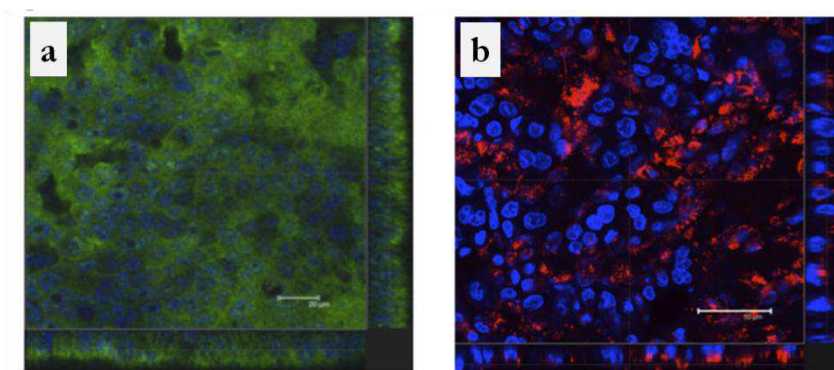


Figure 18. Images confocales mettant en évidence la présence de mucus à la surface apicale de tapis cellulaires Calu-3. Immunomarquage des noyaux cellulaires (canal bleu), (a) des mucines MUC-1 (canal vert), (b) des mucines MUC 5A (canal rouge). Les barres représentent 20 μm.
(Vllasaliu *et al.* 2011)

II.3.4. Techniques de biologie moléculaire et immunologiques

Différentes techniques de biologie moléculaire et immunologiques sont employées pour déterminer l'expression transcriptionnelle et/ou protéique de différents constituants spécifiques, comme des enzymes, des transporteurs et des récepteurs intervenant dans les mécanismes de transport.

Parmi ces techniques, on retrouve la PCR (Polymerase Chain Reaction) qui permet, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'obtenir rapidement, par amplification enzymatique, une quantité importante et exploitable d'un fragment d'ADN ou d'ARN. Elle permet ainsi de déterminer l'expression de gènes spécifiques. Deux techniques principales d'immunochimie permettant la détection de protéines spécifiques sont ensuite très souvent exploitées. La première est le western blot (ou immunoblot) qui consiste dans un premier temps à séparer les protéines d'un échantillon selon leur taille sur un gel d'électrophorèse, puis les transférer sur membrane de nitrocellulose ou de polyfluorure de vinylidène, et enfin les détecter à l'aide d'anticorps spécifiques. La deuxième est l'immunoessai et tout particulièrement l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

Ces techniques ont ainsi permis à Babu *et al.* (2004) de montrer l'augmentation de la production de protéines anti-inflammatoires (IL-8) et de protéines anti-infectieuses (lysosyme) par les cellules Calu-3 exposées à des agents infectieux. Toujours sur le modèle Calu-3, Mura *et al.* (2011a) ont évalué l'influence des charges de surface de différentes nanoparticules sur la production de mucus. Aucune différence de production de mucine MUC5A n'a été détectée après quantification par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), ce qui a été confirmé par l'absence d'expression favorisée du gène correspondant, après extraction des ARNm puis amplification par PCR. Enfin, ces méthodes ont également permis de mettre en évidence l'expression par la lignée Calu-3 de certains transporteurs : le transporteur OCT (Mukherjee *et al.* 2012), ou les protéines d'efflux Pgp (Hamilton *et al.* 2001a) et MRP1 (Hamilton *et al.* 2001b).

II.4. Utilisation de la lignée Calu-3 pour des applications biopharmaceutiques

Aujourd'hui relativement bien caractérisée, la lignée Calu-3 fait l'objet d'études croissantes depuis ces vingt dernières années en servant de modèle d'épithélium pulmonaire pour de nombreuses applications dans le domaine de la délivrance de biomolécules thérapeutiques. De nombreuses recherches réalisées sur le modèle Calu-3 sont consacrées à l'étude de nouvelles stratégies de délivrance de molécules thérapeutiques au niveau pulmonaire. On peut citer par exemple les promoteurs d'absorption (Seki *et al.* 2011; Lewis *et al.* 2013) pour améliorer la perméabilité aux protéines ou le développement de gels mucoadhésifs pour prolonger leur temps de résidence et contrôler leur libération au niveau pulmonaire (Nazar *et al.* 2013; Li *et al.* 2006; Witschi & Mrsny 1999). De nombreuses études ont également été conduites pour étudier les caractéristiques de formulations inhalées et analyser l'interaction entre les particules et l'épithélium respiratoire en utilisant le modèle Calu-3 (Fiegel *et al.* 2003; Bur *et al.* 2009; Grainger *et al.* 2009). De nombreux véhicules particuliers sont également évalués sur le modèle Calu-3 pour déterminer leur éventuelle toxicité au niveau pulmonaire, comme par exemple des nanoparticules de chitosane formulées sous forme de poudre pour inhalation (Grenha *et al.* 2007), des nanoparticules polymériques de PLGA aux différentes charges de surface (Mura *et al.* 2011b), ou encore des microsphères poreuses de PLGA recouvertes d'albumine (Kim *et al.* 2011). Les phénomènes d'internalisation dans les cellules épithéliales pulmonaires et de perméabilité de nombreuses nanoparticules ont également été étudiés sur le modèle Calu-3 (Teijeiro-Osorio *et al.* 2009; Vllasaliu *et al.* 2012; Madlova *et al.* 2009; Vllasaliu *et al.* 2010; Fiegel *et al.* 2003). Enfin, la lignée Calu-3 a également été utilisée comme modèle d'étude du métabolisme de protéines au niveau pulmonaire. Baginski *et al.* (2012) ont par exemple étudié la stabilité de la calcitonine au contact des différentes enzymes produites par le modèle Calu-3 (trypsine, chymotrypsine, élastase) pour améliorer la compréhension du rôle joué par ces enzymes sur la faible biodisponibilité de cette molécule au niveau pulmonaire.

III. Microsystèmes et cellules : les « cells-on-chip »

Les systèmes *in vitro* conventionnels de culture cellulaire que nous venons d'évoquer ont montré leur utilité pour l'étude de mécanismes cellulaires et des phénomènes physiologiques impliqués dans certaines situations pathologiques. Par ce biais, ces systèmes ont fait évoluer la recherche pharmaceutique, en permettant d'utiliser des modèles cellulaires capables de reproduire en partie l'environnement cellulaire natif comme les barrières biologiques, telles que les barrières épithéliales (rénale, pulmonaire, hépatique, intestinale) ou endothéliales (vasculaire, barrière hémato-encéphalique), et permettant ainsi d'accélérer le screening de molécules à visée thérapeutique candidates. Cependant, ces systèmes atteignent leur limite lorsqu'il s'agit de recréer les interactions intracellulaires parfois très complexes qui participent à la régulation des comportements cellulaires *in vivo* (Ghaemmaghami *et al.* 2012). Dans leur environnement naturel, les cellules sont en effet exposées à de nombreux signaux qui varient continuellement en fonction du temps et de l'espace, et qui régulent leur structure, leur fonction ainsi que leur maintien au sein des tissus. Ces signaux comprennent les facteurs solubles comme les cytokines et protéines sécrétées par des cellules voisines, mais également les interactions biochimiques et mécaniques avec la matrice extracellulaire, et les contacts directs entre cellules adjacentes (El-Ali *et al.* 2006). Ces systèmes conventionnels sont également très peu adaptés pour les études de criblage à haut débit (Primiceri *et al.* 2013), à cause de leur coût élevé et des manipulations lourdes qu'ils demandent.

Les progrès récents dans le domaine de la génomique et de la protéomique, des matériaux biocompatibles, et l'émergence de la microfluidique dans le domaine de la biologie cellulaire ont conduit au développement de nouveaux outils miniaturisés dédiés à la culture de cellules, les « cells-on-chip ». La microfluidique se définit comme le domaine qui étudie et manipule des écoulements de faibles quantités de fluides dans des géométries de taille micrométrique (Whitesides 2006). Elle peut être considérée à la fois comme une science (étude du comportement des fluides dans des microcanaux) et une technologie (fabrication de dispositifs microfluidiques pour les laboratoires sur puces). Grâce à cette science récemment appliquée à la biologie, les limitations rencontrées avec les systèmes conventionnels de culture peuvent être facilement contournés. Les besoins primordiaux requis pour la culture cellulaire et les améliorations pouvant être apportées par les « cells-on-chip », en exploitant les avantages de la microfluidique, sont résumées dans le Tableau 2. La « culture cellulaire microfluidique » autorise ainsi le contrôle de flux de liquides à de très faibles échelles dans des géométries parfaitement définies, ce qui facilite la manipulation et l'analyse simultanées, de l'échelle de la cellule unique

jusqu'à la culture de tissus, et ce sur des puces intégrées et parfois entièrement automatisées (Mehling & Tay 2014).

Besoins	Culture cellulaire conventionnelle	« Cells-on-chip » et microfluidique
Contrôle de la température et des gaz (CO ₂ et O ₂)	Grands volumes manipulés de fluides limitent des changements trop fréquents	Petits volumes manipulés permettent un contrôle dynamique
Ajout de nutriments et élimination des déchets et métabolites	Renouvellement manuel des milieux nutritifs	Renouvellement des milieux nutritifs précis, continu ou transitoire
Stimulation des cultures avec des molécules actives ou protéines et imagerie simultanée	Difficilement faisable	Faisable
Parallélisation des essais	Très peu adapté, excessivement lourd	Haute capacité
Automatisation	Emploi de robots de traitement de fluides nécessaire et très coûteux	Haute capacité, en format compact et très bon marché

Tableau 2. Apport des « Cells-on-chip » et de la microfluidique sur les besoins primordiaux requis pour la culture cellulaire : comparaison avec les systèmes conventionnels de culture.

Nous venons d'évoquer très succinctement les avantages principaux que peut apporter la microfluidique sur la culture cellulaire. Dans ce qui suit, nous détaillons plus en avant les nombreuses performances que les « cells-on-chip » sont capables d'atteindre grâce aux avantages de la miniaturisation. Nous expliquons ensuite que certaines contraintes sont à prendre en compte pour leur fabrication. Enfin, pour situer plus précisément le contexte dans lequel s'inscrivent ces travaux de thèse, nous essayons, à travers de nombreux exemples tirés de la littérature, d'illustrer les grandes potentialités de ces systèmes pour quelques applications spécifiques. Notamment, nous décrivons dans un premier temps quelques exemples de systèmes conçus pour le criblage à haut débit et les tests de cytotoxicité de molécules thérapeutiques. Nous abordons ensuite les systèmes miniaturisés dans lesquels sont reproduits divers modèles de barrières biologiques destinés à l'étude du transport de molécules thérapeutiques. Enfin, nous terminons avec un état de l'art des différents systèmes microfluidiques dédiés à la recherche sur les poumons.

III.1. Miniaturisation : avantages des « cells-on-chip »

Grâce aux avantages conjoints des techniques de microfabrication (photolithographie, lithographie douce, moulage, etc.) et de la microfluidique, les « cells-on-chip » apportent donc des fonctionnalités particulières que ne possèdent pas les systèmes de culture classiques. Ces techniques permettent la mise au point rapide et économique de systèmes *in vitro* dans lesquels sont facilités la manipulation, le traitement et/ou l'analyse de cellules dans un grand nombre de conditions différentes (Young & Beebe 2010).

Les avantages apportés par la miniaturisation pour la culture de cellules sont en effet nombreux (Primiceri *et al.* 2013; Young & Beebe 2010; El-Ali *et al.* 2006; Mehling & Tay 2014; Weibel & Whitesides 2006) :

- Les dimensions à l'échelle du micromètre, la maîtrise de la structuration des matériaux et la manipulation de fluides offrent un meilleur contrôle spatio-temporel du microenvironnement cellulaire, car plus adapté à l'échelle de la cellule ;
- Les cellules peuvent être organisées en géométries tridimensionnelles, ce qui permet la culture de cellules en structures ressemblant à celles des tissus natifs ;
- En faisant intervenir la microfluidique, il est possible de contrôler l'approvisionnement et le transfert de milieux nutritifs par exemple, ou d'agents chimiques, de manière continue ou séquentielle, tout en permettant d'évacuer les déchets produits par les activités cellulaires. Au sein de canaux microfluidiques, l'écoulement de fluide suit un régime laminaire, du à un nombre de Reynolds faible (<2000). Cet écoulement laminaire permet à des courants adjacents de fluides miscibles, de s'écouler côte à côte à travers les microcanaux, et de se mélanger uniquement par diffusion à l'interface des deux courants. Cette propriété permet par exemple de créer des gradients de concentrations de molécules qui seront exposées aux cellules. Ces technologies offrent également la possibilité d'appliquer des signaux mécaniques sur les cellules, à l'aide de valves intégrées au sein des puces ;
- La manipulation de très faibles volumes de fluides (nanolitres) au sein de géométries de l'ordre de la dizaine ou centaine de microns permet de diminuer la consommation des réactifs ou des analytes parfois onéreux, réduisant ainsi le temps et le coût des analyses ;
- La capacité de parallélisation grâce à l'intégration contrôlée de motifs individuels de petite taille (comme des chambres de culture par exemple) sur un même dispositif facilite la réalisation de nombreux essais en simultané, tout en consommant un nombre réduit de cellules. Le criblage à haut débit est ainsi facilement réalisable ;

- La possibilité d'automatisation permet d'obtenir une meilleure standardisation des conditions expérimentales et de réduire la variabilité entre les expériences. En minimisant l'intervention humaine, elle permet également de réduire les risques de contamination ;
- Enfin, ces systèmes étant fabriqués « à façon », il est possible d'intégrer de nombreux éléments sur un même dispositif comme par exemple un couplage avec un élément permettant une analyse (séparation, détection, pré-concentration), ou une lyse cellulaire. Ce type de systèmes miniaturisés, intégrant au sein d'une même puce différentes opérations classiquement réalisées indépendamment dans les laboratoires, sont regroupés sous le terme de « laboratoire sur puce » ou « Lab-On-a-Chip » (LOC). L'exemple fictif d'un tel système est illustré dans la Figure 19, dans lequel l'expérimentateur serait capable de réaliser sur un même dispositif les différentes étapes de culture cellulaire, sélection et tri de cellules, lyse cellulaire, observation puis analyse d'éléments cellulaires et moléculaires.

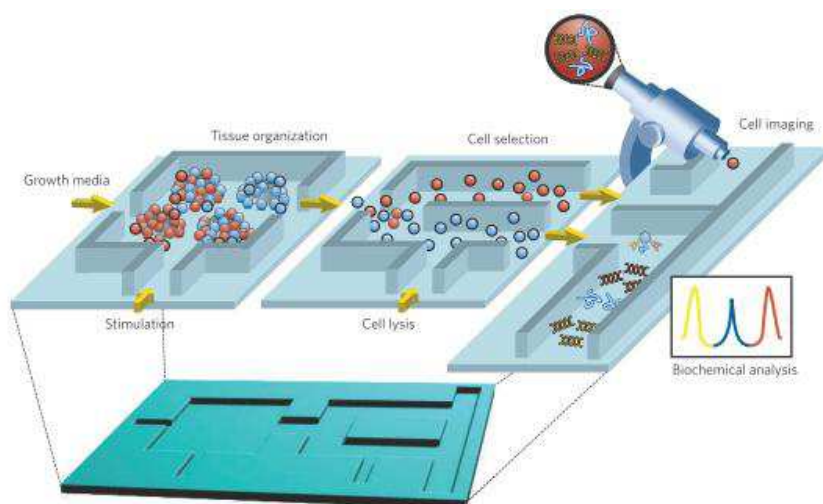


Figure 19. Exemple d'un laboratoire sur puce regroupant différentes opérations d'études de cellules.
(El-Ali *et al.* 2006)

III.2. Contraintes de fabrication spécifiques aux « cells-on-chip »

Le choix des matériaux est d'une importance capitale lorsqu'il s'agit de concevoir des systèmes dédiés à la culture de cellules puisqu'ils doivent répondre aux contraintes essentielles requises pour la culture cellulaire. En effet, de tels systèmes doivent être capables de préserver l'intégrité cellulaire, tout en favorisant le contrôle de la croissance et de l'environnement cellulaire. Les matériaux au contact des cellules doivent ainsi être biocompatibles, permettre l'adhérence cellulaire, être compatibles avec les techniques de stérilisation pour minimiser les contaminations, et avoir des propriétés physico-chimiques compatibles avec les milieux de culture cellulaire sans

relarguer de composés éventuellement toxiques (Primiceri *et al.* 2013). Plusieurs matériaux polymères remplissant ces critères ont été utilisés pour la conception des « cells-on-chip » (Lee 2013): le poly(méthylméthacrylate) (PMMA) (Petronis *et al.* 2006), le polycarbonate (PC) (Skolimowski *et al.* 2012), ou encore le poly-diméthylsiloxane (PDMS). Certaines cellules comme les cellules cardiaques ou nerveuses, qui présentent des propriétés électriques, ont été cultivées sur des puces en semiconducteurs-métal oxydé (CMOS chips) (Hierlemann *et al.* 2011).

Le matériau phare pour la fabrication des « cells-on-chip » reste cependant de loin le PDMS (Duffy *et al.* 1998; McDonald & Whitesides 2002; Sia & Whitesides 2003), polymère particulièrement modulable et perméable aux échanges gazeux (O_2 , CO_2) nécessaires au maintien du métabolisme cellulaire. Optiquement transparent et possédant une faible autofluorescence, il est particulièrement adapté à la détection d'absorbance ou de fluorescence. Le PDMS étant facilement déformable et élastique, il permet par exemple d'intégrer de manière aisée des vannes microfluidiques en utilisant la déformation des canaux. La fabrication de microsystèmes en PDMS est de plus relativement simple d'exécution et peut aisément être réalisée sur la paillasse sans besoin de matériel spécifique de microfabrication. Les différentes étapes de fabrication d'un dispositif microfluidique en PDMS est présenté Figure 20. Le PDMS liquide mélangé à un agent réticulant est versé sur un moule microstructuré, puis chauffé (70 °C) afin d'obtenir une réplique du moule en élastomère (PDMS réticulé). Le PDMS peut mouler des structures de hautes résolutions de l'ordre du micron.

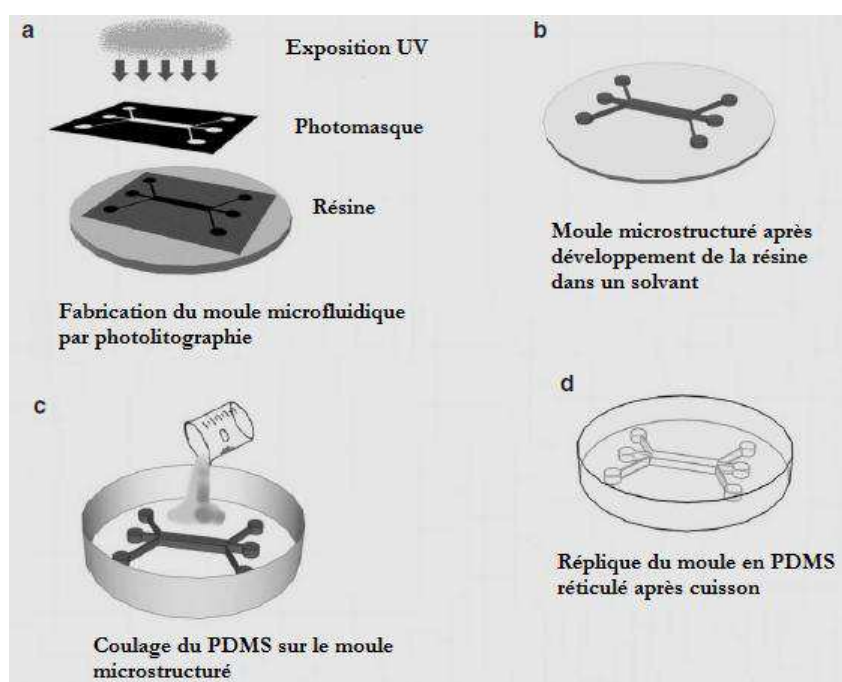


Figure 20. Méthode de fabrication d'un dispositif microfluidique en PDMS par photolithographie douce.
Adapté de Yeon & Park (2007)

Le PDMS présente néanmoins un certain nombre d'inconvénients, dont le principal est d'être un matériau hydrophobe, ce qui entraîne l'adsorption non spécifique de molécules hydrophobes, et notamment des protéines et lipides contenus dans les milieux de culture cellulaires (Mehling & Tay 2014). Le caractère poreux et perméable aux gaz du PDMS peut également conduire à des phénomènes d'évaporation rapide. Pour maintenir des conditions de culture stables et réduire les phénomènes d'adsorption il est alors nécessaire de remplacer régulièrement le milieu de culture ou bien le perfuser en continu. Pour éviter le phénomène d'adsorption, la surface du PDMS peut être rendue hydrophile par oxydation plasma (d'air, d'azote ou d'O₂) qui produit des groupements silanols Si-(OH) à sa surface (Weibel & Whitesides 2006). Ce type de traitement est réversible et permet également de coller le PDMS sur du verre (Ziolkowska *et al.* 2010), sur un autre polymère ou sur une autre couche de PDMS afin d'obtenir des dispositifs multicouches (Anwar *et al.* 2011). Ensuite, un PDMS insuffisamment réticulé peut conduire au relargage de molécules toxiques pour les cellules (Melin & Quake 2007). Enfin, les propriétés de surface du PDMS non traité n'étant que peu favorables à l'adhésion cellulaire, il est souvent nécessaire de revêtir sa surface à l'aide de protéines d'adhésion comme la fibronectine, le collagène ou par un mélange protéique à base de gélatine.

III.3. Les « cells-on-chip » comme outils pour le développement pharmaceutique

Les applications visées par ce type de dispositifs sont extrêmement nombreuses et l'intérêt ici n'est pas d'en faire une liste exhaustive, mais d'illustrer par quelques exemples assez différents, les grandes potentialités de ces systèmes, ainsi que leurs limites. Par exemple, de nombreux systèmes sont consacrés à l'étude de la cellule à l'échelle individuelle (« single-cell analysis »), permettant d'isoler une cellule unique (ou des cellules uniques en réseau) dans une microstructure destinée à son analyse et/ou à son traitement. Ces systèmes peuvent être regroupés sous le terme de « biopuces à cellules » et sont développés pour améliorer par exemple les opérations de prélèvement, tri, positionnement ou fusion cellulaire, et trouvent tout leur intérêt en particulier dans le domaine du diagnostic clinique. Une recherche importante est également consacrée aux investigations sur les activités cellulaires : croissance, prolifération, métabolisme, transduction de signaux cellulaires, particulièrement dans le domaine de la recherche contre le cancer, des cellules souches, des transferts de gène ou encore en neurologie.

Au travers d'exemples tirés de la littérature, nous nous concentrons ici spécifiquement sur les microsystèmes développés pour des applications pharmaceutiques, en particulier les systèmes microfluidiques basés sur la culture de cellules ou de tissus dédiés à la découverte de médicaments

et à l'évaluation de leur toxicité, à la compréhension de phénomènes pathologiques et à l'étude du transport de molécules à travers des modèles de barrières cellulaires. Certains de ces systèmes intègrent des plateformes de criblage à haut débit, en particulier pour les tests de toxicité. Enfin, une attention toute particulière est portée aux microsystèmes consacrés à la culture de modèles cellulaires pulmonaires.

III.3.1. Criblage à haut débit et tests de toxicité de molécules thérapeutiques

De réelles plateformes de screening à haut débit ont été développées en exploitant le principe des puces à ADN, en ce sens qu'elles intègrent, sur un même microsystème de quelques centimètres carrés, plusieurs centaines de motifs identiques pour y loger des cellules. De tels systèmes ont par exemple été exploités pour le screening de molécules anticancéreuses. Ainsi, Włodkowiec *et al.* (2009) ont développé une plateforme microfluidique en PDMS intégrant une matrice de 440 motifs identiques dans lesquels ont été positionnées et piégées des cellules uniques issues de lignées de cellules leucémiques humaines (Figure 21a). Le positionnement des cellules est réalisé en déposant la suspension cellulaire dans un réservoir en amont de la puce puis par application d'une pression négative en sortie de la puce à l'aide d'un pousse-seringue commandé par ordinateur. Un inducteur de l'apoptose (la staurosporine) a ensuite été perfusé pendant plusieurs heures sur les cellules, en présence de différents marqueurs fluorescents de l'apoptose (SYTO 62) et de l'intégrité des membranes plasmiques (SYTOX green). L'effet cytotoxique de la staurosporine a pu être suivi en temps réel et la mort cellulaire quantifiée après traitement des images obtenues avec un microscope à épifluorescence.

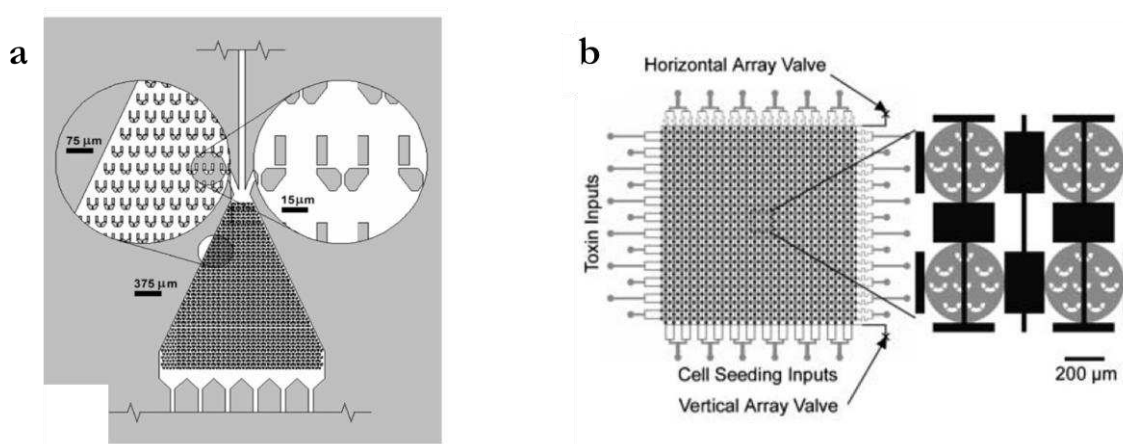


Figure 21. Exemples de systèmes microfluidiques de screening à haut débit développé pour des études de cytotoxicité. (a) Puce en PDMS à 440 motifs identiques pour l'isolement de cellules uniques (Włodkowiec *et al.* 2009), **(b)** Puce hybride PDMS-PDMS-verre à 576 chambres de culture de 400 µm de diamètre. (Wang *et al.* 2007).

Dans le même esprit de parallélisation, Wang *et al.* (2007) ont développé un système hybride PDMS-PDMS-verre renfermant une matrice de 24x24 chambres de culture circulaires (400 µm de diamètre), qui leur a permis de cribler la toxicité d'un panel de cinq toxines sur trois lignées cellulaires différentes (cellules fibroblastiques, épithéliales et endothéliales) sur un même dispositif (Figure 21b). Les multiples vannes intégrées dans ce système permettent de contrôler l'injection et diriger les flux des suspensions cellulaires, et des solutions contenant les toxines. Les différents fluides sont injectés dans le dispositif à l'aide d'une pompe péristaltique connectée à plusieurs tubes connectés à chaque colonne ou ligne de chambres de culture. Les cellules sont ensuite marquées par un marqueur cellulaire afin de visualiser la mort des cellules après avoir été exposées aux différentes toxines, par observation des microchambres de culture en plaçant directement le dispositif sur un microscope à épifluorescence. L'intégration des nombreuses vannes rend néanmoins ce type de dispositif très lourd à fabriquer et certainement à manipuler.

D'autres groupes travaillent sur l'élaboration de microsystèmes, non plus à l'échelle de la cellule unique mais sur des tapis cellulaires cultivés dans des chambres de culture parallélisées, indépendantes les unes des autres. La complexité supplémentaire apportée par l'étape de culture à intégrer au sein de ces systèmes, entraîne de fait une diminution de la capacité de parallélisation comparée aux systèmes à haut débit s'appuyant sur l'étude à l'échelle de la cellule unique. Les fonctionnalités de ce type de dispositifs doivent favoriser un microenvironnement stable pour assurer le maintien et le contrôle continu des cellules. Le design de ces systèmes combine en général un environnement stérile, une capacité de réaliser des essais dans des conditions multiples et un contrôle de la culture sur du long terme.

Ainsi, Sugiura *et al.* (2008) ont développé un dispositif en PDMS multicouches composé de 8 séries de 5 chambres de culture de 1,4 mm de diamètre, chaque série étant reliée à un réservoir commun de milieu prédéfini, et chaque chambre d'une même série étant alimentée indépendamment des 4 autres pour éviter les contaminations croisées (Figure 22a). Cette configuration leur a permis d'évaluer la toxicité de 7 médicaments anticancéreux dont le paclitaxel, le cisplatine ou la doxorubicine, en parallèle sur le même dispositif, en utilisant des cellules HeLa (lignée cellulaire issue d'un carcinome du col de l'utérus). La quantification du développement cellulaire a été évaluée par microscopie de fluorescence après marquage des tapis cellulaires perfusés aux différents anticancéreux (Figure 22b). Ce dispositif apporte une fonctionnalité intéressante puisque la perfusion de l'ensemble des microchambres de culture est effectuée par application d'une simple pression externe au dessus des réservoirs de taille macroscopique, alors que la grande majorité des dispositifs microfluidiques utilisent des pousse-

seringue qui nécessitent d'être connectés à de multiples tubulures pour paralléliser les perfusions. Néanmoins, la formation de bulles lors de la perfusion des chambres de culture a nécessité l'intégration d'une plateforme autour de chaque microchambre de culture pour favoriser l'écoulement uniforme de liquide.

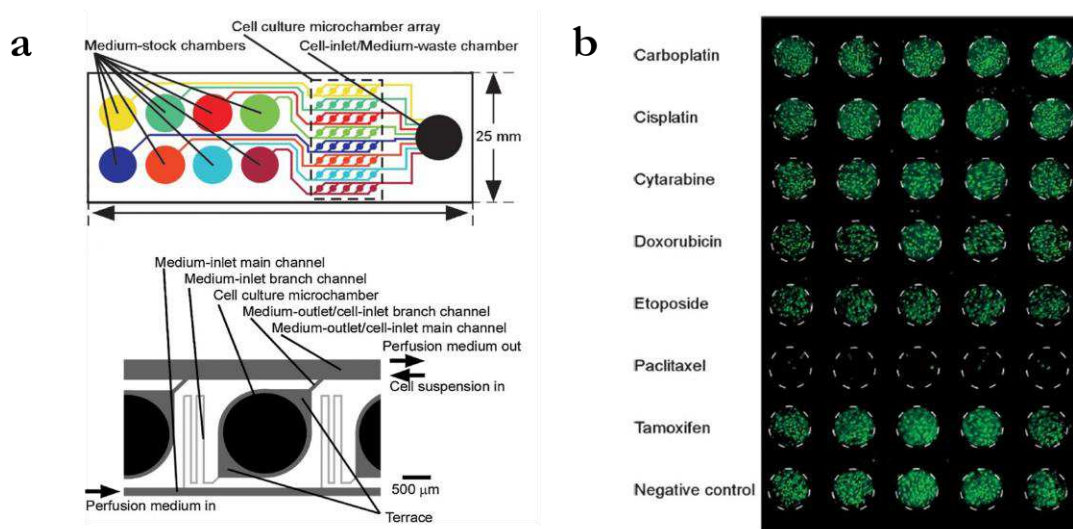


Figure 22. Exemple d'un système microfluidique avec plusieurs séries de microchambres de culture parallélisées. (a) Schéma du dispositif en PDMS; (b) Image en microscopie de fluorescence de la série de microchambres de culture après exposition à différents anticancéreux.
Adapté de Sugiura *et al.* (2008)

Un certain nombre de microsystèmes intègrent des générateurs de gradients de concentration, qui permettent de mieux mimer les conditions d'écoulement hydrodynamique et de transport de masse des liquides (Toh *et al.* 2014). Ces gradients de concentration permettent de diminuer significativement les contraintes de cisaillement dues à l'écoulement du liquide sur les cellules, et assurent une meilleure homogénéité des milieux perfusés sur les cellules. Hung *et al.* (2005) ont exploité cette technique pour générer, perpendiculairement au flux de milieu nutritif, différentes concentrations de milieux sur une série de 10x10 microchambres de culture de 1 mm de diamètre à l'aide d'un pousse-seringue (Figure 23a). Ce type de microsystème trouve tout son intérêt dans les études de toxicité à haut débit en permettant l'analyse de la réponse cellulaire à différents gradients de concentration de produits, avec dans cet exemple le potentiel de pouvoir tester 100 conditions différentes sur un seul et même dispositif. En concevant un dispositif similaire hybride PDMS-verre, avec des chambres de culture de même configuration, Ziolkowska *et al.* (2010) ont démontré la pertinence de cette technologie en évaluant la cytotoxicité d'une molécule modèle appliquée à différentes concentrations sur des cellules alvéolaires A549 cultivées sur un substrat en verre dans 25 microchambres individuelles (Figure 23b).

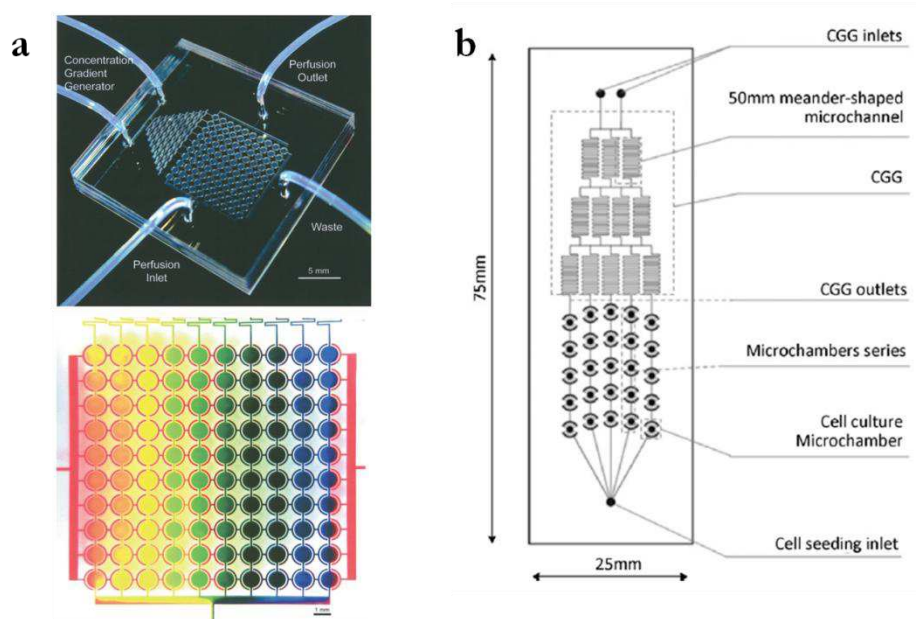


Figure 23. Exemple de microsystèmes intégrant des microchambres de culture en série de 1 mm de diamètre alimentées par un générateur de gradient de concentrations (CGG) microfluidique constitué de multiples canaux en parallèle. (a) (Hung *et al.* 2005) ; (b) (Ziolkowska *et al.* 2010)

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'avènement de la microfluidique et des techniques de microfabrication a permis de voir émerger de nouveaux modèles d'études cellulaires organisés en 3D, avec des niveaux de différenciation et d'organisation tissulaires nettement plus proches de l'environnement cellulaire natif que les cultures 2D obtenues dans les systèmes de culture classiques. Les systèmes miniaturisés offrent ainsi l'opportunité d'aller plus loin dans les investigations et la compréhension des phénomènes physiologiques, en permettant de mimer au plus proche les différentes structures tissulaires retrouvées notamment au sein des organes, structures organisées en architectures bien spécifiques. La culture 3D est rendue possible en cultivant les cellules dans des gels de matrice extracellulaire qui permettent aux cellules de changer de forme, de s'organiser dans l'espace ou de développer des contacts entre cellules adjacentes non favorisés sur les supports solides 2D (Huh *et al.* 2011). A titre d'exemple, un dispositif microfluidique composé d'une puce multiplexe hybride PDMS-verre associée à une autre puce contenant un gradient de concentration a été reporté par Toh *et al.* (2009) pour des tests d'hépatotoxicité. Les hépatocytes sont cultivés dans des microcanaux de 200 μm de large et 1 cm de long, guidés par la présence de micro-piliers qui confinent les cellules au centre de ces canaux pour former des microenvironnements 3D, la perfusion de milieu cellulaire a lieu par les deux côtés bordant les compartiments cellulaires (Figure 24). Composés de 8 canaux parallèles de

culture, ce système a démontré sa capacité à maintenir les hépatocytes fonctionnels à un niveau supérieur aux contrôles réalisés en plaques multipuits dans lesquelles seule une culture 2D est possible. Grâce à l'intégration de 8 microcanaux de culture alimentés en amont par un générateur de gradient de concentration, les auteurs ont évalué simultanément la toxicité à 8 concentrations différentes de 5 médicaments connus pour être hépatotoxiques. Leurs résultats obtenus *in vitro* ont été corrélés à des valeurs hépatotoxiques obtenus sur des modèles animaux. Cet exemple démontre à lui seul les performances qu'il est possible d'atteindre en miniaturisant les modèles cellulaires. Ce type de dispositif reste néanmoins lourd à fabriquer et nécessite un appareillage et matériel adaptés pour sa mise en œuvre. L'utilisation d'un substrat en PDMS rend également difficile l'utilisation d'un même dispositif pour de nombreuses expériences répétées.

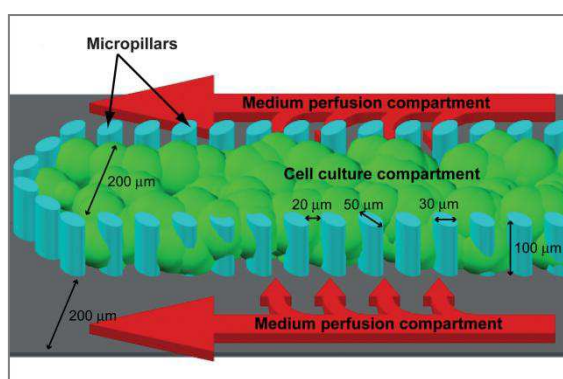


Figure 24. Dispositif microfluidique pour la culture parallélisée de cellules en environnement 3D et tests d'hépatotoxicité. (Toh *et al.* 2009)

Afin de mimer davantage les interactions multi-organes, Sung & Shuler (2009) ont développé un microsystème dans lequel différents types cellulaires représentant les compartiments hépatiques, intestinaux et de la moelle osseuse sont mis en culture 3D dans des microchambres indépendantes mais connectées entre elles par des microcanaux mimant la circulation sanguine. Cette compartimentation a permis de démontrer la pertinence d'un tel modèle, puisque la cytotoxicité d'un précurseur du 5-fluorouracil, un anticancéreux, a été démontré dans ce microsystème vis-à-vis des différents types cellulaires représentatifs du côlon (cellules HTC-116), du foie (cellules hépatiques HepG2/C3A) et de la moelle osseuse (myéloblastes Kasumi-1), après avoir été métabolisé au niveau des cellules hépatiques, phénomène non observé en système classique de culture multipuits sur ces mêmes types cellulaires.

III.3.2. Modèles de barrières cellulaires pour l'évaluation de la perméabilité et du transport de molécules thérapeutiques

Depuis le milieu des années 2000, des progrès considérables et prometteurs ont été réalisés sur la culture de modèles de barrières cellulaires *in vitro*, modèles de plus en plus fidèles aux barrières natives grâce au développement des « cells-on-chip » et l'exploitation des avantages de la miniaturisation. De nombreuses barrières ont été reproduites en systèmes miniaturisés et notamment les barrières intestinale (Kimura *et al.* 2008; Gao *et al.* 2013; Imura *et al.* 2009), rénale (Baudoin *et al.* 2007; Michaelis *et al.* 2012), hémato-encéphalique (BHE) (Booth & Kim 2012; Prabhakarparandian *et al.* 2013; Griep *et al.* 2013), alvéolaire (Nalayanda *et al.* 2010; Huh *et al.* 2007; Huh *et al.* 2010), ou vasculaire (Shao *et al.* 2010; Young *et al.* 2010; Yeon *et al.* 2012). Parce que ces barrières épithéliales ou endothéliales sont la porte d'entrée de molécules étrangères à l'organisme ou les régulateurs du passage des médicaments entre les différents compartiments de l'organisme, (notamment depuis ou vers le compartiment sanguin), un certain nombre de travaux ont été réalisés dans l'espoir d'apporter des outils pertinents pour simplifier et accélérer le criblage de molécules candidats-médicaments lors des phases amont de la recherche pharmaceutique. Ces systèmes n'en sont cependant encore qu'au stade de preuve de concept, et aucun système commercial n'existe à ce jour.

Plusieurs systèmes dédiés à l'évaluation de la perméabilité de ces modèles de barrières vis-à-vis de molécules ont été développés. La plupart d'entre eux sont fabriqués en PDMS et exploitent la configuration des systèmes perméables type Transwell®, en créant des microchambres de culture bi-compartimentées dans lesquelles sont insérées des membranes microporeuses servant de support à la culture des cellules (cf. § II.1.). Certains des microsystèmes décrits ne présentent qu'une seule microchambre de culture, le plus simple d'entre eux (Figure 25a) intégrant simplement 2 microcanaux pour l'alimenter à l'aide d'un pousse-seringue, l'un pour l'apport de milieu nutritif en continu, l'autre pour la circulation des solutions à tester sur un modèle d'épithélium intestinal (Imura *et al.* 2009). En travaillant sur le même modèle d'épithélium, Kimura *et al.* (2008) ont intégré des micropompes et une agitation magnétique *in situ* pilotée par un barreau magnétique externe pour favoriser la circulation du milieu en boucle fermée et maintenir ainsi une distribution uniforme des nutriments et des métabolites produits par les cellules Caco-2. Leur système possède l'atout supplémentaire de pouvoir détecter la fluorescence en temps réel des molécules testées grâce à l'intégration de fibres optiques connectées au canal microfluidique. Ce groupe a ainsi pu mettre en évidence l'activité du transporteur Pgp par quantification du passage de la rhodamine 123, médiée par ce transporteur. Ce système de détection conditionne néanmoins les essais aux seules molécules possédant une fluorescence

intrinsèque ou devant être marquées avec un agent fluorescent pouvant modifier fortement leur propriété et donc la perméabilité du modèle de barrière cellulaire vis-à-vis des molécules testées.

D'autres groupes intègrent également des fonctionnalités supplémentaires à leurs microsystèmes pour améliorer la caractérisation de leur modèle de barrière. Booth & Kim (2012) ont par exemple intégré des électrodes d'Ag/AgCl pour réaliser des mesures de résistance électrique trans-épithéliale (TEER) (Figure 25b). Un modèle de co-culture de cellules endothéliales et d'astrocytes cultivées de chaque côté de la membrane (10 mm²) est reproduite dans ce microsystème, sous perfusion constante à l'aide d'un système de pompes externes. Griep *et al.* (2013) ont également intégré des électrodes de platine dans le but d'aider à la compréhension des mécanismes de perturbation de la barrière hémato encéphalique (BHE) dans le cas des maladies neurodégénératives. Les cellules endothéliales sont cultivées en mode statique jusqu'à l'obtention de la confluence dans des chambres d'environ 0,25 mm². La fonction de barrière est ensuite modulée mécaniquement en exposant le tapis cellulaire à un flux de milieu similaire aux conditions physiologiques, puis chimiquement en perfusant une cytokine pro-inflammatoire (TNF- α).

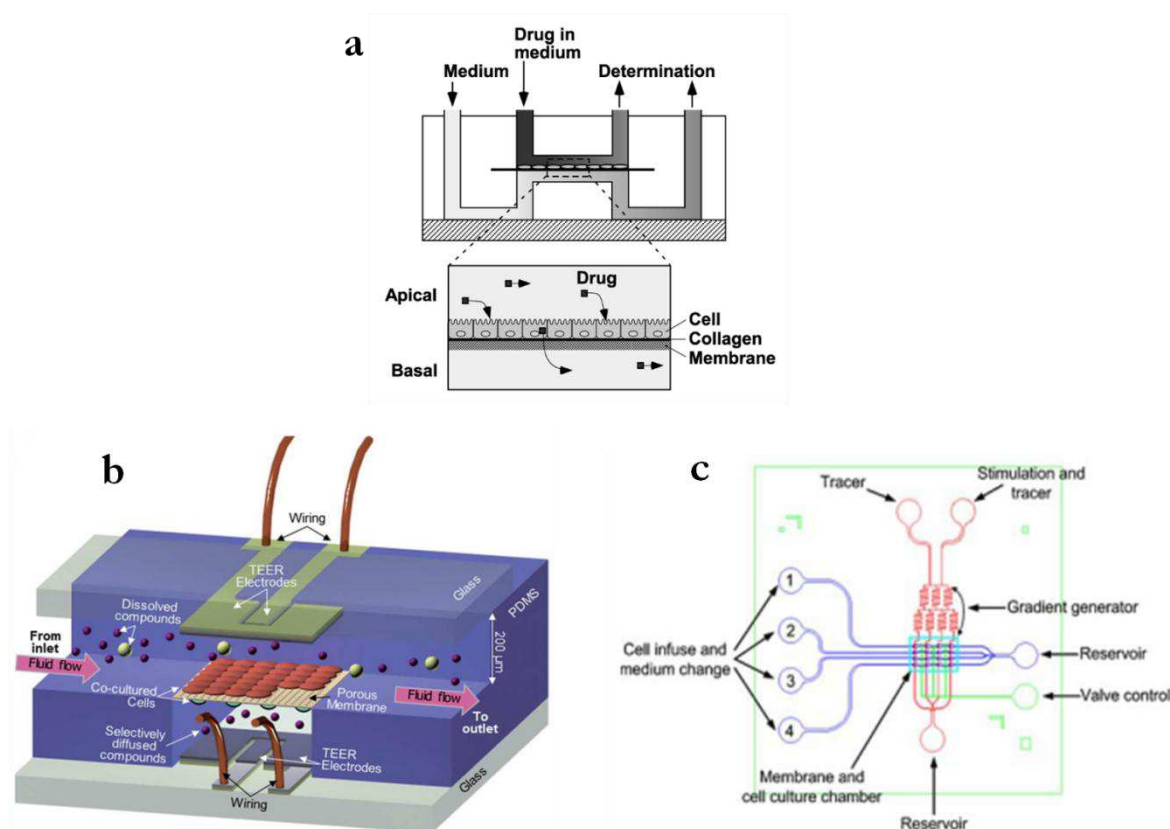


Figure 25. Exemples de « cells-on-chip » développés pour des études de perméabilité à travers des modèles de barrières cellulaires. (a) Imura *et al.* (2009) ; (b) Booth & Kim (2012) ; (c) Shao *et al.* (2010)

Tous ces exemples cités n'intègrent, certes, encore qu'une seule chambre de culture, mais la relative simplicité de fabrication de certains de ces systèmes offre facilement la possibilité d'augmenter le nombre de microchambres de culture en parallèle. Cette capacité de parallélisation est d'ailleurs revendiquée par la plupart des auteurs en question. Pour les systèmes intégrant de multiples fonctions, telles que des électrodes de mesure de résistance par exemple, la multiplication des puits de culture pourrait en revanche devenir beaucoup plus complexe.

Quelques systèmes intègrent d'ores et déjà un nombre plus importants de microchambres sur une même plateforme. Le microsystème développé récemment par *Gao et al. (2013)* est par exemple composé de trois microchambres de culture de 30 mm², créées par l'assemblage de deux blocs de PDMS contenant chacun trois microcanaux pour perfuser les modèles d'épithélium. Des cellules intestinales (Caco-2) sont cultivées sur des membranes en polycarbonate (PC). Cette plateforme de culture, simple dans son concept de fabrication, est connectée à une seconde plateforme de prétraitement (extraction sur phase solide) des échantillons ayant franchis le modèle de barrière et qui est composée de micro-colonnes contenant des particules greffées C18. Cette dernière est ensuite connectée « off-line » à un spectromètre de masse ESI-Q-TOF.

Shao et al. (2010) présentent quant à eux une puce hybride verre-PDMS constituée de 4 séries de 4 chambres de culture de 200 µm de longueur. Des cellules humaines endothéliales (lignée HUVEC) sont injectées dans la puce à l'aide d'une seringue reliée à un tube et sont ensuite cultivées en mode statique jusqu'à l'atteinte de la confluence, en changeant le milieu de culture tous les jours par perfusions. Un générateur de gradient de concentration est utilisé pour perfuser un même composé fluorescent à différentes concentrations, et l'intensité de fluorescence dans le compartiment receveur est détecté ensuite en temps réel par observation des microchambres sous un microscope à fluorescence (Figure 25c). La présence de valves dont la fermeture est assurée par application d'air comprimé assure l'indépendance entre chaque chambre de culture lors de la perfusion des solutions pour les essais de perméabilité. Le design de ce système n'offre pas la possibilité de tester la perméabilité de molécules différentes, mais seulement de la même molécule à différentes concentrations.

Enfin, certaines équipes se sont appliquées à remplacer les membranes microporeuses en polyéthylène téréphtalate (PET) ou PC, très souvent prélevées de systèmes Transwell® pour des raisons de simplicité, par des supports poreux microfabriqués. Par exemple, une équipe a créé des micro-trous de 3 µm de diamètre espacés tous les 10 µm dans un canal en PDMS pour piéger les cellules (*Yeon & Park 2009; Yeon et al. 2012*), mais cette alternative ne favorise pas l'obtention de barrières cellulaires jointives. (*Gel et al. sous presse*) ont intégré entre deux blocs de PDMS des

membranes de COC (cyclic olefin copolymer) contenant un réseau de micropores de 3 à 5 μm obtenus après lithographie.

III.3.3. Modèles pulmonaires miniaturisés

Les modèles pulmonaires *in vitro* miniaturisés développés jusqu'à maintenant ont principalement été conçus dans le but de recréer les mécanismes physiologiques pulmonaires pour améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans les pathologies respiratoires (Skolimowski *et al.* 2012; Bilek *et al.* 2003), notamment la fibrose cystique (ou mucoviscidose), l'asthme ou le syndrome de détresse respiratoire aigu. Ces pathologies sont toutes associées à un surfactant pulmonaire dysfonctionnel, dont les propriétés biochimiques et biophysiques sont altérées à cause de phénomènes d'inflammation et d'infection des voies respiratoires. Ces phénomènes entraînent un endommagement de l'épithélium alvéolaire qui s'accompagne d'une accumulation anormale de fluides au niveau de la lumière des conduits alvéolaires et entraîne une instabilité à l'interface air-liquide. Le surfactant ne pouvant plus jouer son rôle de réducteur de tension de surface, la paroi très fine et non rigide des alvéoles s'affaisse et les fluides accumulés provoquent l'obstruction des conduits alvéolaires par formation de « plugs », qui se déplacent au rythme des cycles inspiration/expiration, et finissent par se rompre en créant la réouverture des conduits alvéolaires (Ghadiali & Gaver 2008; Tavana *et al.* 2009; Kumar Mahto *et al.* 2012). Ce phénomène d'obstruction/réouverture est schématisé Figure 26.

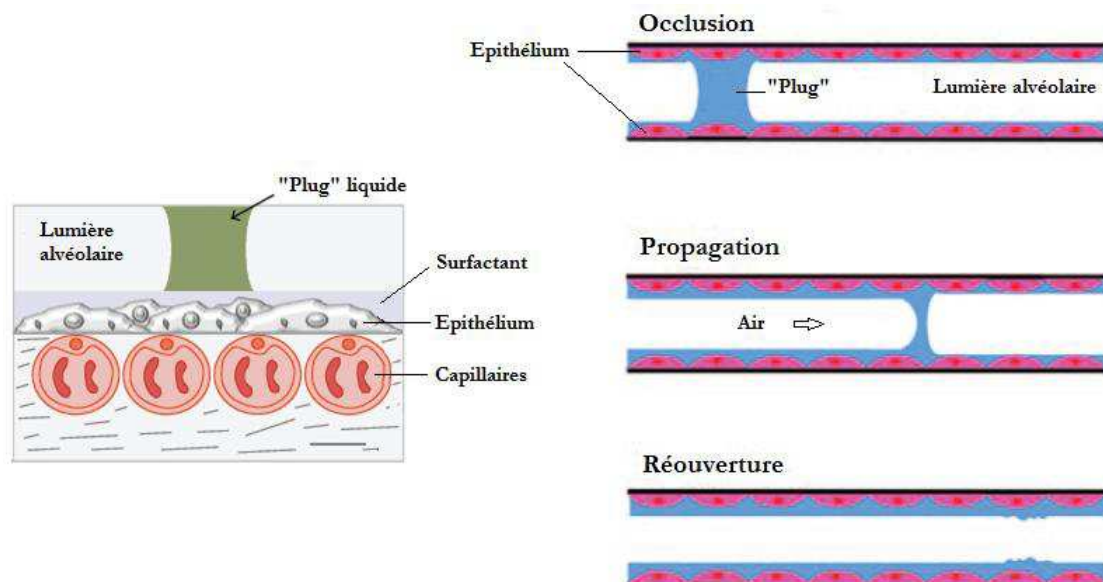


Figure 26. Schématisation de la barrière alvéolo capillaire (à gauche) et du phénomène d'obstruction/réouverture de la lumière des conduits alvéolaires du aux instabilités à l'interface air-liquide (à droite). Adapté de Kumar Mahto *et al.* (2012) et Tavana *et al.* (2009)

Plusieurs équipes ont ainsi travaillé sur la mise au point de systèmes microfluidiques capables d'appliquer des contraintes mécaniques sur des modèles de culture alvéolaires, pour simuler les effets de la ventilation et mimer la formation de ces « plugs » liquides par perfusion concomitante d'air et de liquide dans des microcanaux et observer leur impact sur les modèles de culture (Tavana *et al.* 2010; Tavana *et al.* 2011; Douville *et al.* 2011; Huh *et al.* 2007). Leurs systèmes exploitent les propriétés modulables du PDMS. Un modèle d'étude de la cicatrisation pulmonaire après blessure a également été mis au point par Felder *et al.* (2012).

Dans une autre optique, une équipe a développé une plateforme microfluidique en PDMS-PDMS-verre pour la culture de modèles alvéolaires simples à long terme (lignée A549) (Nalayanda *et al.* 2010). Leur système, illustré Figure 27, intègre deux chambres de culture circulaire et une membrane microporeuse en PET 0,4 μm servant de support à la culture est intégrée entre les deux couches de PDMS. Les cellules sont cultivées sous perfusion continue de milieu de culture côté basolatéral avec un pousse-seringue. Ce système a été utilisé pour comparer les caractéristiques morphologiques des tapis alvéolaires et leur capacité à produire du surfactant, en comparant deux modes de culture (en interface air-liquide et en condition liquide-liquide). Une étude de perméabilité des barrières alvéolaires A549 à la fluorescéine sodium, un marqueur de perméabilité paracellulaire, a également été conduite dans ce microsystème (Nalayanda *et al.* 2009).

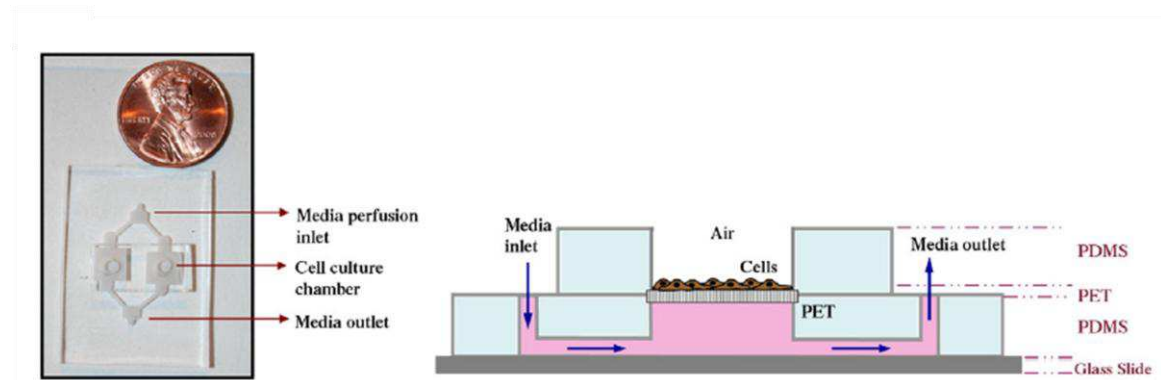


Figure 27. Exemple d'un microsystème PDMS-PDMS-verre avec insertion d'une membrane microporeuse pour la culture en interface air-liquide d'un modèle de barrière alvéolaire (cellules A549).

Huh *et al.* (2007) ont été les premiers à reproduire de près l'espace alvéolaire et l'interface air-liquide épithélial au sein d'un microsystème. Un modèle d'épithélium alvéolaire humain (cellules primaires alvéolaires SAECs) a été exposé à des flux de liquide côté basolatéral et à des flux d'air côté apical afin de simuler les conditions de la respiration. En générant volontairement des « plugs » liquides dans des microcanaux de la taille des conduits respiratoires natifs, ils ont ainsi

pu évaluer la viabilité des épithéliums suite aux phénomènes d'obstruction/réouverture des conduits provoqués par le passage de ces « plugs » liquides. Ce dispositif a par la suite été amélioré en reproduisant de très près la barrière alvéolo-capillaire, en créant ce qu'ils ont baptisé un « poumon sur puce ». La barrière alvéolo-capillaire a été créée en co-cultivant des cellules humaines alvéolaires et des cellules endothéliales pulmonaires de chaque côté d'une membrane microporeuse (Huh *et al.* 2010). Grâce à l'intégration de deux chambres latérales au sein desquelles est appliqué un vide (Figure 28), le système reproduit les changements de pression et la tension mécanique que subit le tissu pulmonaire pendant la respiration. L'utilisation d'une membrane en PDMS flexible permet notamment de reproduire la distorsion mécanique de l'interface alvéolo-capillaire. Sous la contrainte mécanique, les cellules épithéliales restent viables pendant plusieurs semaines, augmentent leur production de surfactant et renforcent leur intégrité et fonction de barrière.

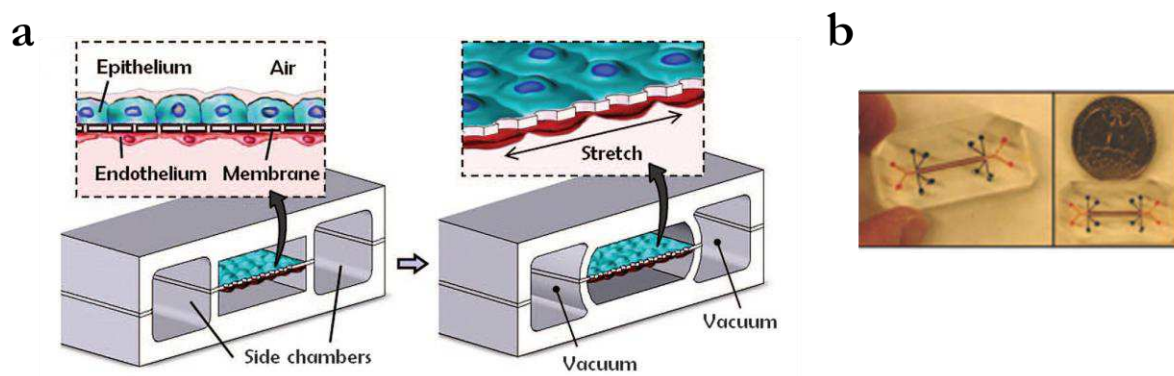


Figure 28. Modèle alvéolo-capillaire reproduit dans un système microrofuidique en PDMS capable de mimer les mouvements de la respiration. (a) Schéma de principe et (b) photographie du microsystème. (Huh et al. 2010)

Il est possible de reproduire dans ce microsystème des réponses inflammatoires complexes observées dans un poumon vivant. En effet, les auteurs ont mis en évidence que l'exposition des épithéliums à un médiateur pro-inflammatoire entraînait l'activation des endothéliums sous-jacents, qui recrutent alors les neutrophiles présents dans le compartiment basolatéral et les laissent passer dans le compartiment alvéolaire. Les auteurs ont également démontré que ce système pouvait mimer la réponse cellulaire innée suite à une infection bactérienne. Après introduction de bactéries du côté épithélial et de globules blancs du côté vasculaire, ces derniers traversent la membrane poreuse pour aller détruire les pathogènes, reproduisant leur comportement naturel dans les alvéoles. Ce dispositif présente également un grand intérêt pour

des études toxicologiques puisqu'il a été démontré que les effets du stress mécanique augmentaient la toxicité de nanoparticules de silice et accentuaient la réponse inflammatoire.

A travers tous ces exemples, nous avons vu qu'un certain nombre de systèmes microfluidiques sont dédiés à la reproduction de barrières épithéliales ou endothéliales, dans un but de tests de transport de molécules. Certains d'entre eux sont assez aboutis et permettent d'apporter grand nombre de fonctionnalités (intégration d'électrodes pour la mesure de résistance bioélectrique des tapis cellulaires, visualisation *in situ* des molécules perfusées et de leur impact sur les tapis cellulaires, création d'un microenvironnement très proche de l'état *in vivo*). Toutes ces fonctionnalités entraînent néanmoins une complexification de la fabrication de ces systèmes et par la même une diminution de la capacité de parallélisation. Les quelques exemples présentés concernant les systèmes pulmonaires se concentrent tous sur la barrière alvéolaire, et pour un petit nombre d'entre eux seulement, sur une application de transport de molécules. Le modèle A549 alvéolaire très souvent utilisé dans ces systèmes, est un modèle qui comme nous l'avons évoqué dans la partie précédente, ne se différencie pas en épithélium jointif ce qui limite la pertinence de ces systèmes s'ils sont utilisés à des fins d'évaluation de transport de molécules à travers la barrière alvéolaire. Certaines équipes ont développé des modèles de co-culture pour rendre plus pertinent leur modèle de barrières, mais les systèmes décrits dans ce cas n'ont pas été développés pour cette application spécifique.

PARTIE EXPERIMENTALE

La partie bibliographique de ce manuscrit nous a permis de présenter l'intérêt que représente la voie pulmonaire pour l'administration des biomédicaments, molécules thérapeutiques issues des biotechnologies et en essor constant depuis les années 80. Les communautés médicale et pharmaceutique cherchent en effet à développer des modes d'administration nouveaux pour pallier les nombreux problèmes engendrés par l'administration par voie parentérale, qui sont principalement des problèmes d'inconfort pour le patient et des contraintes de fabrication lourdes pour assurer notamment une stérilité absolue. En parallèle, l'émergence de la microfluidique et son application dans le domaine de la biologie permet aujourd'hui le développement d'outils de plus en plus performants pour aider au développement de nouvelles molécules thérapeutiques. Parmi ces outils, les « cells-on-chip » se présentent comme de véritables plateformes d'aide à la compréhension de mécanismes biologiques indispensables à la mise au point de molécules thérapeutiques. Parmi ces mécanismes, le transport de ces molécules au travers des barrières biologiques est une étape importante dans le développement d'un médicament.

Cette thèse s'inscrit dans cette thématique globale et a eu pour objectif de concevoir un microsystème dédié à l'évaluation du transport de molécules à travers la barrière pulmonaire permettant d'accélérer les tests *in vitro* de sélection de candidats biomédicaments. En exploitant certains avantages de la miniaturisation, ce système a été spécifiquement conçu pour reproduire *in vitro* un modèle de barrière épithéliale pulmonaire, au travers duquel il est possible de cribler le passage de biomolécules formulées ou non, pour évaluer leur capacité à être administrées par voie pulmonaire. Par sa simplicité de fabrication et l'absence d'appareillage microfluidique associé, ce microsystème se focalise avant tout sur une grande capacité de parallélisation.

Les travaux expérimentaux s'articulent autour de trois chapitres. Dans le chapitre 1, nous abordons d'abord la mise au point de notre modèle de barrière épithéliale pulmonaire. La lignée bronchique Calu-3 a été choisie pour sa capacité reconnue à mimer les caractéristiques morphologiques de l'épithélium pulmonaire natif. Les conditions de culture permettant l'obtention de véritables barrières jointives ont été sélectionnées à l'échelle macroscopique, en systèmes perméables Transwell® classiquement utilisés pour les tests de transport de molécules à travers les barrières biologiques. Nous décrivons ensuite en détail la conception, la fabrication et

la mise au point du microsystème. La génération la plus aboutie de ce microsystème a été utilisée pour caractériser les barrières épithéliales Calu-3 cultivées à l'échelle miniaturisée, en évaluant leurs caractéristiques morphologiques.

Le chapitre 2 permet d'appréhender l'application spécifique visée par ce microsystème, grâce à des essais préliminaires réalisés pour évaluer la capacité de passage à travers la barrière pulmonaire Calu-3 de deux types de nanoparticules et d'une biomolécule, l'insuline.

Enfin, le chapitre 3 est dédié à l'étude d'une biomolécule modèle, l'insuline, pour laquelle une méthode de quantification par électrophorèse capillaire a été envisagée. Différentes stratégies ont été abordées. Cette dernière partie expérimentale a été effectuée dans une optique future d'apporter une fonctionnalité supplémentaire au microsystème présenté dans ce manuscrit, à savoir un couplage avec une puce analytique pour réaliser une quantification en ligne par séparation électrocinétique des biomolécules testées sur les modèles de barrière pulmonaire Calu-3 miniaturisés.

Les travaux réalisés pendant cette thèse sont le fruit d'une collaboration débutée en octobre 2010, entre l'Institut Galien Paris-Sud (IGPS, CNRS UMR8612) auquel j'appartiens, et le Laboratoire de Photonique et de Nanostructures (LPN, CNRS UPR20).

Le caractère pluridisciplinaire de ce projet a nécessité l'apport scientifique et technologique de trois équipes de recherche, grâce auxquelles trois disciplines majeures ont pu être abordées durant cette thèse:

- biologie et formulation de médicaments, équipe « Vectorisation pharmaceutique des molécules fragiles » de l'IGPS : travaux de culture cellulaire et formulation de nanoparticules ;
- chimie analytique, équipe « Protéines et Nanotechnologies en Sciences Séparatives » de l'IGPS : études en électrophorèse capillaire ;
- technologie, groupe « Nanotechnologie et Dispositifs Microfluidiques » du LPN : conception et fabrication du microsystème.

Chapitre 1 :

Fabrication, mise au point et caractérisation du microsystème

Ce chapitre présente dans une première partie les travaux consacrés à l'étude du comportement des cellules Calu-3 choisies pour mimer la barrière pulmonaire sous différentes conditions de culture et à la caractérisation du modèle en systèmes perméables Transwell®. Cette étude préliminaire à l'échelle macroscopique a eu pour objectif principal de sélectionner des paramètres de culture appropriés pour l'obtention de barrières épithéliales bien formées et caractéristiques de l'épithélium bronchique natif. Les caractéristiques obtenues en systèmes Transwell® ont alors servi de point de départ pour la culture à l'échelle microscopique, puis de contrôle à chaque étape du développement du microsystème afin d'en valider ses performances. Ces travaux préliminaires ont également permis de définir les méthodes de caractérisation pour évaluer l'intégrité des barrières cellulaires formées en micropuits.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous détaillons les différentes mises au point et optimisations de la microfabrication ayant permis d'aboutir au microsystème dans sa version définitive, organisé en deux configurations distinctes. La première est destinée à la culture de la barrière épithéliale pulmonaire, la deuxième à la mise en œuvre de tests de transport de molécules.

Enfin, la troisième et dernière partie de ce chapitre démontre, à travers un article publié dans le journal « Biomedical Microdevices », la pertinence de ce microsystème comme outil *in vitro* pour l'évaluation du transport de molécules à travers la barrière épithéliale pulmonaire. Une caractérisation des barrières cellulaires formées dans le microsystème a été effectuée, et les performances ont été comparées aux systèmes Transwell®. La qualité des barrières cellulaires a été évaluée grâce à trois types d'études :

- Suivi de l'établissement de la confluence par observation en microscopie optique, mesure de la résistance trans-épithéliale (TEER) et marquage fluorescent des filaments d'actine cellulaires ;
- Détermination de la distribution des jonctions serrées par immunomarquage fluorescent d'une protéine appartenant au complexe des jonctions serrées, la protéine ZO-1 ;

- Evaluation de l'intégrité des tapis cellulaires par mesure de la perméabilité des tapis cellulaires vis-à-vis du marqueur paracellulaire ^{14}C -sucrose, petite molécule hydrophile ne traversant que très peu les épithéliums bien formés.

I. Optimisation des conditions de culture à l'échelle macroscopique en systèmes perméables

L'étude des paramètres critiques influençant l'établissement de tapis cellulaires Calu-3 confluents et jointifs a dans un premier temps été conduite, en évaluant l'impact du milieu de culture, de la concentration d'ensemencement et de la nature des membranes microporeuses composant les inserts Transwell®.

I.1. Optimisation des conditions de culture

I.1.1. Milieu de culture et lot de sérum

Comme nous l'avons évoqué dans la partie introductive de ce manuscrit, les conditions de culture ont un impact déterminant sur le développement cellulaire, et notamment le milieu de culture, dont la composition doit souvent être spécifique pour un type cellulaire donné. Ce milieu joue le rôle d'environnement biochimique pour les cellules, en apportant des éléments essentiels à leur maintien en culture, tels que des sels minéraux pour respecter l'osmolarité du sérum physiologique, du glucose (source de carbonate et d'énergie), des acides aminés (source d'azote) et des vitamines. Afin de favoriser la prolifération des cellules en culture, ce milieu nutritif est supplémenté en facteurs de croissance, de différenciation ou d'attachement grâce à l'ajout de sérum de veau fœtal (Fetal Bovine Serum, FBS) (Young & Beebe 2010). On parle alors de milieu complet. La composition d'un FBS peut être très variable d'un lot à l'autre, les quantités de facteurs et hormones de croissance qu'il contient pouvant convenir à certains types cellulaires et moins à d'autres. Il est donc primordial de sélectionner un lot de FBS favorable à la croissance du type cellulaire utilisé, pour assurer une culture stable sur le long terme ainsi que des performances intra-laboratoire répétables.

Les résultats présentés dans ce manuscrit sont issus d'expériences réalisées sur des cellules Calu-3 cultivées avec différents lots de FBS, qui seront, si l'impact en a été décidé comme significatif, précisés lors des commentaires et discussions. Au cours de cette thèse, deux lots principaux de FBS ont été utilisés pour la culture des cellules Calu-3. Les premières expériences de ces travaux de thèse ont été réalisées avec un lot de FBS que nous appellerons par la suite « lot de référence »,

avec lequel des conditions de culture adaptées en systèmes Transwell® avaient été optimisées avant mon arrivée au laboratoire. Une réévaluation du FBS pour la culture des cellules Calu-3 s'est cependant par la suite avérée nécessaire, le lot de référence étant épuisé. Au total, quatre lots de FBS ont ainsi été évalués sur la lignée Calu-3.

La prolifération des cellules dans le milieu contenant le lot de référence (FBS n°12) a été comparée à celle des cellules cultivées avec les nouveaux lots de sérum proposés (FBS n°04, FBS n°06, FBS n°10 et FBS n°17) selon le protocole décrit en Annexe A.1.2. Les cellules Calu-3 ont étéensemencées en plaques 24 puits à 30 000 cellules/cm² et cultivées avec chacun des lots de FBS.

L'observation au microscope des cellules cultivées avec le lot FBS n°04 a montré une croissance très irrégulière, avec un taux de débris cellulaires et de cellules en suspensions plus importants qu'avec les autres lots malgré les changements réguliers du milieu de culture. Les premiers comptages réalisés pour ce lot de sérum ayant confirmé ces observations visuelles, ce lot de FBS a rapidement été écarté.

Les courbes de croissance obtenues pour l'ensemble des autres lots de FBS restants sont illustrées Figure 29. Elles sont exprimées ici sous la forme de courbes polynomiales d'ordre 2, afin de visualiser au mieux les phases exponentielles de chaque courbe. Cette phase exponentielle correspond à la phase pendant laquelle les cellules se divisent à une vitesse maximale et constante, au vu de leur potentiel génétique et des conditions de culture qu'on leur impose. Lors de cette phase, la population cellulaire double en nombre, et ce à intervalles de temps réguliers, appelés temps de doublement. Elle apparait après une phase de latence pendant laquelle les cellules s'adaptent à leur environnement sans se diviser.

Les bons coefficients de détermination ($r^2 > 0.95$) obtenus rendent compte d'une bonne régularité de la prolifération cellulaire en fonction du temps, quelque soit le lot de FBS testé. Cette caractéristique a également été observée lors de l'entretien des cellules en flasques. Les vitesses de croissance varient cependant nettement d'un lot de FBS à l'autre. La croissance des Calu-3 est en effet très nettement favorisée avec le lot de FBS n°06, et dans une moindre mesure avec le lot FBS n°10, indiquant probablement que ces deux lots de FBS sont plus riches en facteurs de croissance. Les cellules Calu-3 semblent en revanche réagir de manière similaire aux lots FBS n°17 et n°12, leur courbe de croissance respective étant non loin d'être superposables.

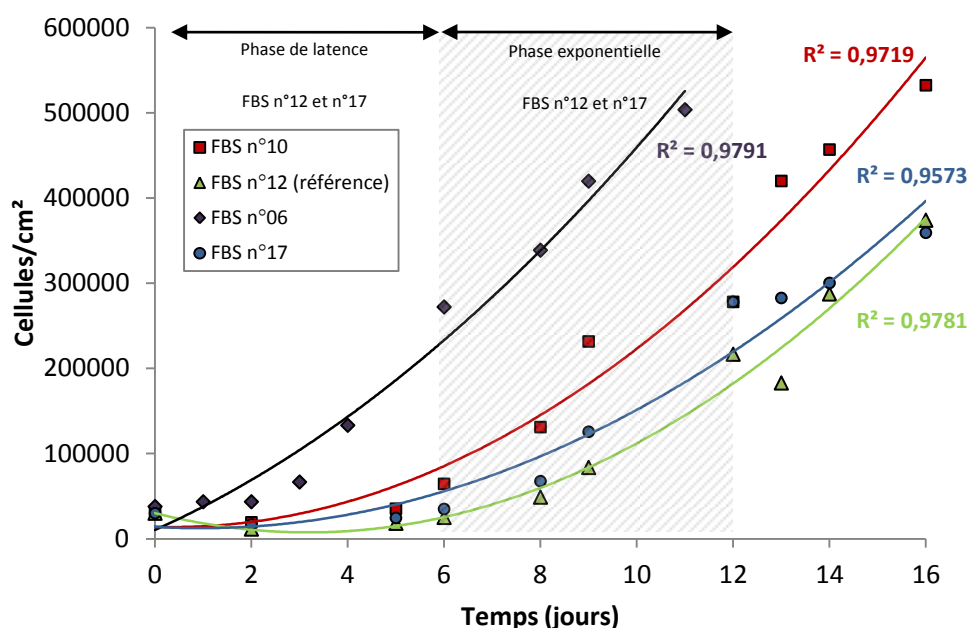


Figure 29. Comparaison des courbes de croissance Calu-3 obtenues avec différents lots de FBS en plaques 24 puits. Lots en test : FBS n°06, n°10 et n°17 ; lot de référence : FBS n°12.

Un certain nombre de manipulations ayant été réalisé avec le lot de référence en amont de cette campagne de sélection, le critère principal retenu pour la sélection du nouveau de lot de FBS s'est porté sur la similarité de la croissance des cellules Calu-3 avec le lot de référence en question, afin de conserver des conditions de culture identiques permettant d'aboutir à la formation de barrières cellulaires comparables entre systèmes Transwell® et microsystemes. Les lots FBS n°06 et n°10 n'ont donc pas été retenus, au profit du lot n°17 qui a montré de nombreuses similarités avec le lot de référence en termes d'aspect des cellules, délai d'atteinte de la confluence entre chaque repiquage, et nombre de cellules comptabilisées à chaque repiquage.

Pour ces deux lots de FBS, un temps de doublement des cellules d'environ 2,5 jours a pu être déterminé à partir de la partie linéaire de la courbe correspondant à la phase exponentielle de croissance des cellules. La phase exponentielle dans le cas de ces deux lots de FBS, représentée par une zone grisée sur la Figure 29, a été observée entre 6 et 12 jours après ensemencement. Une phase de latence relativement longue est observée pour ces deux lots de FBS (~ 6 jours). Mis à part une vitesse de division lente, les cellules Calu-3 nécessitent au minimum 1 jour pour adhérer au support. De plus, le nombre de cellules ensemencées relativement faible (30 000 cellules/cm²), ou l'utilisation de cellules à l'état de quiescence lors de l'ensemencement en plaques 24 puits (dû à un état de confluence éventuellement trop proche des 100%) pourraient expliquer que les cellules aient du mal à repartir et à atteindre leur croissance exponentielle.

Dans le but de confirmer la capacité de différenciation des cellules Calu-3 cultivées avec le nouveau lot de FBS choisi en tapis cellulaires confluents et jointifs, un suivi de la TEER en système Transwell® a été réalisé et comparé au lot de référence. La reproductibilité du FBS n°17 sur la croissance cellulaire a été testée en utilisant pour cette expérience deux suspensions cellulaires différentes, diluées à concentrations identiques. Une plaque Transwell® par lot de FBS a étéensemencée selon le protocole décrit en Annexe A.1.3, soit 12 inserts pour le FBS de référence, et 6 inserts pour chaque suspension cellulaire du lot FBS n°17. Trois mesures de TEER ont été réalisées par puits (cf. protocole en Annexe A.1.4).

Les courbes de TEER obtenues pour les deux lots de FBS en fonction du temps sont présentées Figure 30. La très grande similarité dans l'évolution des valeurs de TEER quelque soit le FBS utilisé confirme que les deux lots de FBS contiennent des proportions similaires en facteurs de croissance. L'apparition d'une TEER mesurable et qui augmente progressivement, avec un maximum atteint en une dizaine de jours pour les deux lots de FBS confirme la différenciation des cellules Calu-3 en épithélium confluent. Ce maximum est corrélé, dans les deux cas, à l'état de confluence totale des tapis cellulaires observé au microscope inversé. Une très bonne reproductibilité de cette évolution de TEER en fonction du temps pour le nouveau lot sélectionné est également obtenue, avec, au vu des écart-types représentés sur les courbes, des variations de TEER inter-puits très faibles.

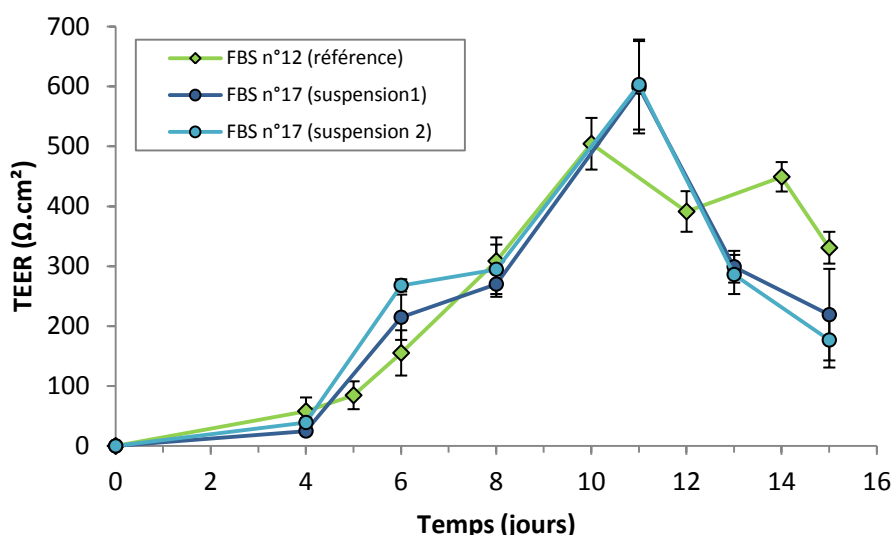


Figure 30. Comparaison de l'évolution de la TEER en fonction du temps selon le lot de FBS utilisé pour la culture des cellules Calu-3 en système Transwell®. Ensemencement à 270 000 cellules/cm² en plaques Transwell® 12 puits (1,12 cm²). Les données représentent la variation inter-puits des valeurs moyennes mesurées $\pm$ l'écart type, à partir de n=6 inserts pour le FBS n°17 (suspensions 1 et 2), et n=12 inserts pour le FBS n°12.

I.1.2. Concentration cellulaire d'ensemencement

Le suivi de l'évolution de la TEER en fonction du temps a ici été exploité pour évaluer l'impact de la concentration cellulaire ensemencée sur la vitesse d'atteinte de la confluence et l'obtention de tapis cellulaires jointifs. Différentes concentrations d'ensemencement ont été testées : 170 000, 270 000, et 500 000 cellules/cm², situées dans l'intervalle de concentrations généralement rencontrées dans la littérature pour la culture de cellules Calu-3 en systèmes Transwell® (de 100 000 à 500 000 cellules/cm²). Ces expériences ont été réalisées avec le lot FBS n°06. Six inserts par concentration ont été ensemencés et les mesures de TEER de chaque insert répétées trois fois.

Les différentes courbes obtenues sont présentées dans la Figure 31a. Les valeurs maximales de TEER obtenues pour ces trois expériences sont apparues particulièrement faibles malgré des tapis cellulaires visiblement bien formés, selon l'observation au microscope inversé. Ces valeurs surprenantes ont été attribuées au lot de FBS utilisé lors de ces expériences, différent du « lot de référence », et qui, *a posteriori* a été jugé non adapté pour une croissance optimale des cellules Calu-3. La vitesse de croissance des cultures avec ce lot de FBS s'est en effet ralentie de manière significative au bout de plusieurs semaines d'entretien, semaines pendant lesquelles ces expériences ont été réalisées. Ces expériences restent néanmoins exploitables, en se basant sur l'allure des différentes courbes obtenues. Un comportement légèrement différent pour la plus faible des trois concentrations a été observé, pour laquelle des valeurs de TEER mesurables n'ont été obtenues qu'après 9 jours de culture, contre quelques jours pour les autres. Pour les trois concentrations néanmoins, les valeurs de TEER se sont stabilisées à leur maximum après 10 jours de culture, laissant penser que la concentration d'ensemencement, dans la gamme testée, n'influe pas sur le temps nécessaire de formation de tapis cellulaires jointifs.

Une étude complémentaire réalisée avec le lot FBS de référence a permis de confirmer cette hypothèse, en comparant cette fois-ci des concentrations de 270 000 cellules/cm² et 450 000 cellules/cm² (Figure 31b). Les courbes d'évolution de TEER sont en effet presque parfaitement superposables. Une concentration d'ensemencement de 270 000 cellules/cm² a ainsi été retenue pour la suite des expériences en systèmes Transwell®.

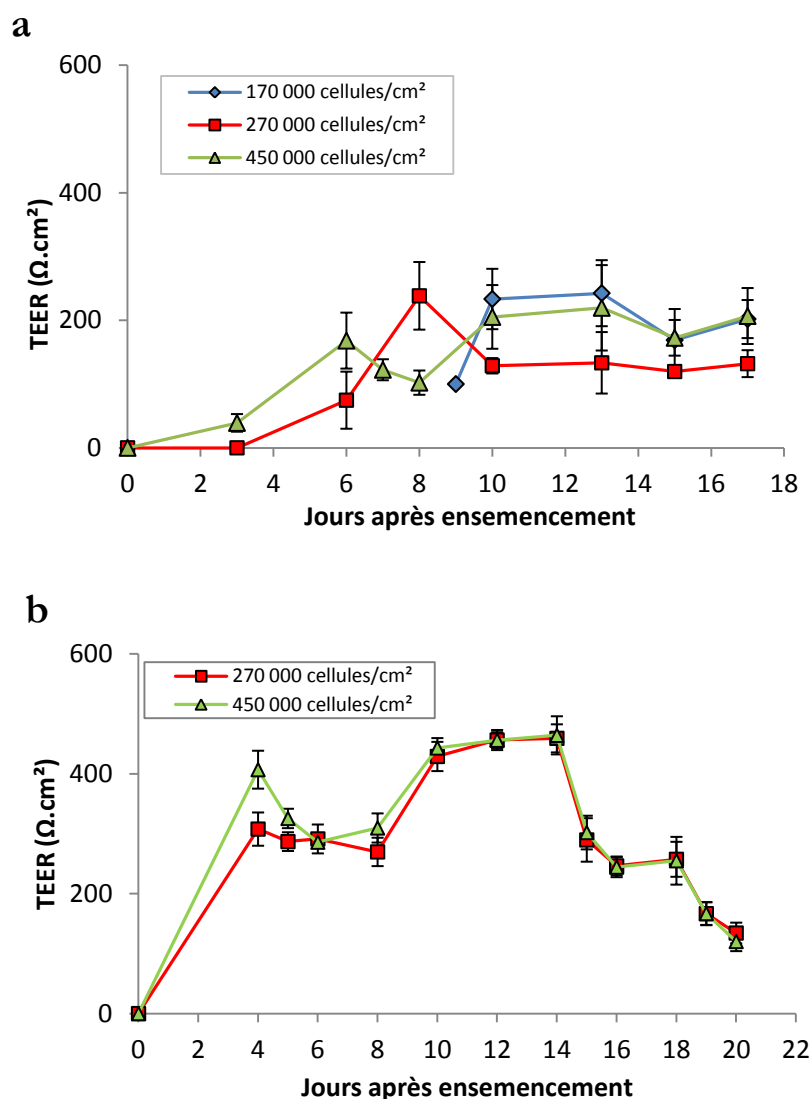


Figure 31. Evolution de la TEER en fonction du temps selon le nombre initial de cellules Calu-3 ensemencées en systèmes Transwell®. (a) Cellules Calu-3 cultivées avec le FBS n°06, chaque courbe représentant une expérience indépendante. (b) Cellules Calu-3 cultivées avec le FBS n°12 de référence, avec chaque courbe issue d'une suspension cellulaire commune mais ensemencée à des concentrations différentes. Les données représentent la variation inter-puits des valeurs moyennes mesurées $\pm$ l'écart type, à partir de $n=6$ inserts pour chaque courbe.

I.2. Etude de l'impact du type de membrane support

Différents types d'inserts Transwell® ont été étudiés pour tester leur impact sur l'établissement de la confluence et l'obtention de barrières cellulaires Calu-3 jointives. Les deux types de matériau disponibles commercialement (PET, PC) ainsi que deux tailles de pores ont été comparées (0,4 et 3 μm). La mise en place de la confluence a dans un premier temps été évaluée par suivi de la TEER. Les valeurs de TEER ont ensuite été corrélées à l'état morphologique des tapis cellulaires, observé par marquage cellulaire des filaments d'actine (constituants du cytosquelette cellulaire) et de la protéine ZO-1 (protéine entrant en jeu dans la formation des jonctions serrées). Enfin, les

valeurs de TEER ont été corrélées à la perméabilité des tapis cellulaires vis-à-vis du ^{14}C -sucrose. L'ensemble de ces expériences a été réalisé avec le lot FBS de référence (FBS n°12).

I.2.1. Suivi de la TEER

Pour cette expérience, des conditions de culture identiques ont été appliquées, et quatre plaques Transwell® présentant des inserts de différents types ont étéensemencées à la concentration de 270 000 cellules/cm², à partir d'une suspension cellulaire unique. La mise en place de la confluence et l'intégrité des tapis cellulaires ont été évaluées par suivi de la TEER en fonction du temps.

La Figure 32 met en évidence une grande similarité d'évolution des valeurs de TEER en fonction du temps et ce quelque soit le type de membrane utilisée. On retrouve en effet dans chaque cas une cinétique composée d'une première phase d'augmentation progressive de la TEER, suivie d'une phase en plateau pendant laquelle les valeurs de TEER se stabilisent. Excepté pour les membranes en PC 0,3 µm, l'atteinte du plateau de TEER a été corrélée à l'arrêt de la diffusion de milieu du compartiment basolatéral vers le compartiment apical. Pour les membranes en PET optiquement transparentes, les tapis cellulaires clairement visibles au microscope inversé sont apparus confluent dès l'obtention des valeurs maximales de TEER. L'état de confluence s'est avéré plus difficile à déterminer de manière certaine dans le cas des membranes en PC, leur caractère translucide ne laissant percevoir que des tapis cellulaires relativement flous. En conclusion, une confluence est obtenue très rapidement avec les membranes en PET 0,4 µm, après seulement 5 jours de culture contre une dizaine de jours pour les trois autres types de membranes testés.

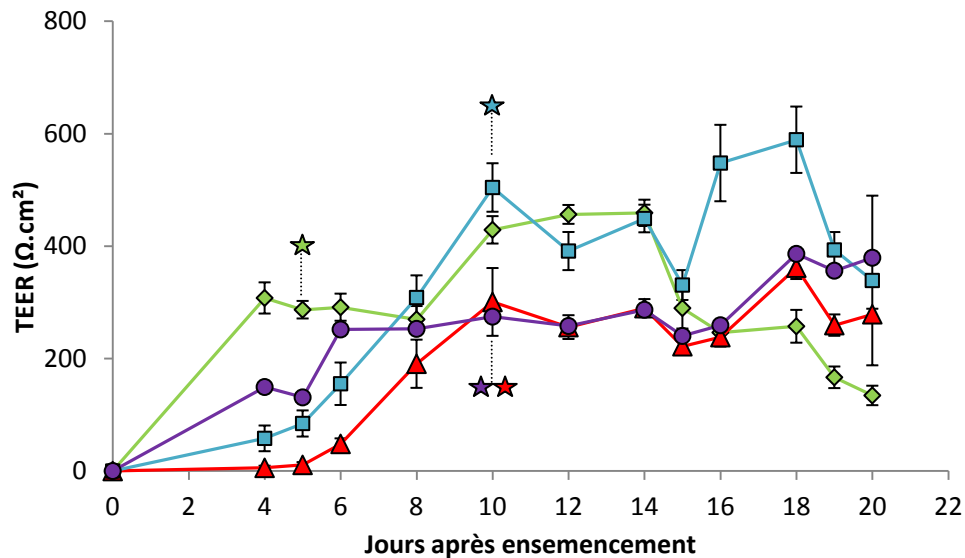


Figure 32. Evolution de la TEER en fonction du temps selon le type de membrane microporeuse utilisé. Cellules Calu-3 cultivées avec le FBS de référence (FBS n°12) en systèmes Transwell® 12 puits (1,12 cm²) sur membrane PET 0,4 μm (◇), PC 0,4 μm (▲), PET 3 μm (■) ou PC 3 μm (●). Ensemencement initial à 270 000 cellules/cm² à partir d'une suspension cellulaire unique pour les 4 expériences. Les données représentent la variation inter-puits des valeurs moyennes mesurées ± l'écart-type, à partir de n=12 puits pour chacune des courbes. Les étoiles représentent la confluence totale des tapis cellulaires déterminée par l'arrêt de passage de milieu du compartiment basolatéral vers le compartiment apical.

La taille de pores ne semble en revanche pas influencer sur les propriétés bioélectriques des tapis cellulaires puisque des valeurs maximales de TEER similaires sont obtenues pour les deux types de membranes en PET ($448 \pm 0 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$) ainsi que pour les deux types de membranes en PC ($278 \pm 6 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$), valeurs moyennes mesurées entre 10 et 14 jours après ensemencement. En conclusion, les tapis cellulaires Calu-3 semblent donner des TEER plus importantes sur des membranes en PET.

On peut alors se poser la question de ce que révèle une valeur de TEER sur le plan morphologique et cellulaire. Une valeur de TEER plus importante est-elle synonyme d'une barrière cellulaire plus jointive, ou d'un tapis cellulaire plus épais ? La TEER, en mesurant le passage d'ions d'un pôle à l'autre des tapis cellulaires est en effet fréquemment utilisée pour évaluer l'intégrité des barrières cellulaires, et pour évaluer indirectement la présence de jonctions serrées. Mais une valeur de TEER reflète-elle à elle seule l'intégrité des barrières épithéliales ?

Afin de déterminer si ces différences de valeurs de TEER sont révélatrices de tapis cellulaires aux morphologies et perméabilités différentes, nous avons cherché à confronter un certain nombre de résultats de caractérisation obtenus par mesures de TEER - à partir de tapis cellulaires cultivés sur membranes PET et PC 0,4 μm - à ceux obtenus par des techniques d'immunofluorescence ou de mesure de perméabilité du ¹⁴C-sucrose.

I.2.2. Relation entre TEER et morphologie des tapis cellulaires

Les tapis cellulaires cultivés sur membrane PC 0,4 μm , dont la courbe d'évolution de TEER a été présentée Figure 32, ont été utilisés pour réaliser un double marquage des filaments d'actine et de la protéine ZO-1. Les marquages ont été réalisés à partir de l'atteinte de la confluence, puis tous les 2 jours jusqu'à 20 jours après ensemencement, selon le protocole décrit en Annexe A.1.5. L'observation des tapis cellulaires marqués a été effectuée à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (cf. Annexe A.1.6).

Au 10^{ème} jour de culture, lors de l'atteinte du plateau de la courbe de TEER ($301 \pm 60 \Omega \cdot \text{cm}^2$), la confluence a été confirmée par le marquage des filaments d'actine (Figure 33a), qui a clairement mis en évidence la colonisation des cellules sur toute la surface de l'insert Transwell®. L'observation des tapis cellulaires a également montré la présence de jonctions serrées bien définies, exprimées de manière homogène, et délimitant très bien les cellules entre elles (Figure 33b). Ces premières observations démontrent que, bien que présentant des propriétés bioélectriques moins importantes par rapport aux tapis cellulaires cultivés sur PET 0,4 μm , ceux cultivés sur des systèmes en PC 0,4 μm n'en sont pas moins confluent, et se développent en véritables épithéliums constitués de cellules jointées entre elles par des jonctions serrées. Les jonctions serrées sont des complexes protéiques qui marquent la frontière entre le pôle apical et le pôle basal de la membrane plasmique des cellules épithéliales, et permettent le maintien d'un état polarisé. Leur présence démontre ici l'obtention d'épithéliums jointifs et polarisés. Indépendamment des valeurs mesurées, la stabilisation de la TEER à son maximum serait donc synonyme de l'obtention de tapis cellulaires Calu-3 possédant des caractéristiques morphologiques d'épithélium attendues. Au fur et à mesure de la culture néanmoins, la morphologie des tapis cellulaires a évolué de manière significative. Les tapis cellulaires se sont organisés en couches de cellules superposées, de manière relativement anarchique et ont développé des épaisseurs importantes ($\sim 90 \mu\text{m}$ au 20^{ème} jour de culture), supérieures à celles attendues pour une monocouche de cellules représentatives de l'épithélium bronchique ($\sim 60 \mu\text{m}$). Ces observations seront discutées plus en détail dans la dernière partie de ce chapitre. En parallèle, aucune augmentation de la TEER n'a été observée. Le 20^{ème} jour, malgré une épaisseur importante des tapis cellulaires, des jonctions serrées bien définies ont été observées au niveau des cellules présentes au sommet des tapis cellulaires (Figure 33d), preuves d'un épithélium encore bien formé.

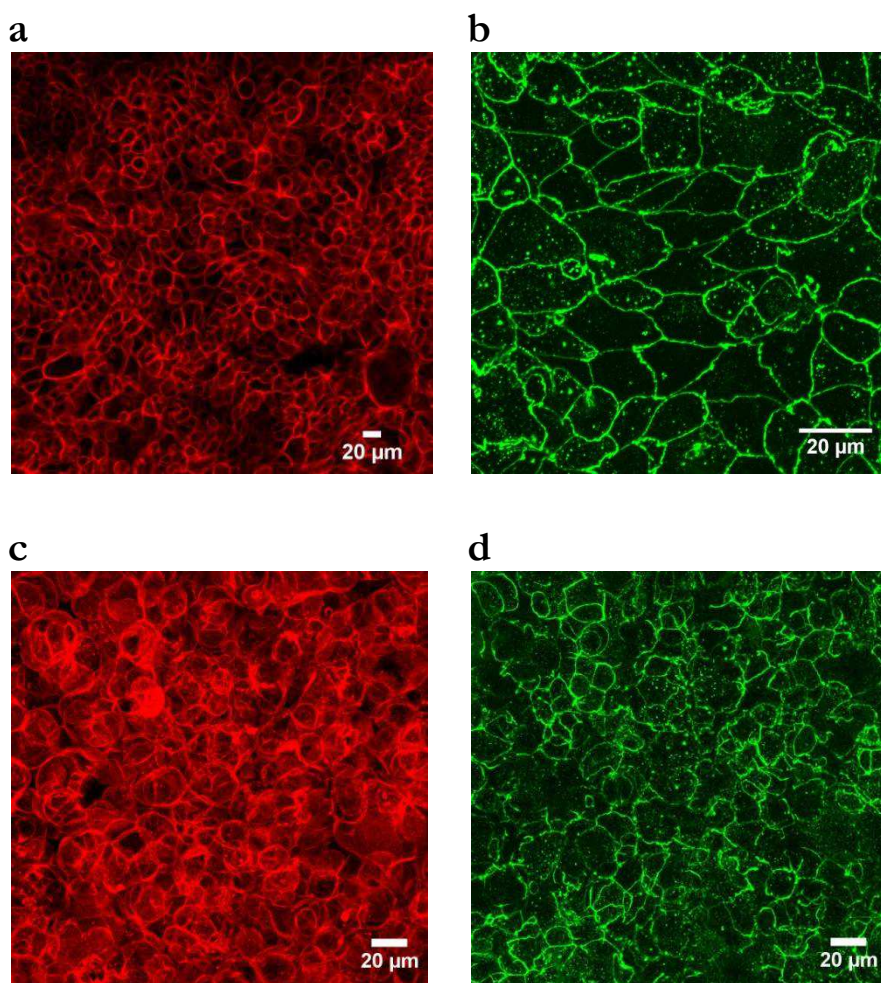


Figure 33. Images en microscopie confocale des tapis cellulaires Calu-3 cultivés en systèmes Transwell® PC 0,4 µm. Double marquage des filaments d'actine (canal rouge) et de la protéine ZO-1 (canal vert) : (a, b) Jour de l'atteinte du plateau correspondant aux valeurs maximales de TEER (10^{ème} jour) ; (c, d) 20^{ème} jour.

I.2.3. Relation entre TEER et perméabilité au ¹⁴C-sucrose

Dans le but de confirmer que la présence de jonctions serrées observées au moment de la confluence est bien le reflet d'un épithélium jointif dont la perméabilité aux petites molécules hydrophiles est limitée, une cinétique de la perméabilité des tapis cellulaires au ¹⁴C-sucrose a été réalisée sur une même culture Calu-3 en système Transwell® PET 0,4 µm (cf. protocole en Annexe A.1.7). Différents coefficients de perméabilité apparente (P_{app}) ont été obtenus à plusieurs jours d'intervalles, les premiers ayant été volontairement mesurés sur des tapis cellulaires n'ayant visuellement pas atteint la confluence, afin d'obtenir des valeurs de référence de tapis cellulaires non jointifs. La mise en place progressive d'un épithélium jointif a ensuite été évaluée par détermination de P_{app} sur plusieurs jours consécutifs, sur les tapis cellulaires devenus visuellement confluents. A chaque jour choisi pour l'expérience de perméabilité, trois puits

Transwell® ont été utilisés, et un P_{app} a été calculé par puits en utilisant l'équation (2) décrite en Annexe A.1.7. La TEER des puits correspondants a été mesurée avant l'expérience.

Un accroissement de la concentration en ^{14}C -sucrose dans les compartiments basolatéraux en fonction du temps est démontré dans la Figure 34. On remarque que celui-ci est linéaire, quelque soit le jour choisi pour mesurer les perméabilités au marqueur paracellulaire, avant comme après la confluence. Une très nette restriction du passage de ^{14}C -sucrose au fur et à mesure de la croissance des cellules est visible, les pentes des droites obtenues diminuant de manière significative. La pente des courbes représente le flux linéaire de ^{14}C -sucrose au cours du temps (dC/dt) utilisé pour calculer les P_{app} .

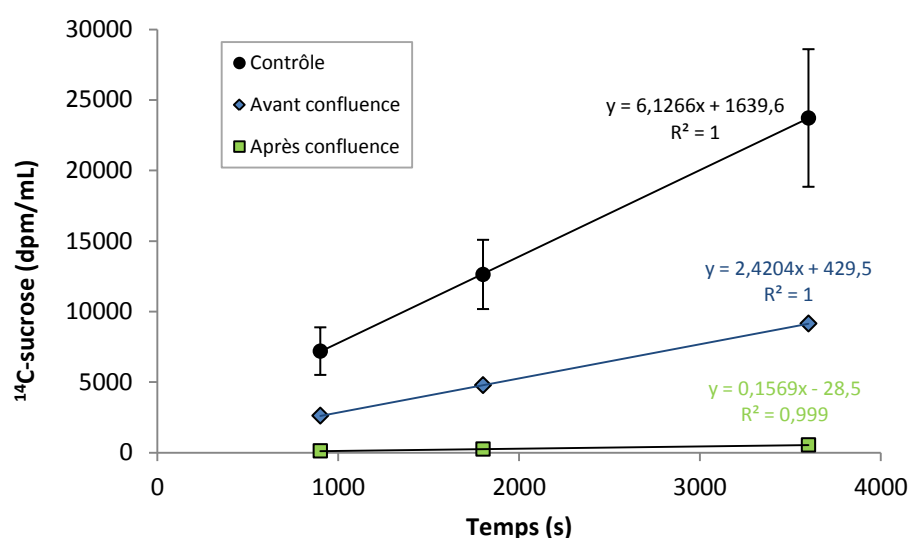


Figure 34. Concentration de ^{14}C -sucrose dans les compartiments basolatéraux en fonction du temps. Mesures réalisées à travers la membrane PET 0,4 μm (contrôle sans cellules), et à travers les tapis cellulaires Calu-3 cultivés sur la même membrane avant l'atteinte de la confluence (4^{ème} jour) et le jour de l'atteinte de la confluence (7^{ème} jour).

Les différents coefficients de perméabilité (P_{app}) des tapis cellulaires déduits de ces expériences et les valeurs de TEER correspondantes, illustrés dans la Figure 35, montrent clairement une relation inversement proportionnelle entre ces deux paramètres : la perméabilité diminue quand la TEER augmente. Ce n'est cependant le cas que les premiers jours de culture, soit uniquement pendant le temps nécessaire à l'atteinte de la confluence, observée visuellement ici au 7^{ème} jour de culture. Pendant ce laps de temps, la perméabilité diminue dans un premier temps d'un facteur 2 au 4^{ème} jour, par rapport à la valeur de perméabilité contrôle obtenue à travers la membrane seule (soit mesurée en l'absence de cellules, $P_{app} = 163,8 \pm 46,3 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$). Elle diminue de manière très importante par la suite, soit d'un facteur 10 supplémentaire le jour de l'atteinte de la confluence. Au delà de la confluence, les deux paramètres mesurés cessent d'évoluer de manière

significative : la TEER se stabilise alors que la perméabilité ne diminue que très légèrement, pour atteindre une valeur de $3,1 \pm 0,2 \times 10^{-7}$ cm/s après 10 jours de culture.

Des valeurs de P_{app} du même ordre de grandeur ($< 10 \times 10^{-7}$ cm/s) sont reportées dans la littérature avec le marqueur de référence mannitol pour la lignée Calu-3, marqueur hydrophile très communément utilisé et possédant un poids moléculaire très proche du sucrose (Forbes & Ehrhardt 2005; Pezron *et al.* 2002; Stentebjerg-Andersen *et al.* 2011; Mathias *et al.* 2002; Winton *et al.* 1998; Wang *et al.* 2011). Au même titre que l'étude présentée dans le paragraphe précédent, ces résultats permettent de confirmer que la stabilisation des valeurs de TEER indique la formation d'épithéliums jointifs, dont l'intégrité a ici été démontrée.

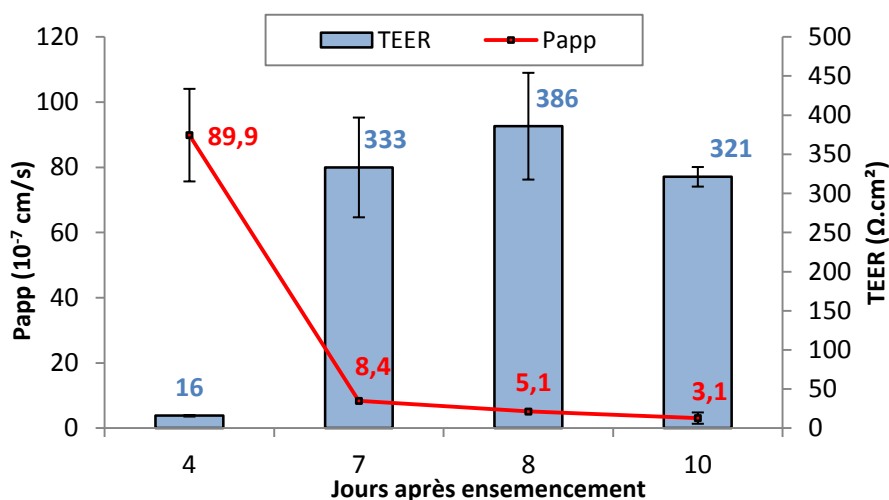


Figure 35. Relation entre valeurs de TEER et perméabilité au sucrose (P_{app}) mesurées sur tapis cellulaires Calu-3 cultivés en système Transwell® PET 0,4 µm. Données issues d'une culture unique, les valeurs ayant été mesurées au fur et à mesure de la croissance des tapis cellulaires. Les données représentent la moyenne des P_{app} et TEER $\pm$ écart type mesurés sur n=3 inserts différents.

Au vu de ces différentes caractérisations, il semblerait donc possible, pour une même culture, de pouvoir corréler l'atteinte de la confluence à la stabilisation des valeurs de TEER, et à la présence d'une barrière épithéliale jointive limitant le passage paracellulaire des molécules.

Il semble en revanche difficile de se baser uniquement sur une valeur seuil de TEER à atteindre pour estimer l'intégrité des épithéliums, comme cela est souvent décrit dans la littérature. La Figure 36 met en effet en évidence une certaine limite à la pertinence de cette technique de mesure si celle-ci est utilisée seule. Sur cette figure ont été représentés les P_{app} exprimés en fonction des valeurs de TEER correspondantes, mesurés sur des tapis cellulaires issus de cultures différentes, à des états de confluence différents, et cultivés sur des membranes différentes. On

remarque une absence de corrélation, avec de plus des écarts de perméabilité importants observés pour des valeurs de TEER identiques. Par exemple, pour des valeurs de TEER pourtant élevées (400-450 $\Omega \cdot \text{cm}^2$), la perméabilité de tapis cellulaires mesurée sur deux cultures différentes varie d'un facteur 3, les valeurs atteintes pour l'une des deux cultures dépassant la limite des 10×10^{-7} cm/s évoquée plus haut. Pour cette dernière, le marquage des filaments d'actine réalisé en parallèle a permis de mettre en évidence quelques très petites zones de non confluence, non observées en microscopie optique, ce qui explique les P_{app} mesurés un peu élevés.

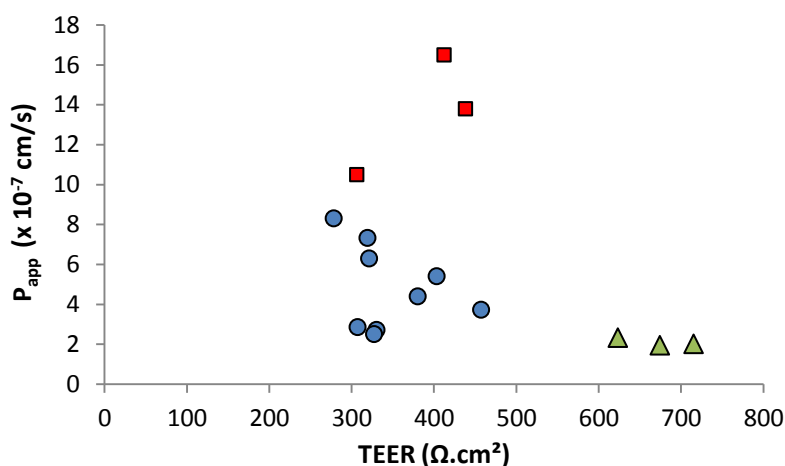


Figure 36. Relation entre TEER et perméabilité (P_{app}) du sucrose mesurées sur tapis cellulaires Calu-3 issus de cultures différentes. P_{app} mesurés une fois le plateau de valeurs de TEER atteint, en systèmes Transwell® PC ou PET 0,4 μm , une même couleur désigne les données déduites à partir d'une même culture.

I.3. Discussion

Nous avons démontré que les cellules Calu-3 cultivées en systèmes Transwell® PC ou PET, sous nos conditions de culture optimisées, permettent d'obtenir des modèles *in vitro* d'épithéliums bronchiques appropriés pour réaliser des études de transport. Les modèles développés aboutissent à de véritables barrières épithéliales jointives, comparables au modèle Calu-3 décrit dans la littérature, et ressemblant de près à l'épithélium bronchique natif. Nos modèles Calu-3 atteignent la confluence en une semaine de culture en moyenne, et se développent très rapidement en épithéliums polarisés avec expression de jonctions serrées, dont les valeurs de P_{app} sont semblables à celles publiées pour le même modèle cellulaire cultivé en interface air-liquide.

A travers ces différentes expériences, la technique de mesure de TEER a été évaluée quant à sa pertinence pour prédire la confluence et pour déterminer l'intégrité des épithéliums formés. La TEER s'avère être une technique fiable pour le suivi de l'établissement de la confluence, phase pendant laquelle l'augmentation de la TEER reflète de manière fidèle la croissance cellulaire.

L'atteinte de la confluence se traduit ensuite par une stabilisation des valeurs de TEER, qui, dans nos conditions de culture, a confirmé être synonyme de tapis cellulaires polarisés et jointifs, mis en évidence par ailleurs par immunomarquages cellulaires et mesures de perméabilité vis-à-vis du marqueur paracellulaire ^{14}C -sucrose.

Les variations des valeurs de TEER sont communément interprétées comme étant le reflet de la perméabilité paracellulaire, et sont attribuées uniquement à la fonctionnalité des jonctions serrées. Cela n'est cependant que partiellement vrai. En effet, la résistance développée par les épithéliums ne se limite pas à la seule présence des jonctions serrées. Comme illustré dans la Figure 37, la résistance trans-épithéliale totale (TEER) est en réalité composée de deux résistances en parallèle, la résistance transcellulaire (R_c) et la résistance paracellulaire (R_p) (Claude 1978; Powell 1981). Chacune d'entre elles résulte de deux résistances en série : R_c correspond aux résistances des membranes apicales (R_a) et basolatérales (R_b), tandis que R_p correspond aux résistances des jonctions serrées (R_{TJ}) et des espaces intercellulaires (R_{ICS}). La résistance des espaces intercellulaires (R_{ICS}) étant négligeable (Lo *et al.* 1999), la TEER peut alors être exprimée selon la relation simplifiée suivante :

$$TEER = R_{TJ} \times \frac{(R_a + R_b)}{R_a + R_b + R_{TJ}} \quad \text{Equation (3)}$$

Pour de nombreux types d'épithéliums, la résistance due à la présence des jonctions serrées a démontré être nettement plus faible que celles développées aux pôles apicaux et basolatéraux des cellules (Claude 1978). Le courant d'ions traverse donc essentiellement l'épithélium en empruntant la voie paracellulaire à travers les jonctions serrées. D'après l'équation 3, la TEER devient alors par simplification, équivalente à la résistance développée par les jonctions serrées (R_{TJ}).

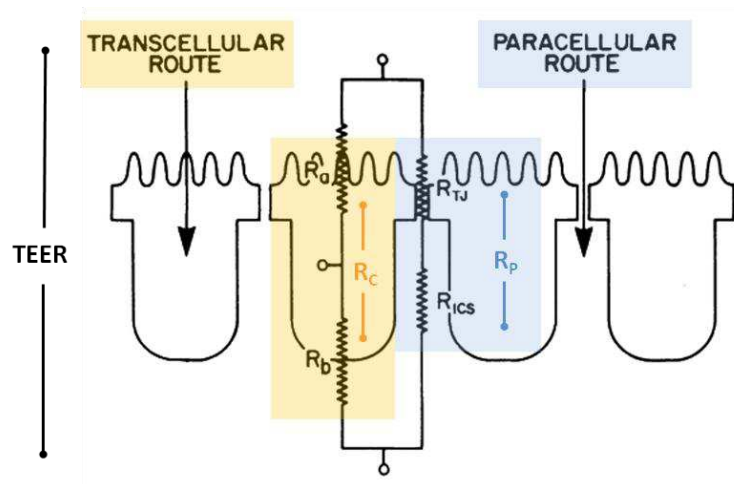


Figure 37. Schématisation des différents types de résistances développées par l'épithélium.
Adapté de Powell (1981)

Il a été observé lors de cette étude que les valeurs maximales de TEER développées par les épithéliums Calu-3 sont plus importantes sur des membranes en PET que sur des membranes en PC. Lo *et al.* (1999) ont démontré qu'au-delà de la résistance des jonctions serrées, une résistance additionnelle entre en jeu dans la mesure de TEER, qui rend compte du flux d'ions passant entre les cellules et le support. Les cellules adhérant plus fortement à un type de support donné restreignent d'autant plus le passage d'ions et développent ainsi des TEER plus importantes. La prise en compte de cette résistance additionnelle pourrait expliquer la différence observée entre nos deux types de membranes. Les forces d'interaction des cellules Calu-3 avec le matériau PET sont probablement plus fortes qu'avec le PC, ce qui conduit à des valeurs de TEER plus élevées. Une meilleure adhérence sur le PET expliquerait également le fait que la confluence obtenue en PET soit plus rapide.

Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont démontré que plus la densité de pores des membranes microporeuses est élevée, moins la résistance cellules-support additionnelle est élevée. Nos membranes en PC possédant une densité de pores sensiblement plus importante que les membranes en PET (1×10^8 pores/cm² et 4×10^6 pores/cm², respectivement), il est logique que des valeurs de TEER plus faibles soient observées avec les membranes en PC.

Nous avons également mis en évidence l'incapacité des mesures de TEER à différencier un tapis cellulaire en monocouche d'un autre s'étant développé en multicouches. Etant donné la grande épaisseur développée par les cellules Calu-3 dans les 3-4 jours après l'atteinte de la confluence, il semble préférable de ne pas trop s'éloigner de celle-ci pour réaliser des études de transport de molécules, au risque de travailler sur des tapis cellulaires très épais et certainement moins

représentatifs de l'épithélium *in vivo*, qui lui est constitué d'une simple monocouche de cellules polarisées.

Ces variabilités observées avec un même modèle cellulaire cultivé dans des conditions de culture différentes laissent penser qu'il est préférable de prendre en compte l'atteinte d'un plateau de valeurs maximales de TEER plutôt qu'une valeur seuil de TEER pour considérer que les tapis cellulaires formés sont exploitables pour réaliser des études de transport. Certaines études publiées font état de la variabilité des valeurs de TEER en fonction des conditions de culture appliquées. Par exemple, en réalisant une étude comparative de différents types de membrane et composition de milieux de culture, Geys *et al.* (2007) décrivent que la composition du milieu de culture joue beaucoup sur les valeurs de TEER obtenues sur les cellules Calu-3, et notamment qu'une concentration en FBS plus importante conduit à des valeurs de TEER plus importantes.

Leur étude permet également de confirmer la faible pertinence de cette technique de mesure si elle est utilisée seule, puisqu'en établissant une corrélation entre le P_{app} et la TEER, ces auteurs ont déterminé que les barrières Calu-3 cultivées sur membrane PET 0,4 μm étaient bien formées pour une valeur de TEER correspondante de seulement 130 $\Omega.cm^2$ (Geys *et al.* 2007).

Une autre équipe a également remis en cause la pertinence de la technique de mesure de TEER, la décrivant comme peu fiable pour estimer l'intégrité des épithéliums Caco-2 pour mesurer l'effet de molécules sur les jonctions serrées (Mukherjee *et al.* 2004).

Tous ces résultats démontrent l'importance d'utiliser au moins deux techniques différentes pour caractériser l'intégrité du modèle d'épithélium Calu-3 dans des conditions de culture bien définies. Seuls des tapis cellulaires cultivés dans des conditions de culture strictement identiques pourront être suivis uniquement par la mesure de TEER, pour peu que les conditions de culture appliquées soient suffisamment reproductibles et que les épithéliums aient été caractérisés à l'aide de techniques additionnelles en amont des études de routine.

II. Microfabrication : mise au point et optimisation du microsystème

En parallèle de cette étude préliminaire visant à caractériser et optimiser le modèle Calu-3, le cœur de ce travail de thèse a été consacré au développement d'un microsystème utilisable comme plateforme de criblage pour évaluer la capacité de passage de molécules actives au travers de ce modèle. Le but ultime étant de réaliser des tests parallélisés sur un seul et même système, il a été nécessaire d'envisager une méthode de fabrication et un design simples pour concevoir un microsystème permettant l'intégration aisée de nombreuses microchambres destinées à réaliser des cultures de Calu-3 identiques.

Nous l'avons vu dans la partie bibliographique du manuscrit, le matériau phare pour la fabrication des microsystèmes dédiés à la culture cellulaire est le PDMS, en raison notamment de ses propriétés de biocompatibilité, de transparence, et de perméabilité à l'O₂. Sa grande simplicité de fabrication est également un avantage indéniable. Ce matériau a donc naturellement été envisagé pour la fabrication de nos systèmes, mais a très vite été jugé peu adapté pour les raisons qui suivent. Le PDMS est hydrophobe, et le risque d'observer une adsorption importante, non seulement des protéines contenues dans le milieu de culture mais également de celles que nous envisageons de tester est élevé, ce qui nous a rapidement poussé à ne pas sélectionner ce matériau. Un traitement de surface aurait pu permettre de pallier cette problématique, mais pour des raisons de simplicité, d'autres matériaux ne nécessitant pas systématiquement de traitements spécifiques ont été préférés pour les composants principaux du microsystème, comme le verre et le plastique. Finalement, nous avons cherché à nous rapprocher des matériaux présents dans les puits de culture classiques.

Le microsystème développé a fait l'objet de nombreuses optimisations en termes de microfabrication et des techniques employées. Le microsystème envisagé doit se composer de deux compartiments principaux (Figure 38). Le premier, qui sera appelé *plateforme de culture*, est destiné à la croissance du modèle de barrière pulmonaire au sein de micropuits de culture. Il reposera dans un premier temps sur un anneau circulaire pendant la croissance des cellules. Le deuxième compartiment, est quant à lui un support pour la plateforme de culture, dédié aux expériences de perméabilité et plus précisément au recueil des molécules ayant franchies les modèles de barrières pulmonaires cultivées dans les micropuits. Nous l'appellerons *support recueil*.

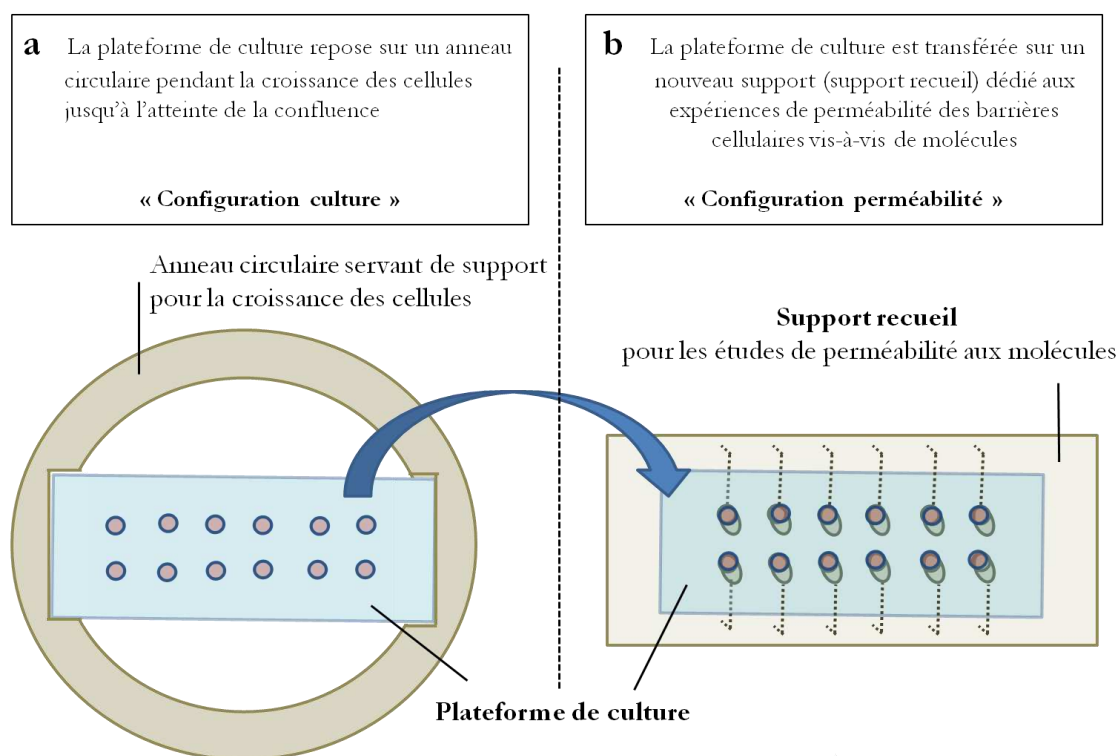


Figure 38. Schématisation de la conception du microsystème. (a) « Configuration culture » du microsystème, utilisée pendant la croissance de cellules ; **(b)** « Configuration perméabilité » du microsystème, utilisée pour réaliser les expériences de perméabilité des barrières cellulaires formées vis-à-vis de molécules.

Dans ce qui suit nous décrivons les différentes générations successives de chacun des deux compartiments principaux du microsystème - la plateforme de culture et le support recueil - développées au fur et à mesure des optimisations. Les méthodes de fabrication et les améliorations apportées sont détaillées. La caractérisation du microsystème final complet fait l'objet de la dernière partie de ce chapitre, à travers un article publié dans lequel sont comparées les performances de notre microsystème à celles obtenues en systèmes Transwell®.

II.1. Plateforme de culture pour la croissance des barrières pulmonaires

Le compartiment culture a été imaginé sous la forme d'une plateforme comportant une série de micropuits à la base desquels une membrane microporeuse fait office de support pour les cellules. L'intégration de cette membrane s'est révélée être une des étapes critiques de la fabrication de la plateforme de culture. Différentes méthodes d'insertion de cette membrane ont été envisagées : une méthode de collage sous irradiation UV et une méthode de collage thermique. Pour cette plateforme de culture, différents matériaux ont été envisagés, à savoir le plastique et le verre. Enfin, différentes membranes en PET et en PC ont été utilisées et testées.

II.1.1. Méthodes d'intégration de la membrane servant de support à la culture

II.1.1.1. Collage de la membrane sous irradiation UV

Les premiers essais ont été réalisés sur des plateformes simplifiées comportant un seul micropuits de 2 mm de diamètre. Des petites boîtes carrées en plastique (2 cm de côté) ont dans un premier temps été utilisées. Les micropuits ont été créés au fond de ces boîtes par simple perçage à l'aide d'une perceuse (qui permet d'obtenir des diamètres jusqu'à 250 μm). L'insertion de la membrane microporeuse (issue d'inserts Transwell®) à la base du micropuits a été réalisée selon les étapes décrites Figure 39 et détaillées plus amplement en Annexe A.2.1.

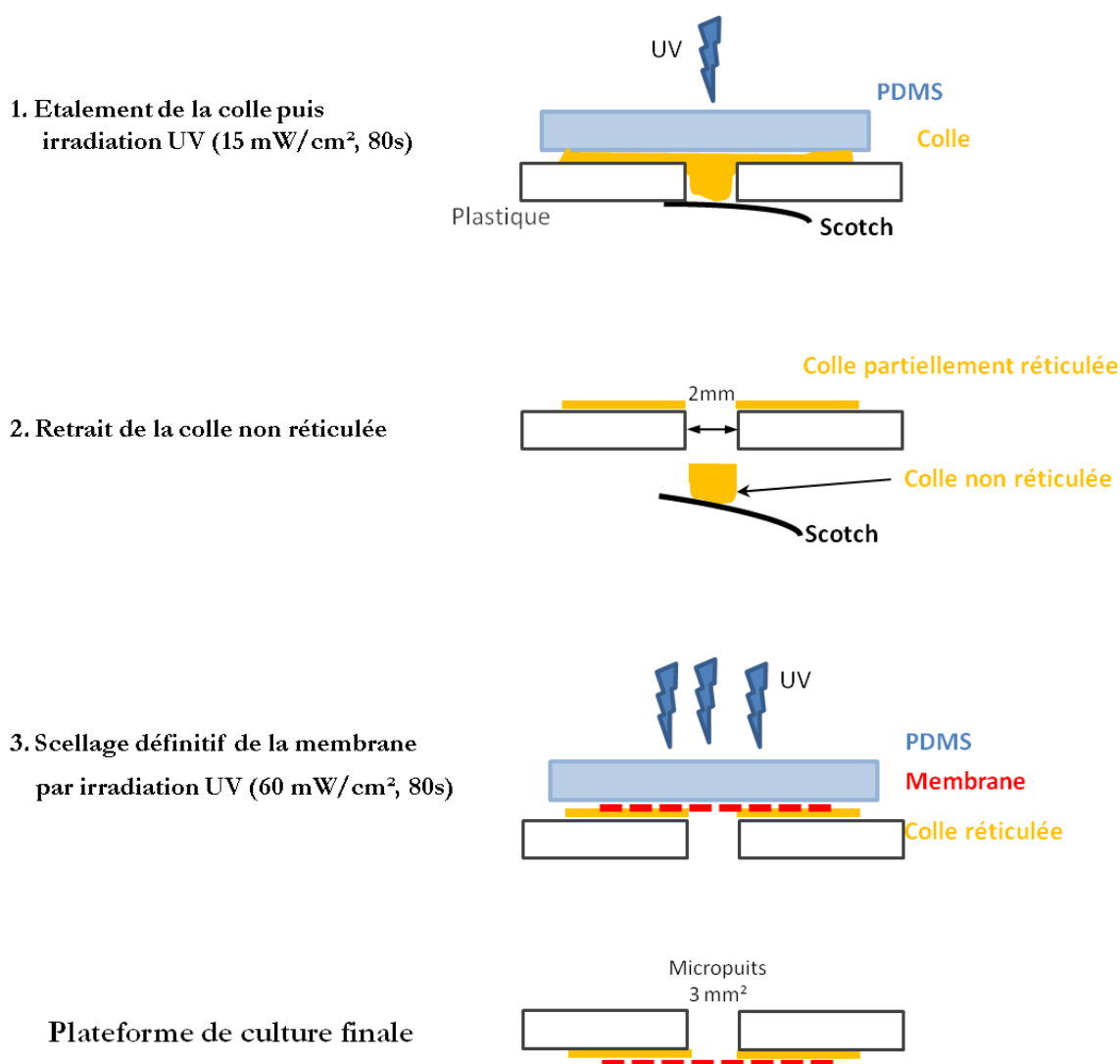


Figure 39. Méthode d'insertion de la membrane microporeuse servant de support à la culture par collage sous irradiation UV.

Un polymère liquide adhésif (Norland Optical Adhesive, NOA83H) réticulant sous l'action d'une lampe à rayons ultraviolets et faisant office de « colle » a été utilisé pour cette méthode de fabrication. Étendue à la base des micropuits de culture, la colle a été exposée à un premier rayonnement UV conduisant à sa réticulation partielle. La membrane microporeuse (en PET ou en PC) a ensuite été scellée à la base des micropuits de culture par application d'une nouvelle irradiation UV, conduisant à une réticulation complète de la colle. Un morceau de PDMS laissant passer les rayonnements UV a été utilisé provisoirement pour faciliter l'étalement de la colle et le dépôt de la membrane microporeuse à la base des micropuits de culture.

Cette méthode de scellage également réalisée sur des lames de verre n'a pas donné de résultats convaincants. Le verre étant plus hydrophile que le plastique, l'étalement de la colle en couche fine s'est avéré plus aisé qu'avec le plastique, néanmoins et pour ces mêmes raisons, nous n'avons pas trouvé de moyen efficace pour extraire proprement la colle partiellement réticulée ayant diffusée dans les micropuits.

La plateforme de culture en plastique après application de cette méthode de collage est présentée Figure 40a. L'observation des micropuits au microscope optique a montré une nette tendance de la colle à diffuser au sein de la membrane microporeuse, en bouchant les pores. Certains puits avec un scellage très net ont été obtenus mais de façon très aléatoire (Figure 40b). La colle NOA étant biocompatible après recuit et lavage, un essai de mise en culture a été réalisé. Les cellules Calu-3, cultivées pendant 15 jours (Figure 40c) ont atteint la confluence dans la totalité des micropuits testés. Néanmoins, le phénomène de diffusion de la colle NOA dans la membrane microporeuse ne permettant pas d'obtenir des micropuits avec une taille et une surface reproductibles, une autre méthode de fabrication a été testée.

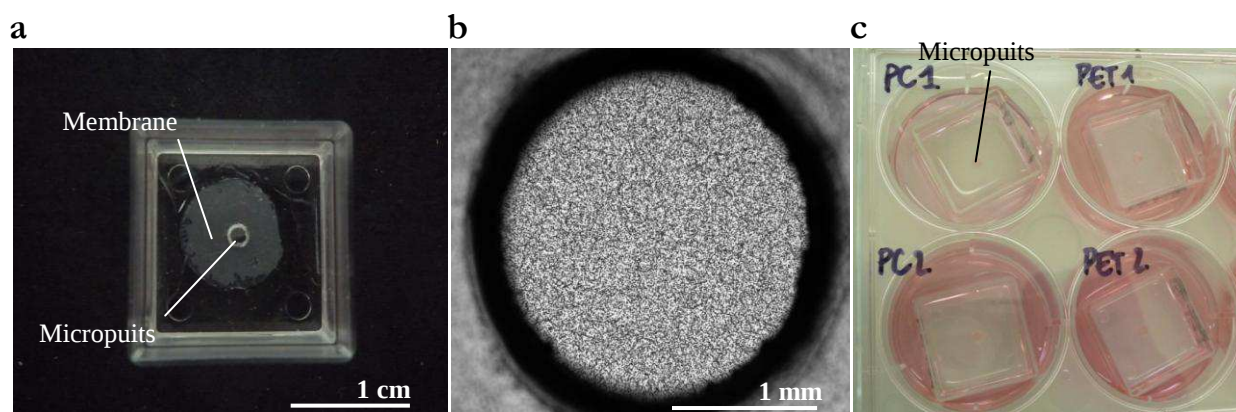


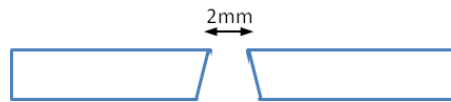
Figure 40. Compartiment culture simple monopuits en plastique. Intégration de la membrane microporeuse à l'aide de la technique de collage par réticulation UV. **(a)** Photographie du compartiment culture avec en son centre le micropuits (3 mm²) ; **(b)** Image du micropuits observé au microscope optique (membrane PC 0,3 µm); **(c)** Mise en culture : plusieurs compartiments culture sont disposés dans les puits d'une plaque 6 puits contenant du milieu de culture complet.

II.1.1.2. Collage thermique de la membrane

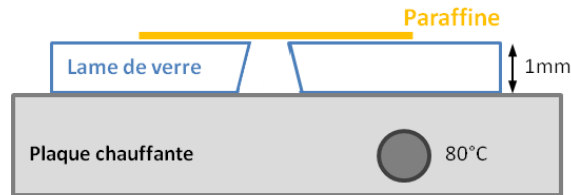
Une nouvelle méthode de fabrication a donc été mise au point en utilisant cette fois-ci un support en verre. Nous avons exploité pour cette technique les propriétés adhésives et thermoplastiques de la paraffine. Celle-ci possède en effet la capacité intéressante de pouvoir être ramollie par chauffage, puis re-solidifiée par refroidissement. Une fois optimisée, la fabrication de ces plateformes de culture en verre a été réalisée selon la succession des étapes résumées Figure 41 et détaillées plus amplement en Annexe A.2.2.

Pour cette méthode de fabrication, les micropuits ont dans un premier temps été créés dans des lames de verre de microscopie par perçage à la microbilleuse, créant des trous de profil conique de 2 mm de diamètre. Un film de paraffine (Parafilm®) a ensuite été chauffé pour créer son adhésion à la base des micropuits de culture. Après poinçonnage de la paraffine au centre des micropuits (1,2 mm de diamètre) et dépôt de la membrane microporeuse, un chauffage a de nouveau été réalisé, permettant le scellage de la membrane microporeuse par prise en masse dans la paraffine. Au même titre que la méthode de fabrication sous irradiation UV, un morceau de PDMS a été utilisé provisoirement pour faciliter le dépôt de la membrane microporeuse.

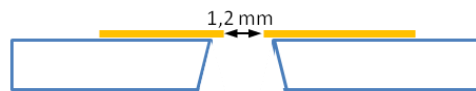
1. Perçage de la lame de verre à la microbilleuse



2. Chauffage de la paraffine



3. Poinçonnage de la paraffine au niveau des micropuits



4. Scellage définitif de la membrane par chauffage

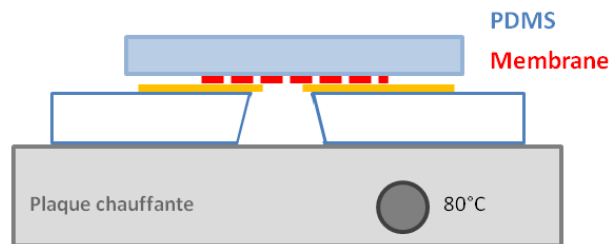


Figure 41. Méthode d'insertion de la membrane microporeuse servant de support à la culture par collage thermique à l'aide de paraffine.

Cette méthode d'insertion de la membrane microporeuse à la base des micropuits de culture a été sélectionnée en raison de ses meilleures performances que la technique de scellage par irradiation UV. La paraffine ne coule pas et ne pénètre donc pas les pores de la membrane. L'intégration de l'étape de poinçonnage de la paraffine avant le scellage de la membrane la rend standardisable, en assurant une taille de micropuits ou plus précisément une surface disponible pour la culture reproductible. Une image d'un micropuits obtenu après fabrication est illustrée Figure 42.

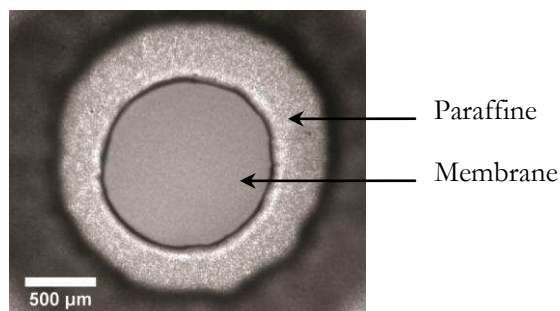


Figure 42. Image d'un micropuits après microfabrication par la méthode d'insertion de la membrane microporeuse par collage thermique. Image obtenue en microscopie optique. La membrane microporeuse (PET 0,4 μm) correspond au rond central, entouré d'une couronne de paraffine. Le contour de la membrane microporeuse apparaît bien net.

Cette technique de fabrication par collage thermique de la membrane microporeuse à l'aide de paraffine a présenté de nombreux avantages. Elle est en effet très simple d'exécution et ne nécessite que des matériaux bon marché et très facilement accessibles, et les différentes étapes de scellage de la membrane microporeuse peuvent être réalisées sur la paillasse.

De plus, dans une optique de parallélisation, l'intégration de nombreux puits sur une même lame de verre semble très aisée. Des lames de verre comportant jusqu'à 12 micropuits d'une surface de 1 mm² ont aussi été fabriquées sans aucune difficulté. Par ailleurs, l'utilisation du verre comme matériau principal rend ce compartiment culture réutilisable, il suffit alors de décoller la paraffine et nettoyer les lames de verre percées – le perçage étant l'étape la plus longue – pour remettre des membranes et lancer une autre expérience de mise en culture.

II.1.2. Support pour la plateforme de culture lors de la croissance des barrières cellulaires

Pour être utilisable, cette plateforme de culture en verre doit pouvoir reposer sur un support pour permettre l'alimentation basolatérale en milieu de culture des cellules cultivées dans les micropuits. La plateforme de culture (Figure 43a) a donc été complétée d'un *anneau circulaire* (Figure 43b) dessiné pour s'insérer dans une boîte de Petri standard de 60 cm². Cet anneau en poly(méthylméthacrylate) (PMMA), vide en son centre, comporte des encoches sur lesquelles est disposée la plateforme de culture. L'espace vide très important laissé sous la plateforme de culture a permis de créer un très grand réservoir de milieu de culture basolatéral commun pour l'ensemble des micropuits de la plateforme de culture.

La plateforme de culture en verre reposant sur son anneau en PMMA dans une boîte de Petri 60 cm² constitue la « *configuration culture* » du microsystème (Figure 43c), et sera utilisée jusqu'à

l'obtention de barrières épithéliales pulmonaires prêtes à être exploitées pour tester leur perméabilité vis-à-vis de différentes molécules.

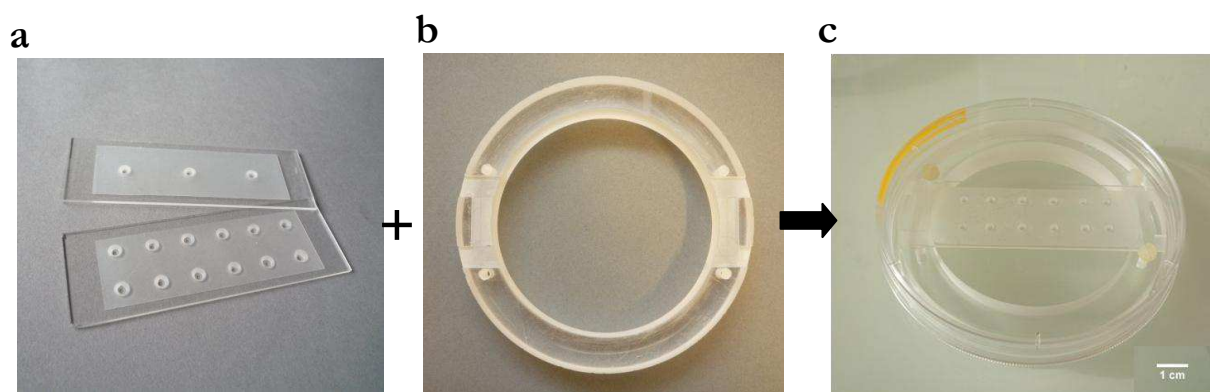


Figure 43. Plateforme de culture et son support dédiés à la culture de la barrière épithéliale pulmonaire.
(a) Plateformes de culture en verre à 3 et 12 micropuits (1 mm^2) ; (b) Anneau circulaire en PMMA sur lequel repose la plateforme de culture pendant la croissance des cellules ; (c) Configuration culture du microsystème : la plateforme de culture repose sur son support dans une boîte de Petri 60 cm^2 .

Dans la partie qui suit, nous détaillons l'optimisation du deuxième compartiment principal du microsystème évoqué au début de cette partie, à savoir le *support recueil* qui permettra de réaliser les études de perméabilité.

II.2. Support recueil à la plateforme de culture pour les études de perméabilité

Le support recueil est destiné à être associé à la plateforme de culture, le temps nécessaire pour effectuer les essais de perméabilité à travers nos barrières pulmonaires cultivées en micropuits (Figure 44). Une nouvelle fois, le PDMS se présente comme le matériau de choix pour ce compartiment. Il permettrait en effet, en adhérant facilement au verre, de créer une association temporaire aisée avec la plateforme de culture en verre. Mais en raison des problèmes d'adsorption qu'il engendre, un matériau plus classique a été choisi : le PMMA.

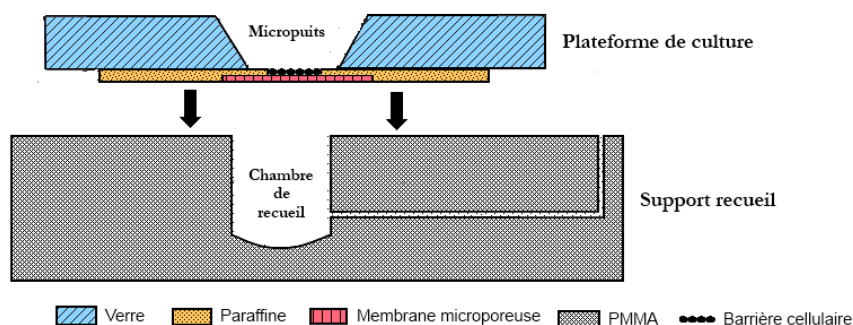


Figure 44. Vue en coupe de la plateforme de culture contenant les micropuits et du support recueil contenant les chambres de recueil envisagé pour réaliser les essais de perméabilité de molécules à travers les barrières pulmonaires.

II.2.1. Principe du support recueil

Afin de pouvoir assurer la parallélisation des tests de perméabilité, ce support doit contenir des éléments indépendants capables de recueillir les molécules passées à travers chaque barrière cellulaire cultivée dans les différents micropuits de la plateforme de culture. Le support recueil (Figure 45) est constitué d'un bloc en PMMA, dans lequel nous avons créé des chambres de recueil pour chaque micropuits de culture associé. Ouvertes sur l'extérieur, les chambres de recueil font office de réservoirs receveurs pour chaque micropuits de la plateforme de culture. Une première génération du support recueil a été fabriquée contenant 12 chambres de recueil pour être associée à une plateforme de culture à 12 micropuits. Chaque chambre de recueil a été reliée à un canal indépendant, percé dans le PMMA, et par lequel sont effectués les remplissages et retraits de milieu de réaction (canal d'alimentation). Les chambres et les canaux ont été réalisés à l'aide d'une perceuse.

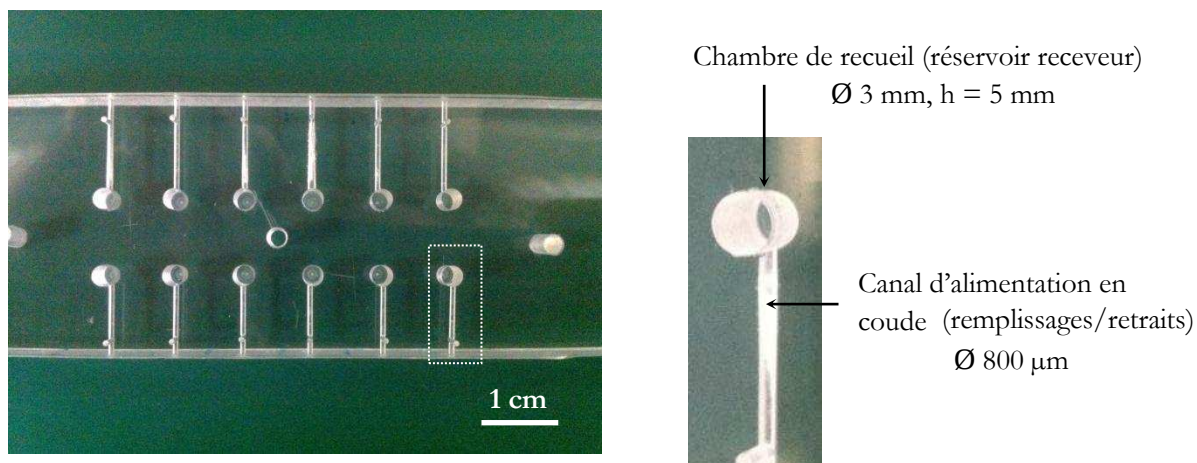


Figure 45. Support recueil dédié aux tests de perméabilité de molécules pour la 1^{ère} génération du microsystème comportant 12 micropuits.

II.2.2. Assemblage du support recueil avec la plateforme de culture

Il est important de comprendre dès à présent que pour réaliser les futures expériences de perméabilité, la plateforme de culture doit dans un premier temps être assemblée au support recueil. Les chambres de recueil seront ensuite alimentées en milieu de réaction par les canaux d'alimentation, à l'aide d'une micropipette munie d'un cône allongé pénétrant dans la partie verticale du canal (cf. Figure 45). Un compartiment donneur destiné à contenir les solutions à tester sera également créé au dessus des micropuits de culture, par simple dépôt d'un morceau de PDMS poinçonné (8 mm de diamètre) au niveau de chaque micropuits. Les solutions à tester vont être ensuite déposées dans chaque compartiment donneur. Le remplissage des chambres de recueil par le milieu de culture ou équivalent se fera donc une fois les barrières cellulaires présentes au dessus, fermant ainsi les chambres de recueil. Pour que le liquide puisse pénétrer par le canal d'alimentation vers la chambre de recueil, il faut que l'air présent soit évacué.

L'assemblage des deux compartiments entre eux devra être strictement étanche pour éviter toute fuite de liquide et assurer l'indépendance de chaque couple micropuits/chambre de recueil. Un bon assemblage sera conditionné par les trois paramètres suivants :

- (i) les deux compartiments devront être alignés et parfaitement maintenus l'un à l'autre ;
- (ii) chaque couple micropuits de culture/chambre de recueil devra être isolé de son voisin ;
- (iii) le remplissage des chambres de recueil sera possible si le système permet à l'air – présent dans le canal d'alimentation et les chambres de recueil – de s'évacuer.

Le système d'assemblage développé a consisté en premier lieu à ajouter plusieurs vis qui viennent maintenir les deux compartiments entre eux. Ensuite, des joints en PDMS s'articulant autour de chaque micropuits ont été ajoutés pour assurer l'étanchéité entre les deux compartiments et entre puits adjacents. Enfin, des canaux de fuite pour permettre l'évacuation de l'air ont été créés. Ces deux derniers points ont fait l'objet de plusieurs optimisations dont les différentes générations développées sont présentées ci-après.

L'efficacité des joints et la faisabilité du remplissage/retrait des chambres de recueil ont été évaluées en utilisant des plateformes de culture sans cellules, assemblées au support recueil. Différentes solutions colorées (rhodamine, bleu dextrane) ont été utilisées pour mettre en évidence les éventuelles fuites.

Les premiers joints testés ont été spin-coatés sur un moule microstructuré obtenu en lithographie UV ayant permis d'inclure un canal de fuite (largeur 100 μm , hauteur 54 μm) pour permettre l'évacuation de l'air lors du remplissage de la chambre de recueil (Figure 46a). Des joints de 200 μm d'épaisseur ont ainsi été obtenus. Une diffusion importante des solutions entre puits voisins a rapidement été observée lors des remplissages des chambres de recueil, et la répétition des remplissages/retraits des solutions dans les chambres de recueil n'était pas possible. Malgré un vissage de la plateforme de culture très léger, les canaux d'évacuation d'air très fins, intégrés dans les joints de PDMS situés sous la plateforme de culture, ont été écrasés et n'ont pas pu jouer leur rôle.

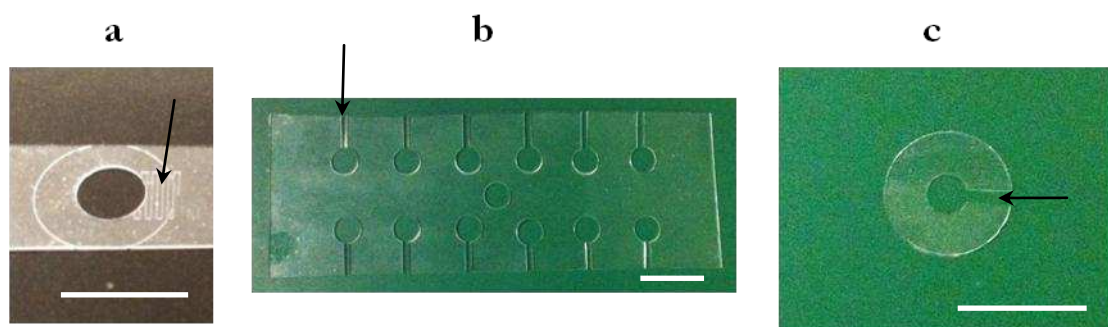


Figure 46. Différentes générations de joints en PDMS développées pour assurer l'étanchéité du microsystème lors de l'assemblage de la plateforme de culture à son support recueil. Les joints sont poinçonnés ($\varnothing$ 3,5 ou 4 mm) pour entourer chaque micropuits et les flèches indiquent les canaux de fuite créés pour permettre l'évacuation de l'air lors des remplissages des chambres de recueil. Les barres représentent 1 cm. **(a)** Joint spin-coaté de 200 μm d'épaisseur intégrant des canaux d'évacuation d'air en serpentins de largeur 100 μm et de hauteur 54 μm . **(b)** Joint d'épaisseur 1 mm, commun pour une plateforme de culture 12 puits. Les canaux d'évacuation d'air sont découpés manuellement au scalpel (1 à 2 mm de large). **(c)** Joint individuel spin-coaté (200 μm d'épaisseur), découpé manuellement sur le côté pour permettre l'évacuation de l'air (les canaux d'évacuation d'air étant en réalité gravés dans le support recueil lorsque ces joints ont été utilisés) (cf. Figure 19).

Nous avons donc testé des joints plus épais (1 mm) avec des canaux d'évacuation d'air bien plus larges (1 mm) (Figure 46b). Le premier remplissage s'est effectué sans problème, mais le liquide introduit dans la chambre de recueil s'est infiltré rapidement dans le canal d'évacuation d'air puis a diffusé vers les puits adjacents. Les canaux d'évacuation d'air, cette fois-ci trop larges, ont rendu impossible le retrait des solutions déposées dans les chambres de recueil.

Les canaux pour l'évacuation de l'air semblant jouer un rôle primordial dans les fuites observées, ceux-ci ont finalement été gravés à même le support en PMMA à l'aide d'une microfraiseuse (Minitech) (largeur 1 mm, profondeur 200 μm). Pour des raisons de simplicité, cette opération a été réalisée sur un nouveau support recueil comportant non plus 12 mais 3 chambres de recueil (Figure 47). Ouverts sur l'extérieur, ces canaux communiquent avec le sommet des chambres de recueil. Suffisamment écartés les uns des autres, ces nouvelles dimensions de canaux ont permis d'éviter toute diffusion de liquide d'un puits adjacent à l'autre. En étant gravés dans le PMMA, ces canaux ne se déforment pas et la présence de la plateforme de culture ne les obstrue pas. De nouveaux joints circulaires individuels spin-coatés (200 μm d'épaisseur) et découpés au niveau du canal d'alimentation (Figure 46c) ont été déposés autour de chaque chambre de recueil pour assurer l'étanchéité entre la plateforme de culture et le support recueil.

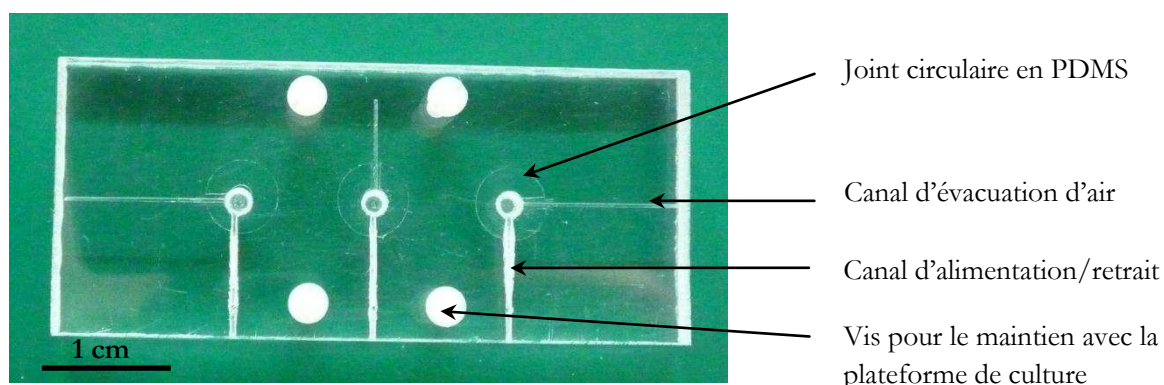


Figure 47. Support recueil réservé aux tests de perméabilité de molécules pour la 2^{ème} génération du microsystème comportant 3 puits.

A l'issue des différentes optimisations, cette deuxième génération du microsystème comportant 3 puits, a permis de conduire à un système étanche avec lequel il devrait être possible de réaliser des études de perméabilité. Un vissage léger des deux compartiments entre eux, complété de joints en PDMS très fins - déposés entre chaque micropuits de culture et sa chambre de recueil associée - ont permis de rendre le système totalement étanche. La présence de canaux de fuite gravés dans le support recueil pour permettre à l'air de s'évacuer, a permis de réaliser sans difficulté des remplissages/retraits répétés des chambres de recueil.

Cette nouvelle configuration, composée de la plateforme de culture 3 puits en verre vissée sur son support recueil constitue la « *configuration perméabilité* » du microsystème, et sera utilisée pour tester la perméabilité du modèle de barrière pulmonaire vis-à-vis de différentes molécules.

III. Culture miniaturisée : mise au point et caractérisation du microsystème

Les différents compartiments du microsystème ayant été optimisés, nous avons par la suite réalisé une série de mises en culture des plateformes de culture. Plusieurs types de membranes microporeuses insérées à la plateforme de culture selon la méthode de collage thermique ont dans un premier temps été testées, de type PET ou PC, disponibles dans le commerce ou découpées d'inserts Transwell®. Les performances des différentes membranes et la validation de la conformation des micropuits ont été évalués par observation et suivi au microscope du développement des tapis cellulaires cultivés dans les micropuits. Les barrières cellulaires Calu-3 cultivées en micropuits sous les conditions optimales sélectionnées ont ensuite été caractérisées, par suivi de la TEER, immunomarquage des tapis cellulaires et mesures de perméabilité au ¹⁴C-sucrose.

III.1. Essais de mise en culture

Les premiers essais de mise en culture ont été effectués sous la *configuration culture* du microsystème (générations 3 et 12 puits), selon les étapes détaillées en Annexe A.3.1. Les micropuits ont étéensemencés en déposant 10 µL de suspension cellulaire Calu-3 à 1×10^6 cellules/mL soit 10 000 cellules/cm². Le compartiment basolatéral formé par le support circulaire en PMMA sur lequel repose la plateforme de culture a été rempli avec 30 mL de milieu de culture complet.

Plusieurs types de membranes microporeuses ont été testés pour les premières mises en culture de nos systèmes. Tout d'abord, des membranes disponibles dans le commerce et possédant des propriétés semblables aux membranes constituant les inserts Transwell® que nous avons utilisées jusqu'ici ont été envisagées. Ces membranes commerciales, possédant une épaisseur et une taille de pores identiques (0,4 et 3 µm) et des matériaux similaires (PC ou PET) aux membranes Transwell® ont été testées (membranes Cyclopore en PC 0,4 µm de chez Whatman®, et membranes en PETE (PolyEster Track Etch) 0,4 et 3 µm de chez Sterlitech®).

L'observation des tapis cellulaires au microscope inversé a montré que les cellules Calu-3 se développaient très difficilement sur ces membranes commerciales. Les cellules ont semblé dans

un premier temps adhérer aux membranes, ont commencé à se diviser les premiers jours de culture, puis se sont arrêtées de croître très rapidement. Sur la Figure 48 on observe en effet que les cellules, qui apparaissent sous la forme de tâches marron sur les photographies, ne se sont que très peu développées après 8 jours de culture, et n'évoluent pour ainsi dire plus du tout entre les 8^{ème} et 14^{ème} jours après ensemencement.

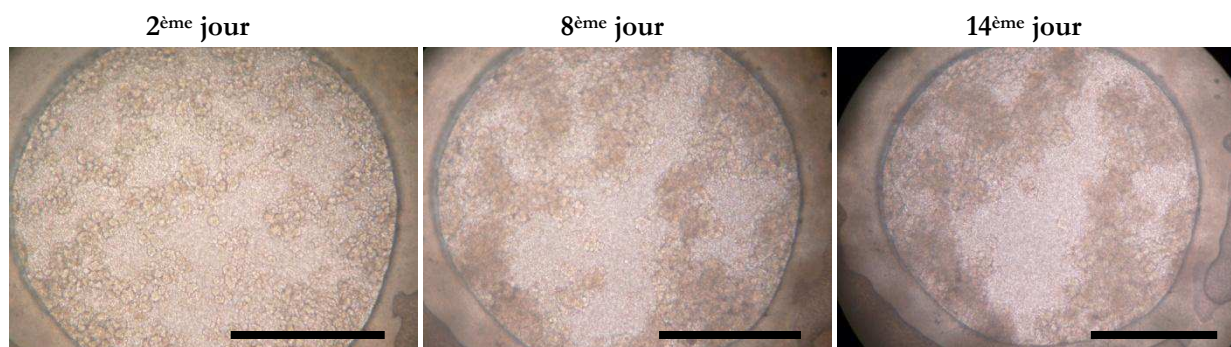


Figure 48. Cellules Calu-3 cultivées en micropuits sur membrane commerciale non traitée en PC 0,4 μ m (Cyclopore). Photographies prises au microscope optique inversé (grossissement X10). Les barres représentent 500 μ m.

Non destinées à la culture de cellules, ces membranes n'ont pas subies de traitement spécifique pour favoriser l'adhérence et la croissance cellulaire. Un traitement de ces membranes s'est donc avéré nécessaire. Pour ce faire, les membranes ont été traitées au plasma d'azote pour rendre leur surface hydrophile et favoriser l'adhérence cellulaire. Nous avons dans notre cas activé la surface des membranes microporeuses par plasma pendant 60s à 500 millitors. Ce traitement plasma a été réalisé sur la plateforme de culture finalisée. Au même titre que la membrane, la surface du verre a donc été rendue plus hydrophile. Cela s'est avéré problématique lors de l'ensemencement des micropuits, la grande mouillabilité au niveau des rebords des micropuits rendant le dépôt des gouttes de 10 μ L de suspension cellulaire impossible, celles-ci s'étalant sur le verre et ne pénétrant pas dans les micropuits.

Nous avons donc par la suite utilisé les membranes des inserts Transwell[®] pré-traitées (PC ou PET 0,4 μ m), après les avoir extraites de ces systèmes. Les cellules Calu-3 ont alors montré un comportement tout à fait satisfaisant. Nous avons constaté que les cellules adhéraient parfaitement à la membrane, se développaient très rapidement sur toute la surface disponible et atteignaient la confluence en seulement 7 jours, et ce sans changer le milieu de culture.

Compatibles avec notre méthode de microfabrication et facilement extraites des inserts Transwell®, ces membranes pré-traitées en PC ou PET ont donc été préférées aux membranes commerciales pour lesquelles une autre méthode de traitement spécifique aurait été nécessaire.

III.2. Caractérisation du microsystème final

Au terme de l'étude de caractérisation du modèle Calu-3 en systèmes Transwell®, ainsi que des essais préliminaires de mises en culture en microsystèmes, des membranes en PET 0,4 µm extraites d'inserts Transwell® ont été choisies pour la caractérisation du modèle de barrière en microsystème. Les raisons de ce choix sont les suivantes :

- observation au microscope optique inversé aisée en raison de leurs propriétés transparentes, condition indispensable au suivi de la croissance cellulaire en microsystème ;
- atteinte de la confluence rapide obtenue en microsystèmes (7 jours) et développement en systèmes Transwell® de propriétés bioélectriques (suivi par mesures de TEER) reproductibles d'une expérience à l'autre, en termes de valeurs maximales de TEER mesurées et délai d'atteinte de leur stabilisation.

Par la suite, nous avons mené une caractérisation approfondie de nos barrières épithéliales Calu-3 cultivées dans le microsystème optimisé, en comparant leurs propriétés bioélectriques, leurs morphologies, et leurs perméabilités vis-à-vis du marqueur paracellulaire ¹⁴C-sucrose à celles précédemment décrites en systèmes Transwell®. Ce travail a fait l'objet d'une publication intitulée « A microdevice for parallelized pulmonary permeability studies » récemment publiée dans le journal « Biomedical Microdevices » et présenté ci-après. Certains résultats présentés dans la publication seront rapidement discutés par la suite.

A microdevice for parallelized pulmonary permeability studies

Ludivine Bol^{1,2}, Jean-Christophe Galas³, Hervé Hillaireau^{1,2}, Isabelle Le Potier^{1,2}, Valérie Nicolas^{1,4}, Anne-Marie Haghiri-Gosnet³, Elias Fattal^{1,2}, Myriam Taverna^{1,2}

¹ Université Paris-Sud, Faculté de pharmacie, 92290 Châtenay-Malabry, France

² CNRS UMR 8612, Institut Galien Paris-Sud, Faculté de pharmacie, 92290 Châtenay-Malabry, France

³ CNRS UPR20, Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, 91460 Marcoussis, France

⁴ IFR 141-IPSIT, Université Paris-Sud, Faculté de pharmacie, 92290 Châtenay-Malabry, France

Biomedical Microdevices (2014) 16:277-285 DOI 10.1007/s10544-013-9831-3

Abstract

We describe a compartmentalized microdevice specifically designed to perform permeability studies across a model of lung barrier. Epithelial cell barriers were reproduced by culturing Calu-3 cells at the air-liquid interface (AIC) in 1 mm² microwells made from a perforated glass slide with an embedded porous membrane. We created a single basolateral reservoir for all microwells which eliminated the need to renew the growth medium during the culture growth phase. To perform drug permeability studies on confluent cell layers, the cell culture slide was aligned and joined to a collection platform consisting in 35 µL collection reservoirs connected at the top and bottom with microchannels. The integrity and functionality of the cell barriers were demonstrated by measurement of trans-epithelial electrical resistance (TEER), confocal imaging and permeability assays of ¹⁴C-sucrose. Micro-cell barriers were able to form confluent layers in one week, demonstrating a similar bioelectrical evolution as the Transwell systems used as controls. Tight junctions were observed throughout the cell-cell interfaces, and the low permeability coefficients of ¹⁴C-sucrose confirmed their functional presence, creating a primary barrier to the diffusion of solutes. This microdevice could facilitate the monitoring of biomolecule transport and the screening of formulations promoting their passage across the pulmonary barrier, in order to select candidates for pulmonary administration to patients.

Keywords

Cell culture microdevice, Calu-3 cells, Pulmonary epithelial barrier, Permeability assays, High-throughput, Transwell

1. Introduction

Delivery through the airways is a promising and noninvasive alternative to parenteral administration for therapeutic proteins and peptides which are poorly absorbed from the gastrointestinal tract (Agu et al. 2001; Patton 1996; Patton et al. 2004; Del Valle et al. 2009). Several features make the lungs attractive for systemic delivery of biomedicines: their large surface area, weak enzymatic activity, extensive vasculature and avoidance of the hepatic first-pass effect. One of the first barriers encountered by inhaled drugs is the airway epithelium, a thin polarized pseudostratified layer composed mainly of ciliated and mucus-secreting cells (Forbes 2000). The Calu-3 cell line, derived from human bronchial epithelium, has emerged over the past two decades as the most relevant pulmonary cell line reproducing the barrier properties of the native airway epithelium. When cultured on permeable supports at the AIC, Calu-3 cells form a polarized monolayer with functional tight junctions. In contrast to other bronchial cell lines (e.g. 16HBE14o-), Calu-3 cells secrete mucus and express most of the proteins and transporters present in the bronchial epithelium *in vivo* (Ehrhardt et al. 2002; Fiegel et al. 2003; Florea et al. 2003; Grainger et al. 2006; Haghi et al. 2010; Pezron et al. 2002; Stentebjerg-Andersen et al. 2011; Vllasaliu et al. 2011). Mathias *et al.* (2002) have also demonstrated that the *in vitro* permeability characteristics of Calu-3 cells correlate well with *in vivo* lung absorption. The Calu-3 cell line has been extensively used in conventional Transwell permeable culture systems for the evaluation of biomacromolecule cytotoxicity, uptake, transport and permeability (Baginski et al. 2012; Tréhin et al. 2004), usually in the presence of chemical permeability enhancers (Florea et al. 2006; Lewis et al. 2013) or nanoparticulate carriers (Ehrhardt et al. 2002; Lewis et al. 2013; Mura et al. 2011a, 2011b; Teijeiro-Osorio et al. 2009; Vllasaliu et al. 2012). Since epithelial cells are not the only cell type in the airway barrier, co-culture systems have also been developed to provide a more realistic assessment of the complex lung environment. For example, an elegant triple cell co-culture airway model has been used to study cellular uptake, penetration and inflammatory responses after exposure to nanosized particles (Rothen-Rutishauser 2005, Müller 2009). At the same time, the use of micro-scale cell culture systems in the field of drug delivery and testing is emerging (Wu et al. 2010; Yeo et al. 2011). Miniaturization allows many assays to be performed in parallel and thereby permits high-throughput screening of potential drug candidates at a reduced cost. Microfluidic technology has been largely exploited to study and to reproduce *in vitro* the physiological and functional microenvironment of biological cell barriers. An increasing number of microfluidic cell-based systems mimicking epithelial or endothelial cell barriers have been developed. In particular, models of intestinal (Gao et al. 2013; Imura et al. 2009; Kimura et al. 2008), renal (Baudoin et al. 2007), vascular (Shao et al. 2010; Yeon et al. 2012), blood-brain

barrier (Booth and Kim 2012; Prabhakarapandian et al. 2012), airways (Douville et al. 2011; Huh et al. 2007; Tavana et al. 2011) and alveolar-blood barrier (Huh et al. 2010) have been described. These miniaturized cell culture platforms have been used to culture and monitor the behavior of cell monolayers for toxicological and metabolic studies, to evaluate the effects of drugs on cells and to monitor disease environments. Several microfluidic systems design to monitor or study drug transport across barrier models have been reported (Gao et al. 2013; Imura et al. 2009; Shao et al. 2010; Yeon et al. 2012; Young et al. 2010). Most of these require frequent medium renewal (daily or every two days), despite the use of channel connections allowing cell culture under flow conditions. Moreover, the majority of these microsystems contain a single culture chamber, which limits the high throughput possibility of the devices. Furthermore, only a few studies have been focused on the modeling of the pulmonary barrier. *In vitro* pulmonary models were principally developed to better understand the mechanisms involved in various lung diseases. Microdevices used for functional studies were based on long-term airway culture under perfusion conditions (Nalayanda et al. 2010), or for exploring cell damage and epithelial repair mechanisms (Felder et al. 2012), lung injury under shear stress (Tavana et al. 2011) or under conditions similar to mechanical breathing movements (Huh et al. 2007, 2010). Most of these systems recreated *in vitro* alveolar models in microfluidic devices by culturing A549 cells, which, unlike Calu-3 cells, are unable to form functional tight junctions and thus are not suitable for *in vitro* permeability studies. To the best of our knowledge, miniaturization technology has not yet been applied to pulmonary drug screening.

In this paper, we present a miniaturized device developed to perform parallelized permeability studies across a model of the airway epithelium, using the human bronchial Calu-3 cell line for the first time. The design, fabrication and characterization of this microdevice with two independent compartments, are detailed. We then evaluated the ability of the micro-scale environment to produce a functional and efficient epithelial barrier using a combination of staining methods, microscopy, trans-epithelial electrical resistance measurements and the permeability of ^{14}C -sucrose.

2. Materials and methods

2.1 Microdevice design and fabrication

The microdevice contains two independent compartments (Fig. 1): a cell culture slide on the top and one lower compartment containing the culture medium. This latter compartment can have two configurations: one used during cell growth and the other for permeability studies, leading

to two microdevice configurations called “permeability configuration” or “culture configuration”. In the culture configuration, the epithelial cell barrier is created in the upper compartment called “culture platform”, which is placed on a polymethyl methacrylate (PMMA) ring within a Petri dish, providing a single basolateral compartment of culture medium for the whole platform. For the permeability configuration designed for drug transport studies, the top compartment is placed on a “collection platform” which is composed of several microchambers which act as receiver compartments aligned with each of the microwells of the culture platform. In addition, two generations of the microdevice were developed. The first generation comprised only 3 wells for the culture platform and 3 microchambers for permeability studies. The large distance between two wells greatly facilitated the permeability studies experiments, and we never observed any cross leakage. The second generation contained 12 wells and microchambers in a more closely spaced pattern.

2.1.1 Cell culture platform

The cell culture platform consisted of a perforated glass slide with embedded porous membrane, thus giving a multiwell cell culture plate (Fig. 1a, b). Conic, 2 mm diameter holes were first drilled in a 1 mm thick microscopy glass slide using a sandblaster. A piece of paraffin film was bonded to the glass slide by heating (80°C, 1 min). After cooling, 1.2 mm holes were punched in the paraffin film in the center of the glass holes. Microporous membranes were then placed onto the paraffin and a second heating step (80°C, 2 min) was used to definitely seal the membrane to paraffin film/glass slide assembly. We bonded several types of membranes made either of polyester (PET) or polycarbonate (PC) with various pore sizes. For the experiments presented here, we used porous PET membranes with 0.4 μ m size pores cut from Transwell inserts (Corning Corning, Corning Incorporated, NY, USA). The available surface for cell culture was 1.13 mm² for each microwell (Fig. 1a). The cell culture platforms were finally washed with water and sterilized with 70% alcohol. During the growth phase, the multiwell glass plate was maintained in the Petri dish using a custom-made PMMA ring; this was the culture configuration of the microdevice.

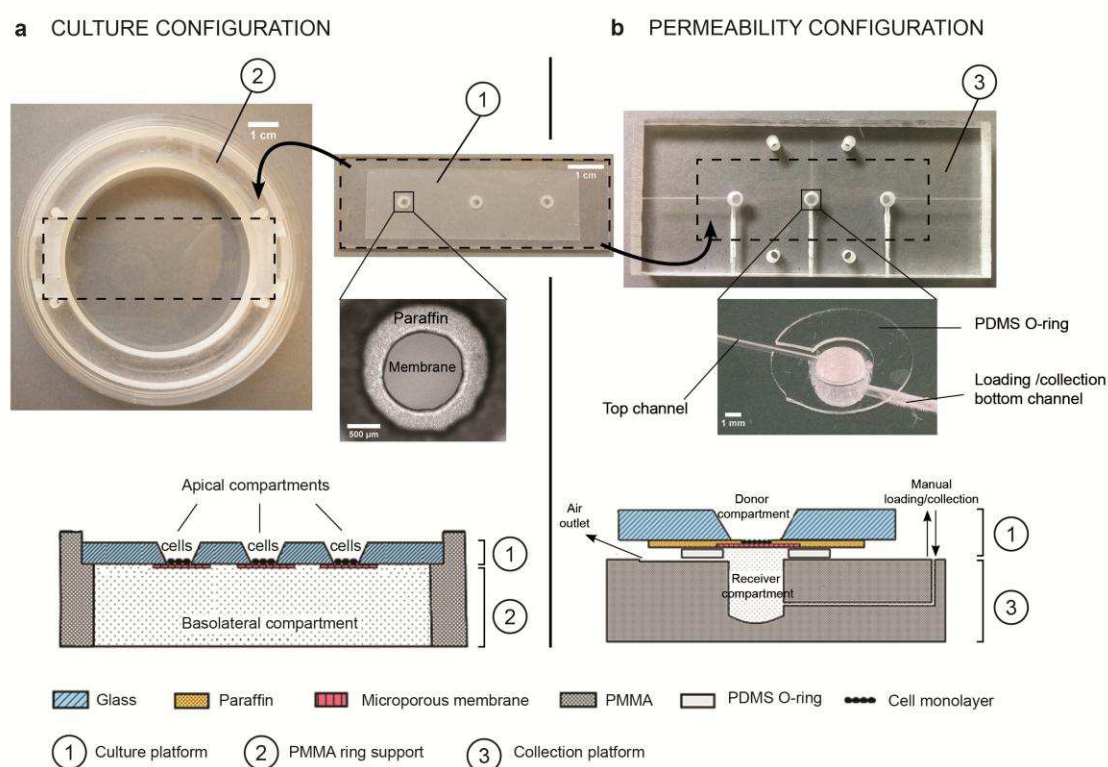


Fig.1 First generation of the microdevice designed for drug transport studies across the Calu-3 cell epithelial barrier. (a) Culture configuration (*left*): image of the culture platform at the top (①) with an inset showing one culture microwell, and its PMMA ring support (②); Schematic cross-section of this configuration at the bottom; (b) Permeability configuration (*right*): image of the collection platform at the top (③) with an inset of a receiver chamber; Schematic cross-section of this configuration with the culture platform (①) aligned with the collection platform (③) at the bottom

2.1.2 Collection platform

The collection platform was made of PMMA, and designed to fit to the culture well platform (Fig. 1c). It consisted of 35 μL collection reservoirs (drilled holes, 3 mm in diameter and 5 mm deep) connected at the top and bottom with microchannels. The bottom channel was 800 μm in diameter and was used to load and collect samples with a micropipette. The top channel (width 1 mm, depth 200 μm) acted as air outlet and allowed repeated basolateral sample loading and collection without pressure increases or bubble generation during the permeability assays.

2.1.3 Compartment assembly

To perform drug permeability studies when the monolayer reached confluence, the cell culture platform and the collection platform were aligned and joined together with screws and thin circular poly(dimethylsiloxane) (PDMS) O-rings (permeability configuration, Fig. 1c, d). PDMS was prepared by mixing pre-polymer and crosslinker at a weight ratio of 10:1. PDMS was spin-coated at 300 rpm for 60 s and finally baked for 2 h at 70°C in order to obtain a 200 µm thick layer. This layer was cut into O-rings to fit the collecting reservoirs (external diameter 10 mm, inner diameter 3.5 mm). A notch was made in each to prevent obstruction of collection platform top channels when the assembly was tightened up.

2.2 Calu-3 cell culture

Calu-3 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC no. HTB-55) and maintained at 37°C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere. Cells were cultured in T-75 flasks, in Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM, Lonza, Belgium) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Lonza, Belgium), 50 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin. Calu-3 cells were subcultured before reaching confluence using a 2.5X trypsin versene solution (Lonza, Belgium) in Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, Lonza, Belgium). Medium was changed twice a week and cells were passaged weekly at a 1:3 split ratio.

For conventional Transwell culture, Calu-3 cells were grown using AIC in Transwell inserts of 1.12 cm², consisting of either PC or PET membranes with a pore size of 0.4 µm (Costar Corning, Corning, UK). Cells were seeded at a density of 2.7×10^5 cells/cm². The apical medium was removed 24 h after seeding, after which only basolateral medium was refreshed every two days.

For micro cell culture, the culture configuration microdevice was used. A 10 µL droplet (1×10^6 cells/mL) was deposited into each microwell leading to an equivalent seeding density to that of the Transwell systems. A thorough homogenization of the cell suspension was performed between filling each microwell to ensure repeatable seeding. The basolateral compartment was then filled with approximately 30 mL of feeding medium which did not require renewal during the entire culture period. The Petri dish was then closed with a lid, to avoid any evaporation during incubation. 24 or 48 h after seeding, the few remaining microliters of apical medium in each microwell were gently removed, to ensure AIC conditions.

2.3 Electrical measurements

The TEER of Calu-3 cell layers was measured over time using an EVOM Voltohmmeter with STX-2 chopstick electrodes for Transwell experiments and STX-3 chopstick electrodes for miniaturized experiments (World Precision Instruments, Inc., FL, USA). Prior to Transwell resistance measurements, the apical side and basolateral side medium were refreshed with pre-warmed medium. For the miniaturized device, TEER measurements were performed using the culture configuration. A piece of PDMS drilled with 8 mm diameter holes was placed on the top of the platform to create apical compartments above each Calu-3 micro layer. The basolateral medium was not refreshed. In both cases, Calu-3 cell layers were equilibrated for at least 15 min at 37°C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere. Resistance values were measured for up to 15 days. TEER was calculated by subtracting the resistance of a blank insert or a blank microwell, and corrected for the surface area of the culture. For Transwell experiments, measurements were performed in 6 different wells, one measurement per well, and data points were estimated by the mean of the 6 values. For microwell experiments, measurements were performed in triplicate in 2 or 3 different wells. An average of the 3 values was calculated per well and data points were estimated by the mean of these average values.

2.4 Permeability studies

Radiolabeled ¹⁴C-sucrose (Perkin-Elmer, France) was used to assess the paracellular permeability of Calu-3 cell layers as a measure of barrier integrity. For both Transwell and microwell experiments, the transport of ¹⁴C-sucrose in the apical-to-basolateral direction was monitored for 1 h, and one permeability coefficient was calculated per well. Before experiments in Transwell inserts, complete culture medium in the basolateral compartments was refreshed (1.5 mL). In microwells, the receiver microchambers of the collection platform were filled with 35 µL of medium without FBS to avoid bubble formation. Cells were incubated at least for 15 min at 37°C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere to equilibrate them. At the initial time (t=0), 500 µL and 150 µL of ¹⁴C-sucrose solution (0.1 – 3.4 µCi/mL) was added to the apical (donor) compartments of Transwell inserts and microwells, and cells were immediately incubated at 37°C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere. The entire contents of the basolateral (receiver) compartments were withdrawn at t=15, 30 and 60 min, and the entire contents of the apical compartments were withdrawn at t=60 min. Between each time point, Transwell inserts were placed in new wells containing 1.5 mL of fresh medium while each receiver microchamber was resupplied with 35 µL of fresh medium. A sample of the initial radioactive solution and collected samples were transferred into scintillation vials to which 10 mL of scintillation fluid (Ultima Gold™, Perkin-

Elmer, France) was added, and radioactivity was counted in a liquid scintillation counter (Beckman-LS 6000SE Series, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA).

The apparent permeability coefficient (P_{app} , cm/s) of the paracellular transport was calculated using the following equation:

$$P_{app} = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \left(\frac{1}{A C_0} \right)$$

where dQ/dt is the ^{14}C -sucrose transfer rate, A is the surface area of the membrane culture support, and C_0 is the initial concentration in the donor compartment.

The TEER was measured prior to each experiment.

2.5 Fluorescent staining of cells and confocal imaging

Cells were briefly washed in DPBS and fixed at room temperature in 3.7% formaldehyde in PBS for 15 min. After washing steps in DPBS, the cells were treated with 50 mM NH_4Cl for 10 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in DPBS for 5 min and then blocked for 1 h at room temperature with DPBS containing 0.2 % gelatin and 10 % FBS. For tight junction labeling, cells were incubated with rabbit anti-ZO-1 IgG (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in DPBS-0.2% gelatin) (Zymed, France) for 2 h, washed in DPBS containing 0.2% Tween 20, incubated with FluoProbes® 488 Donkey anti-rabbit IgG (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in DPBS containing 0.2% gelatin) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, USA) for 1 h and then washed in DPBS containing 0.2% Tween 20. For filamentous actin (F-actin) labeling, cells were incubated with Phalloidin-FluoProbes® 547H (5 U/mL in DPBS) (Interchim, France) for 45 min and washed in DPBS containing 0.2% Tween 20. Antibodies and phalloidin incubations were performed at room temperature under gentle shaking in a humidified atmosphere. The microporous membranes were cut from their plastic support in Transwell experiments, whereas those in microwell experiments could be peeled off from their glass supports. Membranes were transferred to microscope slides and mounted in Vectashield medium (Vector Laboratories, Inc., CA, USA). The slides were examined with a Zeiss LSM-510 confocal scanning laser microscope equipped with a 30 mW argon and a 1 mW helium neon lasers, using a Plan Neofluar 10x (NA 0.3) and a C-Apochromat 40x objective lens (NA 1.2, water immersion). Red fluorescence was observed with a long-pass 560 nm emission filter and under a 543 nm laser illumination. Green fluorescence was observed with a band-pass 505-550 nm emission filter and under 488 nm laser illumination. Stacks of images were collected every 0.45 μm to 5.80 μm along the z axis.

3. Results and discussion

In order to determine the reliability of our miniaturized *in vitro* system, Calu-3 cell layers grown on Transwell systems were used as a reference. The barriers properties (bioelectrical properties, morphology and paracellular permeability) of the cells cultivated in the two systems were compared. To evaluate drug transport accurately, it is essential to work on confluent layers exhibiting an effective adhesion between neighboring cells in order to limit paracellular transport. This integrity depends on the presence of the lateral intercellular tight junctions (Godfrey 1997). The integrity and restrictiveness of the barrier obtained from Calu-3 cells were thus assessed in the two systems by a combination of three different techniques: (i) trans-epithelial electrical resistance (TEER), which reflects the paracellular flow of ions; (ii) permeability of sucrose, a marker of the paracellular route; and (iii) staining of tight junction protein ZO-1 which restricts the paracellular flow of most of the solutes and compounds.

3.1 Bioelectrical properties of Calu-3 cells barrier

The bioelectrical properties of Calu-3 cell layers were evaluated over time by measuring the TEER for up to 15 days after seeding (Fig.2). Generation of bioresistance followed similar kinetics in microwells and Transwell systems. As generally observed under AIC, a few days of culture after the seeding were necessary to generate a measurable TEER, after which resistance values increased to a plateau maintained throughout the culture period (Ehrhardt et al. 2002; Foster et al. 2000; Grainger et al. 2006). In both systems, we observed that the evolution of TEER values closely reflected the extent of cell coverage during the period up to confluence as observed by light microscopy. Total confluency was assumed when medium leakage from basolateral to apical side stopped completely for all wells seeded. This situation was reached after 5 to 8 days in both systems in correlation with the maximal TEER values attained before the plateau. However, the TEER values of Calu-3 cells were generally six times higher in Transwell systems (300-400 $\Omega\cdot\text{cm}^2$) than in microwells (50-60 $\Omega\cdot\text{cm}^2$). This cannot be explained by the different culture surface areas alone. Several factors may have influenced these measurements. The major one is the positioning of the electrodes which was not the same in the two systems. The distance between electrodes was in fact higher for microwells. Moreover, the sets of electrodes used for the two systems differed in size. Medium volumes and culture surface/volume ratios may also influence measured TEER values.

The curves depicted in Fig. 2b clearly show that the miniaturization of the culture does not perturb Calu-3 cells behavior and development, and allows well-defined confluent epithelial cell

layers to be obtained. The standard errors were found to be higher in microwells compared to those in Transwells but this was attributed to the culture configuration of the microdevice, which is more sensitive to manual electrode positioning than in Transwell systems.

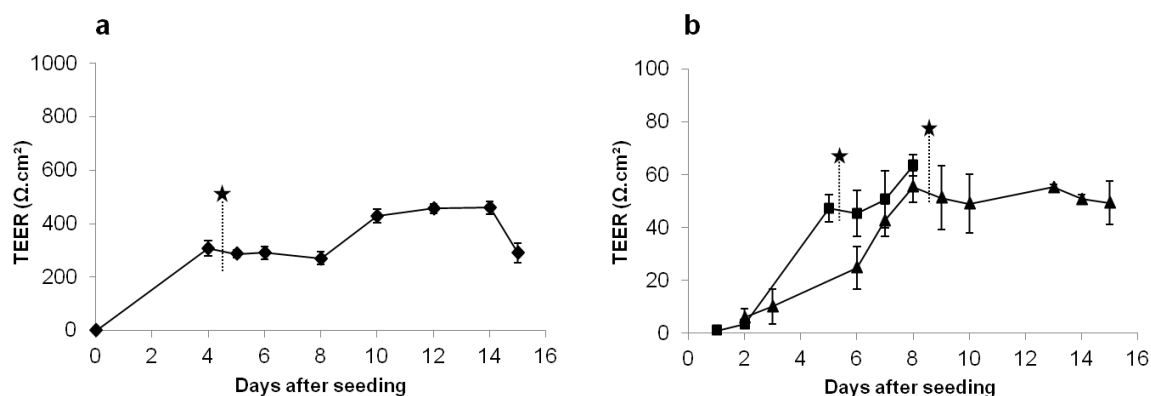


Fig.2 Trans-epithelial electrical resistance (TEER) of Calu-3 cells plotted as a function of time for culture performed in Transwell systems (a) or in microwells (b). Calu-3 cells were grown on 0.4 μm pore size PET membrane. Each curve represents one single culture experiment. Data points represent the inter-well mean TEER values $\pm$ standard error estimated from $n=6$ wells for (a); $n=2$ or 3 wells for (b). Stars indicate the day at which confluence was observed visually

3.2 Cell layer morphology

The morphology of the Calu-3 layers formed in the microwells was explored by confocal laser scanning microscopy after staining of either ZO-1 protein or filamentous actin (F-actin). F-actin is an essential component of the cytoskeleton and plays an important role in the generation and maintenance of cell morphology. Staining of F-actin was used to evaluate the extent of cell coverage at different time points during culture and to determine the day of confluence. ZO-1 protein is one of the numerous proteins involved in the junctional complexes and was stained to evaluate the establishment of tight junctions between adjacent cells. Homogeneity and tightness of the cultured epithelium were followed at three different times in Transwell systems (before, after and during confluence), and evaluated on the day of total confluence in microwells. For each time point, one sample well was selected at random and TEER was measured before staining. F-actin staining revealed that several days before confluence (Fig. 3a), a considerable part of the Transwell filter area was not colonized by the cells, explaining the low TEER value measured ($<100 \Omega \cdot \text{cm}^2$). The confluence was confirmed when images revealed homogenous cell

layers all over the Transwell filters (Fig. 3d, g). At that time, ZO-1 distribution appeared as continuous belts along the cell-cell interface (Fig. 3e, h), indicating that tight junctions were correctly expressed as soon as the confluence was established, with a mean TEER value of $301 \pm 60 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n=12$). Confocal images showed similar Calu-3 cell layer morphology in different microwells (Fig. 3j-o) indicating that the culture was reproducible from well to well.

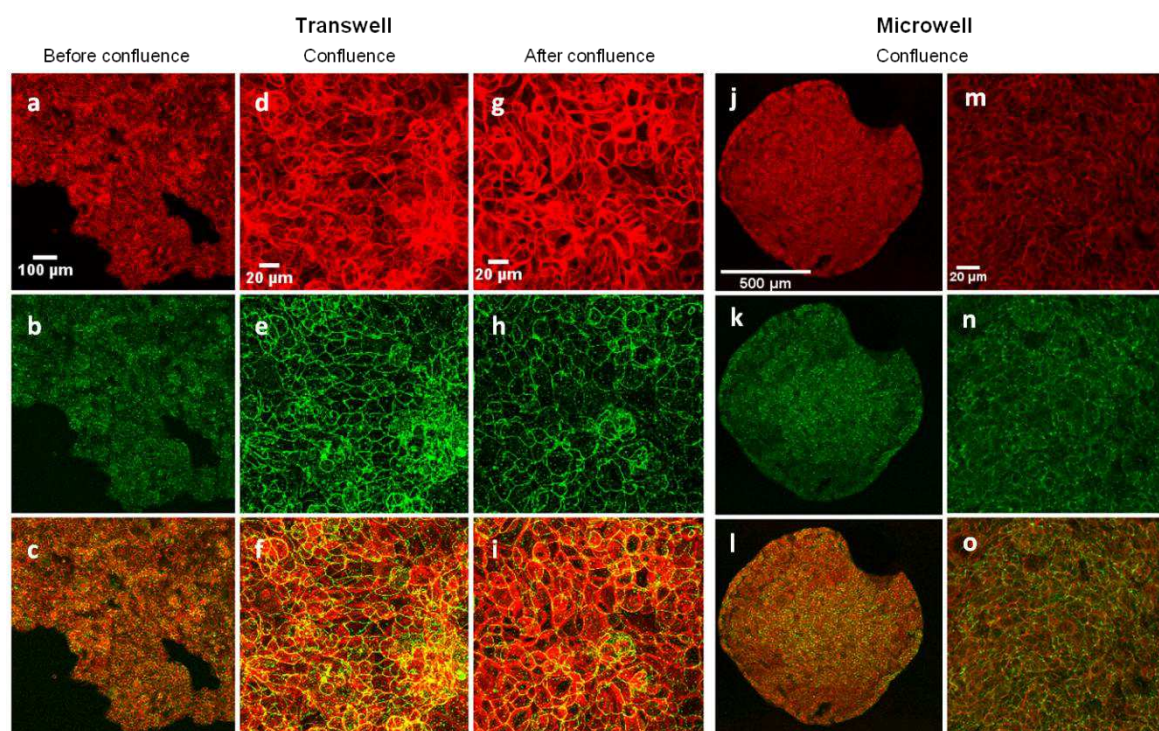


Fig.3 Confocal laser microscopy images of Calu-3 cells grown on Transwell filters (a-i) and on microwells (j-o). Transwell staining was performed before confluence (a-c), at visual confluence state (d-f) and after confluence (g-i). Microwells staining was performed at visually observed confluence: overview (j-l) and zoom-in view (m-o) of the microwells. F-actin labeling is shown in red (first row) and ZO-1 protein labeling in green (second row). The third row shows merged images from the two first rows

In both conditions, confocal observation of Calu-3 cell layers revealed also that Calu-3 cells did not tend to form a strict monolayer, but rather a pluristratified layer in some parts of the membrane, and surprisingly, sometimes even before total confluence was reached. This has been already reported by Stentebjerg-Andersen et al. (2011) and Grainger et al. (2006) who both attributed this observation to the AIC culture condition. The overall thickness of cell layers grown in Transwell systems (Fig. 4) was estimated at 40-60 μm at confluence (average calculated

from 4 measurements at different places in each well). This value is in accordance with the size of ciliated cells (20-60 μm tall), reported elsewhere (Florea et al. 2003). This thickness considerably increased with time up to more than 80-100 μm , only 5 days after confluence. An average thickness of around 50 μm was observed at confluence in both systems, but Calu-3 cells grew more at the periphery of the microwells where the thickness could attain 90 μm . As described previously, the TEER values did not increase once confluence had been established, but remained stable over time (Fig. 4). Taken together, these results indicate the limited reliability of the TEER technique to assess the tightness of Calu-3 cell layers after total confluence. It can be concluded that the TEER measurement technique is unable to differentiate between a tight monolayer and a thick pluristratified layer.

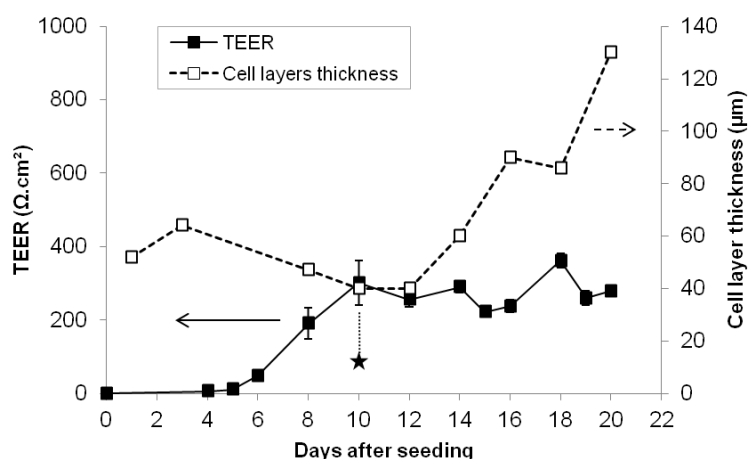


Fig.4 Transepithelial electrical resistance (full line, left y-axis) and overall thickness (dotted line, right y-axis) plotted as a function of time in culture of Calu-3 cell layers grown on Transwell inserts. Stars indicate the day which confluence was observed visually

3.3 Paracellular permeability of ^{14}C -sucrose

Sucrose was used as a marker of paracellular transport. This hydrophilic compound is mainly transported passively through tight junctions and intercellular spaces. A low permeability would be expected when functional tight junctions are present. In Transwell systems, permeability was evaluated on 6 consecutive days, before and after the cells had formed confluent layers. We found an overall inverse correlation between TEER and apparent permeability coefficients (P_{app}). Once the cells reached confluence (at 7 days), the TEER stabilized while the P_{app} slowly

decreased, with a mean value of $5.5 \pm 2.6 \times 10^{-7}$ cm/s (n=12). On Calu-3 cells, similar P_{app} values ($< 10 \times 10^{-7}$ cm/s) have been reported for other hydrophilic paracellular markers such as mannitol, Na-fluorescein and Lucifer Yellow (Ehrhardt et al. 2002; Fiegel et al. 2003; Foster et al. 2000; Grainger et al. 2006; Haghi et al. 2010; Mathias et al. 2002; Pezron et al. 2002; Stentebjerg-Andersen et al. 2011; Wang et al. 2011). For miniaturized experiments, the permeability configuration of the microdevice was used. The high permeability of ^{14}C -sucrose across the membrane alone (controls without cells) confirmed that the microwell design does not limit the ^{14}C -sucrose flow rate (Table 1). This confirmed that the thermal bonding did not modify the membrane porosity. As expected, ^{14}C -sucrose transport across cell layers was found to be slow and linear. In addition, the profiles of the amounts of ^{14}C sucrose transported as a function of time showed very good correlation coefficients ($r^2=0.95$ to 0.99). However, the P_{app} across confluent Calu-3 cell layers cultured in microwells were significantly higher than that observed in Transwells, while control permeabilities were similar for both systems (Table 1). Supported by the results described above of TEER values and ZO-1 labeling, showing that miniaturized cell barriers were perfectly formed at confluence, we hypothesized that this difference could be due to the suction force applied to remove basolateral samples from microchambers. Indeed, the small size of the lower collecting channels and presence of a confluent cell layer would create a pressure which would facilitate ^{14}C -sucrose passage from the donor to receiver compartment. Complementary experiments were thus performed during which the suction force was avoided, by directly collecting basolateral samples from the microchambers, after the culture platform had been detached from the collection platform. As expected, the observed P_{app} decreased threefold factor, confirming the important contribution of the suction force to the increase of ^{14}C -sucrose permeability (Table 1). We are currently working to improve this collection platform to avoid this phenomenon. Indeed, the final objective of this work is to conceive a new generation of microdevice integrating a third compartment, which will allow the on-line quantification of transported molecules and will thereby remove the need to collect medium. We also observed that the use of a higher ^{14}C -sucrose concentration led to an increase of P_{app} , according to the first Fick's law. Experiments carried out in Transwell systems showed a threefold increase of P_{app} when a concentration of $3.4 \mu\text{g/mL}$ was used instead of the $0.1 \mu\text{g/mL}$ initial concentration (Table 1). In conclusion, P_{app} values obtained at the miniaturized scale confirmed that the environment of the microwells enabled an efficient epithelial barrier to be formed, which exhibited the expected permeability properties toward sucrose.

Apical concentration	P_{app} ($\times 10^{-7}$ cm/s)			
	Transwell		Microsystem	
	0.1 μ g/mL	3.4 μ g/mL	3.4 μ g/mL	
			With suction force	Without suction force
Controls without cells	164 $\pm$ 46	-	433 $\pm$ 222	321
Before confluence	89.9 $\pm$ 14.2	-	-	-
At confluence	8.4 $\pm$ 1.7	-	-	-
After confluence	4.1 $\pm$ 1.6	13.1 $\pm$ 2.5	60.9 $\pm$ 30.9	19.6 $\pm$ 4.4

Table 1. Apparent permeability coefficients (P_{app}) of 14 C-sucrose measured in the apical-to-basolateral direction across Calu-3 cell layers grown in Transwell systems and in microwells

4. Conclusion

In this work, we have developed a microdevice dedicated to permeability studies across a model of the pulmonary epithelial barrier. The microdevice contains a series of 1 mm² microwells (100 times less than conventional Transwell systems) in which bronchial human Calu-3 cells were grown on microporous membrane at an air-liquid interface. In comparison with the Transwell systems used as the gold standard for *in vitro* drug absorption studies, the reliability of the microdevice in its two configurations was successfully demonstrated. We confirmed that the microfabrication process and the design of the microwells offered a suitable culture environment for Calu-3 cells development. In the microwells, Calu-3 cells formed confluent and functional epithelial layers in only one week without the need for medium renewal. Cells developed bioelectrical properties similar to those observed in Transwells, and the cultured epithelium demonstrated a good integrity once the cells had formed confluent layers, with homogeneous distribution of tight junctions throughout the surface of the microwells. The low permeability of 14 C-sucrose confirmed the restriction of paracellular flow due to the presence of functional tight junctions. This system offers the advantage of considerably simplifying the cell culture maintenance as no medium changes are required during the growth phase. In addition, simple and rapid microfabrication techniques were employed to develop this compartmentalized microdevice which does not require any external pumps, tubings or apparatus. This novel microdevice allows independent and parallel drug transport experiments and provides a high-throughput screening system to study active biomolecule transport in the context of pulmonary administration. This device is a first step toward the development of a fully integrated

microplatform associating the cell culture and the medium collection platforms with a microanalysis system in order to perform on-line quantification of transported biomolecules.

Acknowledgments

The authors would like to thank Simona Mura (Institut Galien Paris Sud) for her kind help and expertise in Calu-3 cells culture, and Hélène Chacun (Institut Galien Paris Sud) for her technical assistance for radioactivity experiments. We are grateful to Gillian Barratt (Institut Galien Paris Sud) for proof-reading the English of this manuscript.

References

- R.U. Agu, M.I. Ugwoke, M. Armand et al., The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. *Respir. Res.* **2**, 198–209 (2001)
- L. Baginski, F. Tewes, S.T. Buckley et al., Investigations into the Fate of Inhaled Salmon Calcitonin at the Respiratory Epithelial Barrier. *Pharm. Res.* **29**, 332–341 (2012)
- R. Baudoin, L. Griscom, M. Monge et al., Development of a renal microchip for in vitro distal tubule models. *Biotechnol. Prog.* **23**, 1245–1253 (2007)
- R. Booth and H. Kim, Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (μ BBB). *Lab Chip* **12**, 1784–1792 (2012)
- N.J. Douville, P. Zamankhan, Y-C. Tung et al., Combination of fluid and solid mechanical stresses contribute to cell death and detachment in a microfluidic alveolar model. *Lab. Chip* **11**, 609–619 (2011)
- C. Ehrhardt, J. Fiegel, S. Fuchs et al., Drug Absorption by the Respiratory Mucosa: Cell Culture Models and Particulate Drug Carriers. *J. Aerosol Med.* **15**, 131–139 (2002)
- M. Felder, P. Sallin, L. Barbe et al., Microfluidic wound-healing assay to assess the regenerative effect of HGF on wounded alveolar epithelium. *Lab. Chip* **12**, 640–646 (2012)
- J. Fiegel, C. Ehrhardt, U.F. Schaefer et al., Large porous particle impingement on lung epithelial cell monolayers--toward improved particle characterization in the lung. *Pharm. Res.* **20**, 788–796 (2003)
- B.I. Florea, M.L. Cassara, H.E. Junginger et al., Drug transport and metabolism characteristics of the human airway epithelial cell line Calu-3. *J. Controlled Release* **87**, 131–138 (2003)
- B.I. Florea, M. Thanou, H.E. Junginger et al., Enhancement of bronchial octreotide absorption by chitosan and N-trimethyl chitosan shows linear in vitro/in vivo correlation. *J. Controlled Release* **110**, 353–361 (2006)

- B. Forbes, Human airway epithelial cell lines for in vitro drug transport and metabolism studies. *Pharm. Sci. Technol. Today* **3**, 18–27 (2000)
- K.A. Foster, M.L. Avery, M. Yazdanian et al., Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery. *Int. J. Pharm.* **208**, 1–11 (2000)
- D. Gao, H. Liu, J.M. Lin et al., Characterization of drug permeability in Caco-2 monolayers by mass spectrometry on a membrane-based microfluidic device. *Lab. Chip* **13**, 978–985 (2013)
- R.W. Godfrey, Human airway epithelial tight junctions. *Microsc. Res. Tech.* **38**, 488–499 (1997)
- C.I. Grainger, L.L. Greenwell, D.J. Lockley et al., Culture of Calu-3 Cells at the Air Interface Provides a Representative Model of the Airway Epithelial Barrier. *Pharm. Res.* **23**, 1482–1490 (2006)
- M. Haghi, P.M. Young, D. Traini et al., Time- and passage-dependent characteristics of a Calu-3 respiratory epithelial cell model. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **36**, 1207–1214 (2010)
- D. Huh, H. Fujioka, Y.C. Tung et al., Acoustically detectable cellular-level lung injury induced by fluid mechanical stresses in microfluidic airway systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 18886–18891 (2007)
- D. Huh, B.D. Matthews, A. Mammoto et al., Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* **328**, 1662–1668 (2010)
- Y. Imura, Y. Asano, K. Sato et al., A microfluidic system to evaluate intestinal absorption. *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.* **25**, 1403–1407 (2009)
- H. Kimura, T. Yamamoto, H. Sakai et al., An integrated microfluidic system for long-term perfusion culture and on-line monitoring of intestinal tissue models. *Lab. Chip* **8**, 741 (2008)
- A. Lewis, F. Jordan and L. Illum, CriticalSorb™: enabling systemic delivery of macromolecules via the nasal route. *Drug Deliv. Transl. Res.* **3**, 26–32 (2013)
- N.R. Mathias, J. Timoszyk, P.I. Stetsko et al., Permeability characteristics of calu-3 human bronchial epithelial cells: in vitro-in vivo correlation to predict lung absorption in rats. *J. Drug Target.* **10**, 31–40 (2002)
- S. Mura, H. Hillaireau, J. Nicolas et al., Biodegradable nanoparticles meet the bronchial airway barrier: how surface properties affect their interaction with mucus and epithelial cells. *Biomacromolecules* **12**, 4136–4143 (2011)
- L. Müller, M. Riediker, P. Wick et al., Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways. *J. R. Soc. Interface.* **7**, 27–41 (2010)

- D.D. Nalayanda, Q. Wang, W.B. Fulton et al., Engineering an artificial alveolar-capillary membrane: a novel continuously perfused model within microchannels. *J. Pediatr. Surg.* **45**, 45–51 (2010)
- J.S. Patton, Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **19**, 3–36 (1996)
- J.S. Patton, C.S. Fishburn and J.G. Weers, The Lungs as a Portal of Entry for Systemic Drug Delivery. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **1**, 338–344 (2004).
- I. Pezron, R. Mitra, D. Pal et al., Insulin aggregation and asymmetric transport across human bronchial epithelial cell monolayers (Calu-3). *J. Pharm. Sci.* **91**, 1135–1146 (2002)
- B. Prabhakarparandian, M-C. Shen, J.B. Nichols et al., SyM-BBB: a microfluidic blood brain barrier model. *Lab. Chip.* **13**, 1093-1101 (2012)
- B.M. Rothen-Rutishauser, S.G. Kiama, and P.Gehr, A Three-Dimensional Cellular Model of the Human Respiratory Tract to Study the Interaction with Particles. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **32**, 281-289 (2005)
- J. Shao, L. Wu, J. Wu et al., A microfluidic chip for permeability assays of endothelial monolayer. *Biomed. Microdevices* **12**, 81–88 (2010)
- A. Stentebjerg-Andersen, I.V. Notlevsen, B. Brodin et al., Calu-3 cells grown under AIC and LCC conditions: Implications for dipeptide uptake and transepithelial transport of substances. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **78**, 19–26 (2011)
- H. Tavana, P. Zamankhan, P.J. Christensen et al., Epithelium damage and protection during reopening of occluded airways in a physiologic microfluidic pulmonary airway model. *Biomed. Microdevices.* **13**, 731–742 (2011)
- D. Teijeiro-Osorio, C. Remuñán-López and M.J. Alonso, Chitosan/cyclodextrin nanoparticles can efficiently transfect the airway epithelium in vitro. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **71**, 257–263 (2009)
- R. Tréhin, U. Krauss, A.G. Beck-Sickinger et al., Cellular Uptake But Low Permeation of Human Calcitonin-Derived Cell Penetrating Peptides and Tat(47-57) Through Well-Differentiated Epithelial Models. *Pharm. Res.* **21**, 1248–1256 (2004)
- E.M.M. Del Valle, M.A. Galan and R.G. Carbonell, Drug Delivery Technologies : The Way Forward in the New Decade. *Ind. Eng. Chem. Res.* **48**, 2475–2486 (2009)
- D. Vllasaliu, R. Fowler, M. Garnett et al., Barrier characteristics of epithelial cultures modelling the airway and intestinal mucosa: a comparison. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **415**, 579–585 (2011)
- D. Vllasaliu, C. Alexander, M. Garnett et al., Fc-mediated transport of nanoparticles across airway epithelial cell layers. *J. Controlled Release* **158**, 479–486 (2012)

S. Wang, M.S.S. Chow and Z. Zuo, An approach for rapid development of nasal delivery of analgesics—Identification of relevant features, in vitro screening and in vivo verification. *Int. J. Pharm.* **420**, 43–50 (2011)

M-H. Wu, S.B. Huang and G-B. Lee, Microfluidic cell culture systems for drug research. *Lab Chip* **10**, 939–956 (2010)

L.Y. Yeo, H.C. Chang, P.P.Y. Chan et al., Microfluidic Devices for Bioapplications. *Small* **7**, 12–48 (2011)

J. Yeon, D. Na, K. Choi et al., Reliable permeability assay system in a microfluidic device mimicking cerebral vasculatures. *Biomed. Microdevices* **14**, 1–8 (2012)

E.W.K. Young, M.W.L. Watson, S. Srigunapalan, Technique for real-time measurements of endothelial permeability in a microfluidic membrane chip using laser-induced fluorescence detection. *Anal. Chem.* **82**, 808–816 (2010)

IV. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons dans un premier temps décrit la mise au point à l'échelle macroscopique des conditions de culture appropriées pour l'obtention de barrières épithéliales Calu-3 jointives et exploitables pour réaliser des tests de transport de molécules. Nous avons notamment montré que le type et la taille de pores des membranes microporeuses utilisées comme support à la culture jouaient un rôle important pour la culture des cellules Calu-3. Des membranes en PET avec une taille de pores de $0,4\text{ }\mu\text{m}$ ont donné des résultats plus performants, en termes de délai d'atteinte de la confluence, confirmée comme étant le reflet de tapis cellulaires très semblables aux épithéliums bronchiques natifs.

Nous avons ensuite décrit la fabrication de notre microsystème, conçu sous forme de deux configurations distinctes. La *configuration culture* est utilisée pour la culture des barrières pulmonaires Calu-3, et se compose d'une plateforme de culture en verre contenant des micropuits de 1 mm^2 qui repose sur un support circulaire en PMMA. Ensuite, la *configuration perméabilité* du microsystème est utilisée pour réaliser des mesures de perméabilité, et se compose de cette même plateforme de culture transférée sur un support recueil en PMMA contenant des chambres de recueil, dès lors que les barrières cellulaires sont arrivées à confluence.

Enfin, les membranes en PET $0,4\text{ }\mu\text{m}$ issues d'inserts Transwell® ont été utilisées pour caractériser de manière approfondie notre microsystème. La transposition des techniques de caractérisation en microsystème ont été réalisées avec succès et ont permis de confirmer l'obtention de barrières épithéliales Calu-3 jointives en micropuits de 1 mm^2 . La mesure de TEER et le marquage des tapis cellulaires suivi de leur observation en microscopie confocale est réalisable sans difficulté sous la *configuration culture* du microsystème. Tout comme en systèmes Transwell®, une stabilisation des valeurs de TEER est obtenue, synonyme de l'atteinte de la confluence, et ce entre 5 et 8 jours après ensemencement. Dès l'obtention de la confluence, l'épaisseur des tapis cellulaires apparaît inhomogène. La Figure 49 met en effet en évidence des monocouches de cellules au contact des membranes microporeuses (représentées dans la colonne de gauche), mais les cellules s'accumulent les unes sur les autres par endroit, et notamment de manière importante à la périphérie des micropuits (colonne de droite).

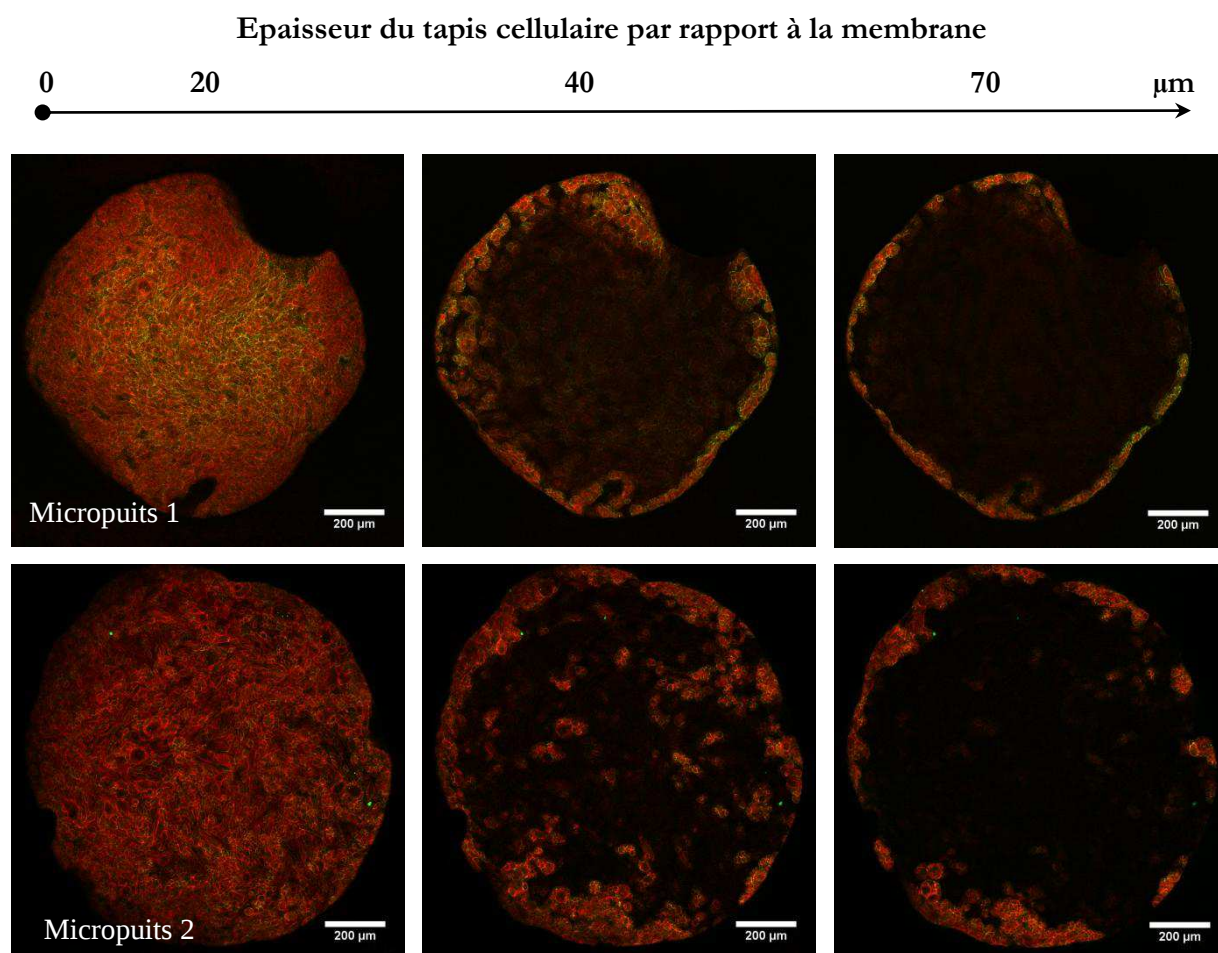


Figure 49. Images de différentes coupes confocales de tapis cellulaires Calu-3 cultivés en micropuits. Co-marquage des filaments d'actine et protéines ZO-1 réalisé dans 2 micropuits différents (haut et bas). De gauche à droite sont représentées les coupes confocales (z) obtenues de la base des micropuits (au plus proche de la membrane microporeuse) jusqu'au sommet des tapis cellulaires.

La mesure de perméabilité à différentes substances est quant elle rendue possible dans la *configuration perméabilité* du microsystème, composée de cette même plateforme de culture transférée sur le support recueil dès lors que les barrières cellulaires sont arrivées à confluence. Les valeurs de perméabilité au ^{14}C -sucrose obtenues en micropuits confirment l'intégrité des barrières Calu-3 et démontrent la capacité du microsystème à évaluer le passage de molécules à travers le modèle de barrière épithéliale pulmonaire.

Le microsystème développé offre un certain nombre d'avantages. La *configuration culture* du microsystème permet notamment de diminuer considérablement la maintenance associée à la culture de barrières cellulaires en systèmes Transwell®. Grâce à l'utilisation du support circulaire pour la plateforme de culture, un réservoir de milieu basolatéral commun à l'ensemble des micropuits est ainsi créé, dont le volume très important comparé aux surfaces des micropuits ne nécessite aucun renouvellement de milieu pendant toute la durée de la culture jusqu'à l'obtention

de barrières confluentes. De plus, le caractère réutilisable des plateformes de culture en verre et la simplicité de la méthode de fabrication mise au point par collage thermique des membranes microporeuses permet d'envisager la mise en culture de nombreuses plateformes de culture en parallèle, qui pourront, indépendamment les unes des autres, être ensuite utilisées pour réaliser des études de transport grâce au support recueil indépendant du microsystème.

La *configuration recueil* requiert encore néanmoins quelques améliorations dans la conception du support recueil, au vu des valeurs de perméabilité au ^{14}C -sucrose augmentées en microsystème vis-à-vis des résultats obtenus en systèmes Transwell[®], du fait de la force d'aspiration qui doit être appliquée afin de récupérer les échantillons dans les compartiments receveurs par les canaux d'alimentation. En évitant cette aspiration, nous avons montré que la perméabilité en microsystème baissait significativement, ce qui prouve qu'il s'agit d'un artefact.

Chapitre 2 :

Evaluation du passage de nanoparticules et protéines à travers le modèle de barrière pulmonaire à l'échelle macroscopique et en microsystème

Le développement du microsystème présenté dans le chapitre 1 a été motivé par la problématique globale suivante : concevoir un outil pour faciliter la mise au point de nouvelles formulations pour l'administration systémique de biomolécules thérapeutiques par voie pulmonaire. En combinant les avantages apportés par la miniaturisation et la parallélisation, ce microsystème est destiné à augmenter la capacité de criblage en série du passage de biomolécules à travers l'épithélium pulmonaire, et à sélectionner les formulations capables de favoriser leur passage.

Dans ce chapitre, nous décrivons trois applications de passage d'analytes à travers notre modèle de barrière épithéliale bronchique Calu-3. Nous détaillons dans un premier temps les résultats préliminaires réalisés en systèmes Transwell® concernant l'étude de nanoparticules (NP) biodégradables de PLGA (acide poly-(lactique-co-glycolique)) développées pour la vectorisation de molécules thérapeutiques. Dans un second temps, nous abordons le cas de NP dédiées à l'imagerie médicale dont la capacité à atteindre la circulation sanguine depuis les poumons a été mise en évidence *in vivo* chez le rongeur (Bianchi *et al.* 2013). Nous présentons l'étude du passage de ces nanoparticules à travers notre modèle de barrière pulmonaire développé en microsystème. Enfin, la troisième et dernière partie de ce chapitre est consacrée à l'étude du passage d'une biomolécule thérapeutique, l'insuline, à travers les tapis cellulaires cultivés en microsystème. L'insuline est en effet connue pour sa capacité à traverser l'épithélium pulmonaire, et plusieurs travaux décrits dans la littérature font état d'un passage pouvant varier de 0,001 à presque 10% sur le modèle Calu-3 (Nazar *et al.* 2013; Pezron *et al.* 2002; Mathias *et al.* 2002; Seki *et al.* 2007). Nous avons évalué au cours de cette étude l'effet mucopénétrant d'un copolymère non ionique, le poloxamère 188 comme éventuel promoteur d'absorption de l'insuline à travers l'épithélium pulmonaire.

I. Etude du passage de nanoparticules biodégradables de PLGA utilisées pour la vectorisation de molécules thérapeutiques

I.1. Quelques notions générales sur les nanoparticules pour la délivrance de molécules thérapeutiques

Les nanoparticules (NP) en tant que systèmes de délivrance de molécules thérapeutiques sont certainement les technologies les plus prometteuses à l'heure actuelle pour améliorer l'absorption des macromolécules biologiques. La délivrance contrôlée des peptides et protéines à l'aide de ce type de systèmes biodégradables a en effet émergé comme l'une des voies principales de recherche pour pallier aux nombreux problèmes rencontrés pour la formulation et l'absorption des macromolécules. Les NP sont notamment intéressantes pour la délivrance de biomédicaments au niveau pulmonaire car elles peuvent apporter de nombreuses fonctionnalités. Les NP sont capables d'augmenter la stabilité des protéines en les protégeant de la dégradation, d'éviter leur phagocytose par les macrophages lorsque le diamètre des particules est inférieur à 250 nm, d'améliorer leur biodisponibilité et leur absorption grâce à une rétention *in situ* importante (Sung *et al.* 2007; Andrade *et al.* 2011; Dombu & Betbeder 2013; Yang *et al.* 2008; Bilati *et al.* 2005). Les NP sont également capables de pénétrer les cellules et pourraient traverser les barrières biologiques. Elles permettent ainsi d'envisager une administration pulmonaire pour une action aussi bien locale que systémique.

Les NP sont des particules colloïdales solides de matériau macromoléculaire dont la taille varie de 10 à 1000 nm. Utilisées comme vecteurs de molécules thérapeutiques, les NP sont le plus souvent de l'ordre de 50 à 500 nm. La molécule d'intérêt thérapeutique est soit dissoute, piégée ou encapsulée dans le cœur de la nanoparticule, soit adsorbée ou fixée à sa surface. Selon le mode de préparation employé, des nanosphères ou des nanocapsules peuvent être obtenues (Figure 50). Les nanosphères sont des systèmes matriciels au sein desquels la molécule d'intérêt est dispersée de manière uniforme. Les nanocapsules se définissent comme des systèmes vésiculaires où la molécule d'intérêt est confinée dans un cœur entouré d'une couronne polymérique unique (Sahoo & Labhasetwar 2003).

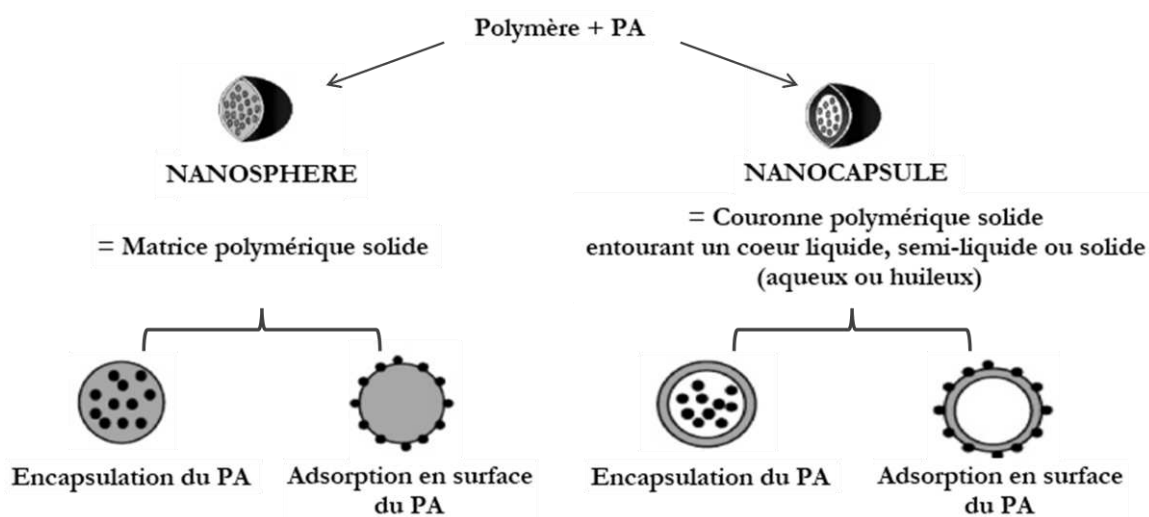


Figure 50. Différents types de nanoparticules biodégradables.

Selon l'organisation de leur structure, les nanoparticules sont classifiées en nanocapsules et nanosphères. Le principe actif (PA) est soit encapsulé à l'intérieur du cœur de la nanoparticule, soit adsorbé à sa surface.

Adapté de (Kumari *et al.* 2010)

Les médicaments nanoparticulaires promettent de grands progrès thérapeutiques de par leurs performances en terme notamment de libération contrôlée et délivrance ciblée. Ces caractéristiques sont directement dépendantes de la taille, de la charge de surface, de la modification de la surface et de l'hydrophobie des NP (Kumari *et al.* 2010). Tous ces facteurs vont en effet conditionner la capacité d'interaction des NP avec les membranes cellulaires ou avec la cible spécifique de la molécule thérapeutique qu'elles transportent, ainsi que leur pénétration dans les tissus.

Les NP biodégradables à visée thérapeutique peuvent être formulées à partir de nombreux matériaux : essentiellement lipides, polymères naturels et polymères synthétiques. Dans ce qui suit, nous nous focalisons sur des NP fabriquées à partir d'un polymère synthétique, le PLGA, qui présente un fort intérêt thérapeutique dans la vectorisation de molécules actives, en raison de ses propriétés avantageuses. Ce polymère est en effet biodégradable, biocompatible et non toxique (Kitchell & Wise 1985). Le PLGA se dégrade chimiquement dans l'organisme par clivage hydrolytique de la liaison ester joignant l'acide lactique et l'acide glycolique. Les produits de l'hydrolyse sont rapidement éliminés sous forme de dioxyde de carbone et d'eau. La dégradation physique du PLGA se fait également par érosion.

Les NP étudiées dans ce mémoire sont des nanosphères de PLGA présentant des charges de surface différentes : positive, neutre et négative. Notre étude a eu pour but de compléter un travail réalisé précédemment au laboratoire au cours duquel a été évaluée l'influence des charges

de surfaces sur le comportement des NP vis-à-vis de l'épithélium pulmonaire (Mura *et al.* 2011a; Mura *et al.* 2011b). Il a notamment été démontré que les NP sont internalisées dans les cellules Calu-3 quelque soit la charge de surface, mais en revanche que l'interaction avec le mucus recouvrant la surface apicale des cellules est fortement dépendante de ces charges de surface. Nous avons donc voulu vérifier si ces NP avaient également la capacité de traverser les épithéliums pulmonaires, et déterminer l'influence des charges de surface sur ce phénomène.

I.2. Préparation et caractérisation des nanoparticules de PLGA

I.2.1. Préparation

Les NP PLGA sont préparées par la méthode d'émulsion-évaporation de solvant dont le protocole est détaillé en Annexe B.1. Cette méthode repose sur la formation d'une émulsion simple « huile dans eau » et sur la capacité du solvant à s'évaporer depuis l'intérieur des gouttes. Une pré-émulsion est obtenue par mélange d'une petite quantité de phase organique non miscible à l'eau contenant le polymère (PLGA), à une phase aqueuse contenant un tensioactif. Une émulsion fine est ensuite obtenue par application de forces de cisaillement par sonication (ultrasons), homogénéisation (forte agitation magnétique) ou homogénéisation-dispersion (ultra turrax). Une suspension colloïdale stable est enfin obtenue par évaporation du solvant contenu dans les gouttelettes dispersées dans la phase aqueuse. La taille des gouttelettes finales, et donc des NP, peut être contrôlée en modulant l'énergie appliquée au système, et dépend de la nature et de la concentration du tensioactif dans la phase externe.

La charge de surface des NP est modifiée en fonction de la nature du tensioactif utilisé pour stabiliser la suspension colloïdale. Trois types de tensioactifs ont ici été utilisés pour l'obtention de NP aux charges de surfaces différentes :

- L'alcool poly(vinyle) (PVA) qui confère un état de charge proche de la neutralité (NP PLGA/PVA) ;
- le chitosane (CS) qui apporte des charges positives (NP PLGA/CS) ;
- un poloxamère 188 (Pluronic F68, PF68) qui confère un état de charge négatif (NP PLGA/PF68).

Afin de permettre une détection et quantification des NP ayant franchi les barrières épithéliales pulmonaires Calu-3, les NP sont rendues fluorescentes grâce à l'utilisation de PLGA marqué à la rhodamine B (RhodB-PLGA) selon la réaction détaillée dans les travaux de Mura *et al.* (2011b).

I.2.2. Caractérisation

Les NP ont été caractérisées par détermination de leur taille et de leur potentiel de surface (ou potentiel zêta). Ces deux paramètres ont été obtenus à l'aide du Zetasizer Nano Zs (Malvern Instruments Ltd). La modification de surface des NP a été estimée par mesure du potentiel zêta (ζ) qui représente la charge électrique qu'une particule acquiert grâce au nuage d'ions qui l'entoure quand cette particule est en suspension. ζ est déterminé *via* la mobilité électrophorétique des NP sous l'action d'un champ électrique. ζ est également l'indicateur des interactions entre particules chargées et donc de la stabilité colloïdale.

La taille a été déterminée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) qui mesure les variations aléatoires d'intensité de la lumière diffusée par la suspension colloïdale. Les particules en suspension sont soumises à un mouvement thermique aléatoire appelé mouvement brownien, modélisé par la relation de Stokes-Einstein (Equation 4), qui lie le coefficient de diffusion mesuré et la taille des particules :

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t} \quad \text{Equation (4)}$$

où D_h le diamètre hydrodynamique (nm), k_B la constante de Boltzman ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), T la température absolue (K), η la viscosité dynamique du milieu (Pa.s), et D_t le coefficient de diffusion ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$).

Pour les mesures de taille et de potentiel zêta, les NP ont été diluées dans une solution de NaCl 1 mM et les mesures, répétées trois fois, ont été réalisées à 25°C. Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 3. Des tailles homogènes sont obtenues pour les trois types de NP, avec une valeur moyenne de 200 nm. Les indices de polydispersité (Pdi) compris entre 0,13 et 0,23 indiquent que la distribution de taille des différentes formulations est relativement monodisperse. Les mesures du potentiel zêta confirment l'influence du tensioactif sur la charge de surface des NP. Les NP contenant du CS sont caractérisées par un potentiel zêta positif, celles contenant du PF68 par un potentiel zêta négatif. Les NP contenant du PVA sont quant à elles très proches de la neutralité.

Type de nanoparticules	Taille (nm)	Pdi	Potentiel zêta (mV)
RhodB-PLGA/CS	176 ± 7	0,23	+33,8 ± 2
RhodB-PLGA/PF68	223 ± 5	0,13	-36,8 ± 2
RhodB-PLGA/PVA	220 ± 6	0,13	-3,1 ± 2

Tableau 3. Caractérisation des trois types de nanoparticules de PLGA.
(Pdi, Incide de polydispersité)

I.3. Evaluation du passage des nanoparticules PLGA à travers le modèle Calu-3 en systèmes Transwell®

I.3.1. Etalonnage des nanoparticules de PLGA par spectrofluorimétrie

Une méthode simple de mesure de fluorescence a été choisie pour quantifier le passage des différents types de RhodB-NP à travers le modèle de barrière pulmonaire Calu-3. La présence de NP dans chaque échantillon a été déterminée par mesure de fluorescence à l'aide d'un spectrofluorimètre (Jasco PF750, cuve en quartz 1 mL). Les NP étant destinées à rester en contact avec les barrières cellulaires pendant 24h, une première gamme d'étalonnage a été établie en dispersant les NP dans le milieu de culture complet (DMEM + 10% FBS). Une étude antérieure a démontré la stabilité des trois types de NP utilisées pour cette étude dans ce même milieu (Mura et al. 2011a; Mura et al. 2011b). La fluorescence de ce milieu est cependant non négligeable, ceci pouvant constituer un obstacle à la détection de NP à très faibles concentrations. Les nombreuses protéines apportées par le FBS sont en effet susceptibles de posséder des propriétés intrinsèques de fluorescence. De même, la présence de rouge de phénol dans le DMEM peut être susceptible d'accroître le bruit de fond et augmenter la limite de détection, et nous empêcher de quantifier un passage de NP très faible. Les NP ont donc également été diluées dans le milieu DMEM sans rouge de phénol et sans FBS pour établir une seconde gamme d'étalonnage.

Après analyse des spectres d'émission et d'excitation des suspensions de RhodB-NP, les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission maximales ont été fixées à 530 nm et 580 nm respectivement. Seuls les résultats obtenus pour les NP PLGA/CS et PVA seront présentés, les NP PLGA/PF68 préparées pour cette manipulation ayant précipité dans les deux milieux de culture pour des raisons inexpliquées. Les courbes d'étalonnage établies pour les deux types de NP dans les deux milieux de dispersion, dans une gamme de concentrations variant de 0,008 à 0,2

mg/mL, sont présentées Figure 51. On observe que pour une même concentration en NP, l'intensité de fluorescence est nettement plus importante dans le milieu de culture sans FBS et sans rouge de phénol (Figure 51b), la différence d'intensité de fluorescence étant plus significative à forte concentration. Dans le milieu de culture complet, une corrélation linéaire est obtenue pour les deux types de NP (positives et neutres), dans la gamme de concentrations étudiée, avec de très bons coefficients de détermination ($r^2 > 0,99$) (Figure 51a). Dans le milieu DMEM sans rouge de phénol et sans FBS, une linéarité est également obtenue avec cependant des coefficients de détermination plus faibles que dans le milieu de culture complet ($r^2 \sim 0,98$).

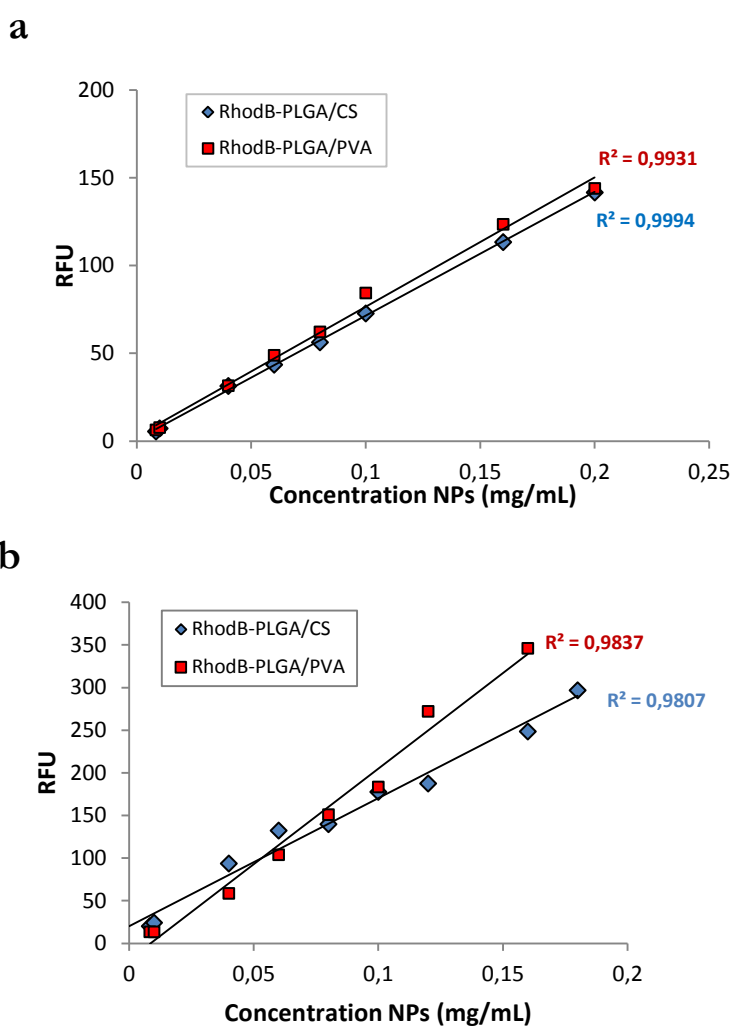


Figure 51. Corrélation entre la concentration en nanoparticules RhodB-PLGA et l'intensité de fluorescence. NP dispersées **(a)** dans le milieu de culture complet (DMEM + FBS) ou **(b)** dans le milieu DMEM sans FBS et sans rouge de phénol. Suspensions de NP positives (PLGA/CS) et neutres (PLGA/PVA). $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$.

I.3.2. Exposition des barrières Calu-3 aux nanoparticules de PLGA

L'évaluation du passage des NP neutres et positives à travers les barrières Calu-3 confluentes a été effectuée en plaques Transwell® 12 puits PET 3 µm. Les NP en suspension dans l'eau à 8,3 mg/mL après fabrication ont été diluées dans le milieu de culture complet ou dans le milieu DMEM sans rouge de phénol et sans FBS, à 0,2 mg/mL. A cette concentration, une viabilité cellulaire $\geq 80\%$, estimée par test de viabilité au MTT, a été précédemment démontrée pour les deux types de NP étudiées (Mura *et al.* 2011a).

Le jour choisi pour réaliser l'expérience, 500 µL de suspension de NP ont été déposés sur les tapis cellulaires côté apical (n=4 inserts/NP) et sur les membranes microporeuses d'inserts ne contenant pas de tapis cellulaires (n=1 insert/NP). Des tapis cellulaires non exposés aux NP ont été réservés comme contrôles négatifs (n=3 inserts). 24h après dépôt des suspensions de NP, la totalité des milieux basolatéraux (1,5 mL) et apicaux (0,5 mL) a été prélevée pour évaluer la capacité de passage des NP à travers la barrière cellulaire. Afin de déterminer la fraction de NP piégées dans le mucus, celui-ci a été prélevé au terme de trois lavages consécutifs au PBS pendant 30 min à 37°C. Enfin, dans le but de déterminer la fraction de NP internalisées dans les cellules, ces dernières ont été trypsinées puis centrifugées pendant 5 min à 8609g. Les culots cellulaires ont été repris avec 500 µL d'une solution tampon de lyse (tampon HEPES 50 mM, 150 mM NaCl, glycérol 10%, triton 1%, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA).

Tous les échantillons ont été transférés dans des flacons en verre à l'abri de la lumière et conservés à +4°C jusqu'à l'analyse au spectrofluorimètre.

I.3.3. Quantification des nanoparticules de PLGA par spectrofluorimétrie

La concentration de NP de chaque échantillon a été déterminée à partir des droites d'étalonnage établies précédemment. Les échantillons contrôles, plus concentrés, ont pu être quantifiés à partir des suspensions de NP dans le milieu de culture complet, le reste des échantillons a en revanche été analysé lorsque les NP étaient diluées dans le milieu de culture sans rouge de phénol et sans FBS. Les résultats obtenus et calculés en pourcentage de la quantité initiale de NP déposée sur les cellules sont regroupés dans le Tableau 4.

La perméabilité de la membrane en PET 3 µm aux NP a été confirmée pour les deux types de NP, avec la détection d'environ 30% de la quantité initiale retrouvée dans les compartiments basolatéraux. En cumulant les quantités en NP encore présentes dans les compartiments apicaux à celles présentes dans les compartiments basolatéraux, nous avons mis en évidence la perte

d'une fraction importante d'environ 30% de NP, très certainement révélatrice d'un phénomène d'adsorption non négligeable des NP, neutres comme positives, sur la membrane en PET 3 μm .

La présence de tapis cellulaires a entraîné de manière logique une perméabilité aux NP nettement diminuée. Dans le cas des NP positives PLGA/CS, environ 70% des NP déposées initialement ont été retrouvées dans les compartiments apicaux. Une quantité de l'ordre de 10% a été retrouvée dans les fractions de mucus collectées à la surface apicale des tapis cellulaires. La fluorescence détectée côté basolatéral étant supérieure à la limite de quantification (LOQ) de la méthode, un passage de ces NP a été confirmé à travers le modèle d'épithélium, à hauteur de 6%. Dans le cas des NP neutres PLGA/PVA, une proportion plus importante atteignant les 35% a été quantifiée dans les fractions de mucus. La fluorescence mesurée dans les échantillons basolatéraux s'est avérée très proche de la fluorescence émise par le milieu de culture seul (concentration en NP < limite de détection, LOD), nous amenant à conclure que les NP neutres PLGA/PVA ne passent pas la barrière cellulaire Calu-3. Un problème expérimental nous a empêché de déterminer la quantité des NP encore présentes dans les compartiments apicaux. Ces résultats sont en corrélation avec les travaux réalisés par Mura *et al.* (2011b) qui ont démontré une forte interaction des NP neutres et positives avec les mucines présentes dans le mucus, entraînant leur capture à la surface et au sein du mucus.

La fraction de NP neutres ou positives internalisées dans les cellules Calu-3 n'a pas pu être déterminée en raison de la turbidité importante des lysats cellulaires qui n'ont pas permis de réaliser des mesures de fluorescence correctes. Néanmoins, dans le cas des NP positives PLGA/CS, seulement 87% de la quantité initiale déposée sur les cellules a été quantifiée dans les différents compartiments observés (apical, mucus et basolatéral). Mura *et al.* (2011b) ayant confirmé l'internalisation de ces NP positives dans les cellules Calu-3, il est fort probable que la fraction de NP non quantifiées ici corresponde, du moins en partie, à une fraction de NP internalisées. Il est également probable qu'une quantité similaire de NP neutres PLGA/PVA soit également internalisée comme l'ont montré Mura *et al.* (2011b). L'adsorption des deux types de NP sur la membrane en PET reste néanmoins possible comme nous l'avons démontré dans les puits contrôle sans cellules, mais il semble raisonnable de penser que ce phénomène est fortement minimisé de par la présence même des tapis cellulaires.

	RhodB-PLGA/CS (positives)		RhodB-PLGA/PVA (neutres)	
	Contrôles membranes	Barrières Calu-3	Contrôles membranes	Barrières Calu-3
Apical	46 ± 1%	69%*	36 ± 16%	< 65%**
Mucus	n/a	12 ± 7%	n/a	35 ± 5%
Lysats cellulaires	n/d	n/d	n/d	n/d
Basolatéral	30 ± 11%	6%*	29 ± 5%	< LOD
Total quantifié	76 ± 12%	87%	65 ± 21%	—

Tableau 4. Quantités de RhodB-PLGA mesurées après 24h d'exposition aux barrières Calu-3 en systèmes Transwell®. Mesures effectuées dans les compartiments basolatéraux et apicaux, et dans le mucus recouvrant les tapis cellulaires. Les valeurs représentent les quantités (mg) exprimées en % de la valeur théorique déposée sur les cellules (0,1 mg = 100%). Abréviations : LOD, limite de détection ; n/a, non applicable, n/d, non déterminé (limites expérimentales). * n=1 (> LOQ) ; ** n=1 ; **estimation d'après les quantités mesurées dans le mucus combinée à l'absence de NP retrouvées dans les compartiments basolatéraux et à la fraction de NP probablement internalisées

Ces résultats montrent que seules les NP PLGA/CS au potentiel de surface positif sembleraient donc aptes à traverser le modèle de barrière Calu-3. Ceci conforte les observations décrites par Mura *et al.* (2011b) montrant que les NP PLGA/CS interagissent avec les jonctions serrées, affectant leur fonction de manière transitoire. Une diminution significative des valeurs de TEER a en effet été observée les 12 premières heures suivant l'exposition aux NP, augmentant ainsi la perméabilité des tapis épithéliaux pendant cette période. Le CS est par ailleurs connu pour provoquer à lui seul une ouverture des jonctions serrées (Illum 1998; Artursson *et al.* 1994) en se complexant avec les ions Ca^{2+} extracellulaires impliqués dans le maintien des jonctions serrées (Bravo-Osuna *et al.* 2007).

En conclusion, ces résultats préliminaires, qui méritent d'être approfondis et confirmés par une étude plus complète, qui pourrait notamment être réalisée en microsystème, ouvrent des perspectives encourageantes pour l'utilisation de nanoparticules de PLGA revêtues avec du chitosane pour la délivrance de biomolécules par voie pulmonaire.

II. Etude du passage de nanoparticules utilisées comme agents de contraste pour l'imagerie médicale

II.1. Description des nanoparticules étudiées

Les NP utilisées ici sont fabriquées par le Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents (UMR 5620 CNRS) de l'Université Claude Bernard Lyon 1. Ce sont des particules hybrides à base d'oxyde de gadolinium utilisées en temps qu'agents de contraste en imagerie et diagnostic biomédical (Figure 52). Ces NP de très petite taille (< 5 nm) sont composées d'un cœur en polysiloxane entouré de molécules DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) partiellement chélatées à des ions gadolinium (Gd) aux propriétés paramagnétiques (Lux *et al.* 2011). Ces NP DOTA-Gd sont rendues fluorescentes par greffage covalent d'un fluorophore émettant dans le proche infrarouge, la cyanine 5.5 (DOTA-Gd-Cy 5.5). Ces particules peuvent être détectées à la fois par luminescence grâce aux fluorophores liés au réseau de polysiloxane enrobant le cœur, et par des méthodes magnétiques grâce au gadolinium, agent de contraste largement utilisé en imagerie par résonance magnétique (IRM).

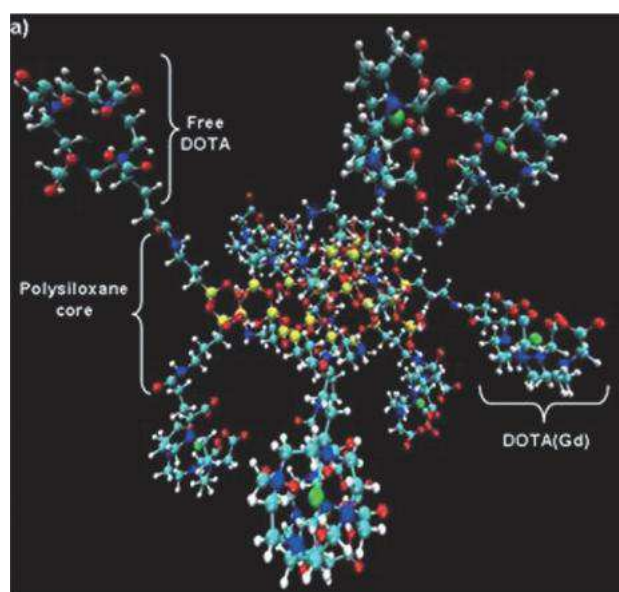


Figure 52. Représentation des nanoparticules DOTA-Gd utilisées comme agents de contraste.
(Lux *et al.* 2011)

Le groupe du Pr. Tillement a démontré que ces NP permettent d'augmenter le contraste des images du parenchyme pulmonaire obtenues par IRM chez la souris après administration des NP par voie intratrachéale. L'étude de leur biodistribution a également montré que ces NP administrées au niveau pulmonaire se distribuent dans le système vasculaire (Bianchi *et al.* 2013),

ce qui confirme la capacité de ces NP à traverser la barrière épithéliale pulmonaire. Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons exploité cette caractéristique pour réaliser une première étude de perméabilité à travers le modèle cellulaire Calu-3 cultivé dans nos microsystemes. Les NP DOTA-Gd-Cy5.5 ont donc été utilisées comme particules modèles pour confirmer la capacité du microsysteme à être utilisé comme outil d'évaluation du passage de molécules à travers la barrière pulmonaire.

II.2. Evaluation du passage des nanoparticules DOTA-Gd-Cy5.5 à travers le modèle Calu-3 en microsysteme

II.2.1. Etalonnage des nanoparticules DOTA-Gd-Cy5.5 par spectrofluorimétrie

La quantification des NP DOTA-Gd-Cy5.5 a été effectuée par mesure de fluorescence au spectrofluorimètre (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech) en plaques 96 puits (Costar® #3925). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement de 650 et 690 nm.

La solution mère de NP dans l'eau (10 mM) a été diluée à 3 mM dans un tampon HEPES/NaCl pH 7,45 (force ionique 144 mM), similaire à celui utilisé pour les études *in vivo* de ces NP chez la souris (Bianchi *et al.* 2013). Les concentrations sont exprimées en concentration équivalente en Gd. Une gamme d'étalonnage a été effectuée dans une gamme de concentrations allant de 5,8 à 3000 μ M. Une linéarité avec un très bon coefficient de détermination ($r^2=0,997$) a été obtenue entre 5,8 et 750 μ M (Figure 53).

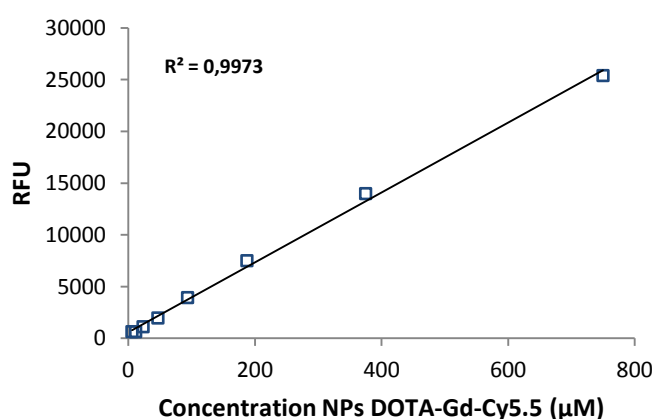


Figure 53. Corrélation entre la concentration en nanoparticules DOTA-Gd-Cy5.5 et l'intensité de fluorescence. Nanoparticules diluées en tampon HEPES/NaCl pH 7,45 (force ionique 144 mM).
Equation de la droite : $y = 33,746x + 598,88$

II.2.2. Exposition des barrières Calu-3 aux nanoparticules DOTA-Gd-Cy5.5

L'évaluation du passage des NP a été effectuée en microsystème 3 puits, dans sa *configuration perméabilité* (Figure 54). Les cellules Calu-3 ont été cultivées dans les micropuits sur des membranes microporeuses en PET 0,4 μm découpées d'inserts Transwell®. Une fois les tapis cellulaires Calu-3 arrivés à confluence, les plateformes de culture en verre ont été fixées à leur support recueil en PMMA. Toutes les chambres de recueil basolatérales ont été remplies de tampon HEPES/NaCl pH 7,4 par l'intermédiaire du canal d'alimentation du support recueil. Un morceau de PDMS poinçonné au niveau de chaque micropuits de la plateforme de culture a été déposé sur la plateforme de culture en verre pour créer des compartiments apicaux et permettre le dépôt des solutions de NP.

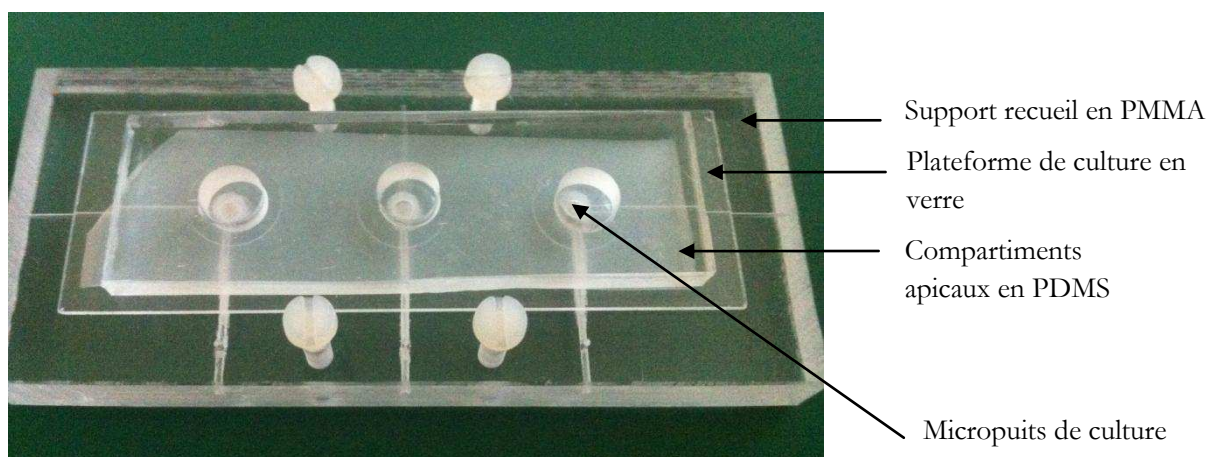


Figure 54. Microsystème sous sa configuration perméabilité.

La plateforme de culture est vissée sur son support recueil, puis des compartiments apicaux individuels sont créés pour chaque micropuits par dépôt d'un morceau de PDMS poinçonné et adhérent à la plateforme de culture en verre. Les chambres de recueil basolatérales sont remplies en milieu de réaction, puis les solutions contenant les molécules à tester sont déposées au dessus des tapis cellulaires cultivés dans les micropuits

La perméabilité des barrières Calu-3 vis-à-vis des NP a été évaluée sur un temps total de 3h, les études effectuées *in vivo* ayant révélé un passage des NP très rapide depuis les poumons vers la circulation sanguine (<45 min) (Bianchi *et al.*, sous presse). 80 μL de la suspension de NP à 3 mM ont été déposés dans chaque compartiment apical de manière séquentielle, de sorte à obtenir des temps de contact avec les tapis cellulaires de 15 min, 30 min, 45 min, 1h, 2h et 3h. La même opération a été réalisée dans trois micropuits contrôles ne contenant pas de cellules pour évaluer la perméabilité des NP à travers les membranes en PET 0,4 μm sur trois temps d'incubation : 15 min, 45 min et 2h. Au terme des temps d'incubation étudiés, l'intégralité des solutions apicales a été prélevée et déposée dans une plaque 96 puits (100 μL /puits). Concernant le recueil des solutions basolatérales, nous avons vu dans le chapitre 1 que la force d'aspiration créée lors de la

récupération de ces échantillons par le canal d'alimentation - alors que la plateforme de culture est encore vissée à son support recueil - pouvait forcer le passage de molécules à travers les barrières cellulaires (cf. publication, chapitre 1, § III.2). Pour s'affranchir de ce phénomène, les plateformes de culture ont d'abord été désolidarisées de leur support recueil respectif, puis les solutions basolatérales ont été récupérées directement dans les chambres de recueil (~ 40 µL). 30 µL d'échantillon ont été dilués dans le tampon HEPES/NaCl pH 7,4 QSP 100 µL, puis déposés dans la plaque 96 puits. Les échantillons apicaux et basolatéraux ont immédiatement été analysés au spectrofluorimètre.

II.2.3. Quantification des nanoparticules DOTA-Gd-Cy5.5 par spectrofluorimétrie

La concentration de NP dans chaque échantillon a été déterminée à partir de la droite d'étalonnage établie précédemment. Aucune fluorescence n'a été détectée dans les échantillons basolatéraux concernant l'expérience réalisée sur les barrières Calu-3, et ce même après 3h d'incubation. 50 à 80% de la concentration initiale en NP a été retrouvée dans les compartiments apicaux quelque que soit le temps d'incubation. De manière très surprenante, dans les micropuits contrôles sans cellules, un passage de seulement 1,5% après 1h d'incubation et de 5 % après 3h a été estimé à travers la membrane en PET 0,4 µm. Entre 65 et 75% de NP ont été retrouvées dans les compartiments apicaux quelque soit le temps d'incubation révélant ici encore une perte des NP.

Les membranes constituant les micropuits contrôles ont alors été observées au microscope afin de vérifier une première hypothèse selon laquelle les NP s'adsorberaient fortement sur la membrane en PET et à la surface du PDMS constituant les compartiments apicaux du microsystème. Comme illustré dans la Figure 55, l'adsorption des NP est clairement visible au niveau de la membrane avec des NP qui semblent être piégées dans les pores. On retrouve également une quantité importante de NP sur le pourtour du micropuits au niveau de la paraffine entourant le micropuits. Il est fort probable que cette adsorption soit due à la présence du fluorophore présent à la surface des NP, la cyanine 5.5 étant en effet une molécule hydrophobe. Ce phénomène d'adsorption explique donc les pertes importantes de NP non quantifiées lors de cette expérience. Plusieurs autres raisons pourraient également expliquer le non passage des NP à travers les barrières pulmonaires Calu-3, pourtant observé *in vivo* (Bianchi *et al.* 2013; Bianchi *et al.*, sous presse). Une première raison incriminerait une fois de plus le fluorophore, qui, étant donné la taille très petite des NP (< 5nm), entraînerait une modification importante des propriétés physico-chimiques des NP, au détriment de leur passage à travers les tapis cellulaires Calu-3. Il

s'avère, de plus, que seulement 1 NP sur 1000 environ est marquée avec le fluorophore, ce qui diminue considérablement la quantité de NP détectables par fluorescence par rapport au nombre réellement présent dans l'échantillon. Combiné au fait que les échantillons basolatéraux ont dus être dilués au 1/3 pour pouvoir effectuer les mesures de fluorescence en plaques 96 puits, si un passage de NP a lieu, la sensibilité de la méthode de détection par fluorescence serait ici insuffisante pour le détecter. Enfin, il n'est pas non plus exclu qu'une certaine fraction des NP soit internalisée par les cellules Calu-3, les études *in vivo* ayant révélée la présence résiduelle de NP dans les poumons 5h après instillation (Bianchi *et al*, sous presse).

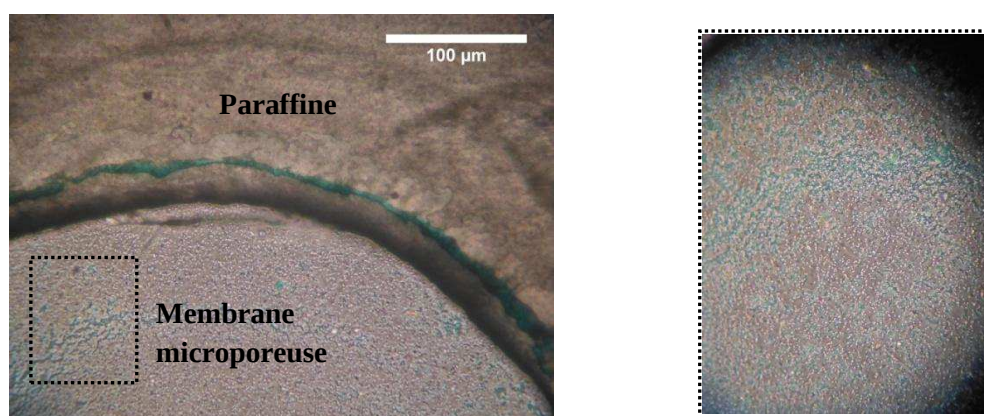


Figure 55. Images en microscopie optique des membranes en PET 0,4 µm des micropuits de culture après 3h de contact avec les nanoparticules DOTA-Gd-Cy5.5. Les nanoparticules adsorbées sur la membrane et sur la paraffine au niveau du bord des micropuits apparaissent en bleu.

Cette étude préliminaire n'a pas permis de mettre en évidence le passage de NP DOTA-Gd-Cy5.5 à travers le modèle Calu-3 cultivé dans notre microsystème. Néanmoins, compte tenu des résultats obtenus *in vivo* démontrant la capacité de ces NP à traverser l'épithélium pulmonaire, il est possible que cette absence de détection soit due à des conditions expérimentales non optimales. En effet, une forte adsorption des NP sur les différents matériaux constituant le microsystème a été observée et les faibles volumes récupérés d'échantillons basolatéraux nous ont obligés à effectuer des dilutions pour pouvoir mesurer la fluorescence en plaque 96 puits. Il serait donc intéressant d'employer une autre technique, comme par exemple la fluorescence en temps résolu pour confirmer le passage des NP observé *in vivo*.

III. Etude du passage de l'insuline

Depuis sa découverte et sa commercialisation en temps que médicament sous forme injectable, et malgré l'échec de l'insuline inhalée Exubera[®], l'insuline ne cesse de faire l'objet d'intenses recherches, dans l'espoir de trouver des formulations et des systèmes d'administration efficaces par voie pulmonaire, nasale ou encore orale. Plusieurs études ont notamment été conduites sur le modèle Calu-3 cultivé en systèmes Transwell[®], pour évaluer la faisabilité de nouvelles formulations sur leur capacité à favoriser le passage de l'insuline à travers l'épithélium pulmonaire (Nazar *et al.* 2013; Pezron *et al.* 2002; Mathias *et al.* 2002; Seki *et al.* 2007).

Nous avons ici utilisé l'insuline comme molécule modèle pour l'évaluation de la perméabilité du modèle cellulaire Calu-3 développé dans notre microsystème vis-à-vis d'une molécule biologique. La pénétration de l'insuline à travers le modèle de barrière pulmonaire a en parallèle été évaluée en présence de poloxamère. Les poloxamères sont des copolymères non-ioniques à trois blocs, possédant typiquement un bloc central hydrophobe de poly(oxyde de propylène) et deux blocs externes hydrophiles de poly(oxyde d'éthylène). En raison de leurs propriétés tensioactives ils sont très largement utilisés dans le domaine pharmaceutique. Le poloxamère choisi pour cette étude est le poloxamère 188 (Pluronic F68, PF68) utilisé pour la fabrication des NP de PLGA décrites précédemment (cf. §I.2). Les NP PLGA/PF68 ont en effet montré une propriété intéressante mucopénétrante sur les cellules Calu-3, tout en étant non toxiques pour ces cellules (Mura *et al.* 2011b). En solution, le PF68 s'est également révélé non toxique pour les cellules Calu-3 à des concentrations ≤ 3 mg/mL (Mura *et al.* 2011a).

III.1. Evaluation du passage de l'insuline à travers le modèle Calu-3 en microsystème

III.1.1. Exposition des barrières Calu-3 à l'insuline

L'étude a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites pour dans le paragraphe précédent (cf. § II.2.2) en utilisant la *configuration perméabilité* du microsystème. Une cinétique du passage de l'insuline seule et de l'insuline en présence de poloxamère (PF68, Lutrol[®] F68, BASF) a été réalisée en parallèle en quantifiant l'insuline présente dans les compartiments apicaux et basolatéraux sur trois temps : 30 min, 1h et 2h. Deux micropuits de culture ont été utilisés pour chaque temps. De la même manière, des contrôles négatifs sans cellules pour évaluer le passage de l'insuline à travers la membrane microporeuse ont également été effectués.

La solution d'insuline seule (Insuline humaine recombinante, 27,5 UI/mg, Sigma Aldrich) a été diluée à 2 mg/mL (55 UI/mL) dans le milieu DMEM sans rouge de phénol et sans FBS. Le mélange d'insuline et de PF68 a été préparé dans le même milieu aux concentrations de 2 mg/mL et 3 mg/mL respectivement.

150 µL de solution ont été déposés dans les compartiments apicaux du microsysteme. Au terme des temps d'incubation étudiés, la totalité des solutions apicales et basolatérales ont été prélevées puis congelées à -20°C jusqu'à analyse.

III.1.2. Quantification par test ELISA

La quantification de l'insuline dans les différents compartiments a été effectuée à l'aide d'un test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) type sandwich, avec révélation indirecte par le système biotine-streptavidine (Human Insulin ELISA Kit, Sigma Aldrich). Le principe de la réaction est illustré dans la Figure 56. L'insuline contenue dans les échantillons se lie spécifiquement à un anticorps de capture anti-insuline immobilisé à la surface des puits. Un anticorps de détection biotinylé anti-insuline est ensuite ajouté et reconnaît à son tour l'insuline. Une solution de streptavidine couplée à l'enzyme HRP interagit ensuite avec la biotine. Enfin, un substrat (TMB) est ajouté et conduit à un produit de réaction coloré. L'intensité de coloration proportionnelle à la quantité d'insuline capturée est déterminée par mesure de l'absorbance à 450 nm (lecteur microplaque ELX800, Biotek®). Le traitement des échantillons a été réalisé suivant les indications du fournisseur.

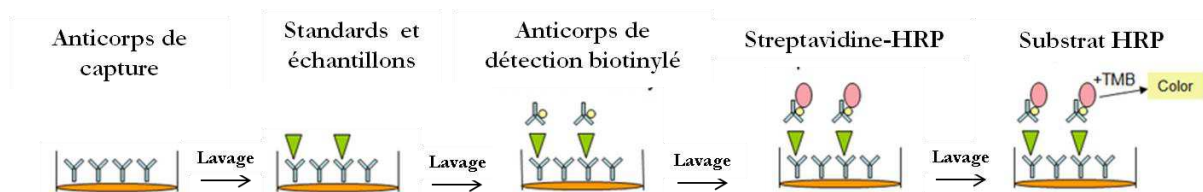


Figure 56. Principe du test ELISA type sandwich avec révélation indirecte par le système biotine-streptavidine.

La concentration en insuline contenue dans chaque échantillon a été déterminée à partir de la droite d'étalonnage obtenue avec le standard insuline fourni dans le kit ($r^2=0,97$). L'ensemble des résultats est présenté dans le Tableau 5 ci-dessous.

	Insuline	Insuline + Poloxamère
	Barrières Calu-3	Barrières Calu-3
Apical	n/d	n/d
Basolatéral	0,003%* (30 min) 0,005%* (1h) 0,008 ± 0,005%** (2h)	0,005%* (30 min) 0,010%* (1h) 0,009 ± 0,003%*** (2h)
P_{app}	7,8×10 ⁻⁶ cm/s [#]	11×10 ⁻⁶ cm/s ^{##}

Tableau 5. Quantités d'insuline mesurées après passage à travers les barrières Calu-3 en microsystème, en présence ou en absence de poloxamère (PF68). Mesures effectuées dans les compartiments basolatéraux et apicaux à 30 min, 1h ou 2h. Les valeurs représentent les quantités (μUI) exprimées en % de la valeur théorique déposée sur les cellules (8,25 UI = 100%). Abréviations : P_{app}, coefficient de perméabilité ; n/d, non déterminé (limites expérimentales). *n=1 ; **n=2 ; ***n=3 ; [#] P_{app} calculés selon l'équation 2 décrite en Annexe A.1.7, à partir du flux d'insuline sur [#]2h ou ^{##}1h d'incubation.

Après 30 min et 1h d'incubation sur les cellules Calu-3, environ deux fois plus d'insuline a été retrouvée dans les compartiments basolatéraux en présence de PF68 (0,010% contre 0,005% pour l'insuline seule à t=1h). Après 2h d'incubation en revanche, cette différence n'est plus observée puisqu'une quantité d'insuline équivalente a traversé le modèle d'épithélium dans les deux cas (0,009 et 0,008%). En présence de PF68, le taux de transport atteint donc son maximum dès 1h d'incubation, puisque la quantité d'insuline retrouvée dans les compartiments basolatéraux n'évolue pas ensuite. Ces résultats montrent que si la présence de PF68 ne favorise pas le taux de transport global de l'insuline à travers le modèle d'épithélium Calu-3, le poloxamère semble accélérer la vitesse de passage de la biomolécule, ce qui pourrait être confirmé au vu des coefficients de perméabilité (P_{app}) de l'insuline déterminés à partir des pentes des droites exprimant la quantité d'insuline mesurée dans les compartiments basolatéraux (μUI) en fonction du temps. Une perméabilité plus importante a en effet été observée en présence de PF68 (11.10⁻⁶ contre 7,8.10⁻⁶ cm/s pour l'insuline seule).

Etant donné le peu de données à partir desquelles nous avons été en mesure de nous baser, les conclusions restent de toute évidence à confirmer. Nous avons en effet éprouvé de grandes difficultés à obtenir des données exploitables pour un grand nombre d'échantillons. Plusieurs tests ELISA consécutifs ont ainsi été nécessaires pour aboutir à l'analyse correcte des échantillons présentés dans le Tableau 5. Différents kits du même fournisseur ont été utilisés, les anticorps de capture et de détection, ainsi que le standard d'insuline étant issus de lots différents. En fonction des numéros de lots, nous avons alors observé des variabilités importantes des valeurs d'absorbance des échantillons standards d'insuline utilisés pour la construction des droites

d'étalonnage. La concentration d'insuline présente dans chacun des échantillons à analyser nous étant totalement inconnue, nous avons alors rencontré de grandes difficultés à choisir les facteurs de dilution adaptés pour la quantification de la protéine. Beaucoup de nos résultats se sont avérés au final inexploitable car trop dilués, ou à l'inverse trop concentrés, conduisant alors à des valeurs d'absorbance sortant de la linéarité des gammes d'étalonnage correspondantes (cas des échantillons contrôles apicaux et basolatéraux et également des échantillons apicaux du Tableau 5).

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié le passage de plusieurs types de nanoparticules et d'une biomolécule à travers notre modèle de barrière pulmonaire Calu-3. Deux types de NP biodégradables de PLGA de taille équivalente mais différant par leurs charges de surface ont été évalué en systèmes Transwell®. Aucun passage n'a été observé dans le cas de NP neutres (NP PLGA/PVA) alors qu'un passage d'environ 6 % a été confirmé dans le cas de NP positives revêtues de chitosane (NP PLGA/CS). Ces résultats ont permis de montrer le rôle joué par les charges de surface sur la capacité de ces NP à traverser l'épithélium pulmonaire. Au terme de cette étude préliminaire, les NP PLGA/CS se sont présentées comme les meilleures candidates pour l'administration facilitée de protéines ou peptides thérapeutiques au niveau pulmonaire.

Deux études de perméabilité ont ensuite été réalisées en microsystème, l'une avec des NP à base de gadolinium (NP DOTA-Gd-Cy5.5) et l'autre avec une biomolécule modèle, l'insuline. Leur capacité à traverser la barrière pulmonaire est connue, démontrée *in vivo* chez le rongeur dans le cas des NP DOTA-Gd-Cy5.5, et chez l'homme dans le cas de l'insuline. Le passage des NP DOTA-Gd-Cy5.5 à travers notre modèle Calu-3 miniaturisé n'a cependant pas pu être démontré en raison d'un phénomène d'adsorption très important observé sur les différents compartiments du microsystème. Un passage d'environ 0,01% d'insuline a en revanche été mesuré et nous a permis de confirmer que la miniaturisation des puits de culture permettait d'effectuer des études de transport de biomolécules. L'effet du poloxamère (PF68) sur la pénétration de l'insuline à travers l'épithélium pulmonaire a également été évalué lors de cette étude, et un effet positif sur la vitesse de passage de l'insuline a pu être observé.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont montré que le microsystème en lui-même et notamment la nature des matériaux le constituant nécessite de nouvelles optimisations. En particulier, le PDMS utilisé pour créer les compartiments apicaux n'est clairement pas adapté

dans le cas d'une manipulation de molécules hydrophobes, comme nous l'avons mis en évidence avec les NP DOTA-Gd-Cy5.5. Un traitement de surface par plasma pourrait par exemple être facilement réalisé sur cette partie du microsystème, et permettrait de minimiser voire éviter tout phénomène d'adsorption. D'un point de vue analytique, ces différentes expériences préliminaires ont mis en exergue la nécessité de développer à l'avenir une méthode de quantification adaptée aux faibles volumes manipulés dans notre microsystème. Nous ne récupérons en effet qu'environ 30 μL côté basolatéral, ce qui laisse très peu de marge de manœuvre dans le cas où des techniques comme la spectrofluorimétrie ou les tests ELISA sont employés. Ces techniques nécessitent en effet un volume d'échantillon important (au minimum 100 μL), nous obligeant à diluer nos échantillons de manière systématique, ce qui conduit à un manque de sensibilité notamment pour la quantification par spectrofluorimétrie. Dans le cas du test ELISA beaucoup plus sensible (en théorie de l'ordre du nM), la dilution des échantillons s'avère moins problématique, mais avec cette technique la répartition d'un même échantillon dans plusieurs puits pour assurer la fiabilité des résultats rend ce test également peu adapté dans notre cas. La non reproductibilité assurée par le fournisseur au niveau des kits fournis est également un facteur supplémentaire de difficulté impossible à appréhender en amont. Ce type de test est également très fastidieux avec un temps total passé sur un essai pouvant aller jusqu'à deux jours en raison des nombreuses étapes à mettre en œuvre, dont certaines nécessitent des temps d'incubation très longs. Une méthode de quantification sur la base d'une séparation électrocinétique semble être une voie beaucoup plus adaptée, et apporterait des avantages certains, comme une rapidité d'analyse ou la possibilité de manipuler aisément de très faibles quantités d'échantillon (de l'ordre de la dizaine de μL).

Nous avons abordé cette approche, en consacrant une partie de ce travail de thèse au développement d'une méthode de quantification de l'insuline en électrophorèse capillaire, et pour laquelle le chapitre 3 suivant est consacré. Cette technique a été choisie pour à terme envisager la détection et la quantification de différentes biomolécules sur micropuce analytique. Cette dernière viendrait compléter le microsystème que nous avons développé et permettrait de réaliser la quantification en ligne des molécules ayant traversé le modèle d'épithélium pulmonaire Calu-3 cultivé en micropuits.

Chapitre 3 :

Quantification de l'insuline par électrophorèse capillaire

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au développement d'une méthode alternative à celles précédemment décrites dans le chapitre 2 permettant de détecter et quantifier les molécules ayant franchies notre modèle de barrière pulmonaire. En effet, les techniques standards de quantification utilisées lors de ces expériences, comme la spectroscopie de fluorescence - mise en œuvre classiquement dans des cuves de 1cm ou en plaque 96 puits- ou la technique ELISA également réalisée en plaques 96 puits, ne nous permettent pas d'exploiter l'un des avantages de notre microsystème, à savoir la manipulation d'échantillons de faibles volumes. L'idéal serait donc d'avoir recours à une méthode ne nécessitant pas de diluer nos échantillons. Les techniques analytiques fondées sur une séparation électrocinétique, telle que l'électrophorèse capillaire (EC) permettent de palier cette contrainte et se présentent donc comme des méthodes de choix dans notre cas. L'EC autorise en effet l'analyse d'échantillons de l'ordre la dizaine de μL sans aucune difficulté.

Dans ce chapitre, nous présentons différentes méthodologies susceptibles d'être appliquées à la quantification de l'insuline par EC. Les différentes méthodes abordées ont été choisies avec comme objectif futur de pouvoir les transposer et les adapter à une analyse en micropuce analytique, qui viendra compléter le microsystème existant. L'insuline a ici été choisie comme biomolécule modèle en raison de sa capacité connue à passer la barrière pulmonaire, caractéristique essentielle recherchée dans notre cas où l'objectif est de démontrer la faisabilité des mesures de perméabilité en microsystème. L'insuline est de plus une petite protéine (5808 Da, insuline humaine) dont la structure et la fonction sont aujourd'hui bien connues. Elle est également très facilement disponible commercialement et relativement bon marché. L'insuline est formée de deux chaînes polypeptidiques, une chaîne A de 21 acides aminés et une chaîne B de 30 acides aminés, reliées entre elles par deux ponts disulfure (Figure 57). Un pont disulfure intra-chaîne est également présent au niveau de la chaîne A.

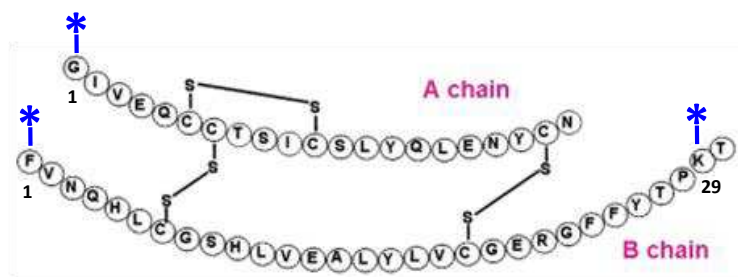


Figure 57. Structure primaire de l'insuline humaine. L'insuline possède trois sites potentiels de marquage avec des fluorophores réagissant avec des fonctions amines primaires, mis en évidence par des astérisques. Adapté de Mayer et al. (2007)

Dans une première partie introductive, nous rappelons le principe de l'EC et ses problématiques spécifiques pour l'analyse des protéines, puis nous abordons ensuite les méthodes d'immunodosages en EC qui s'avèrent être des techniques intéressantes pour la quantification de protéines dans les milieux biologiques. Dans une deuxième partie, nous décrivons les différents résultats obtenus concernant différentes stratégies envisagées pour la quantification de l'insuline. Une première stratégie a consisté à analyser l'insuline en EC par détection UV puis par détection par fluorescence induite par laser (LIF). Dans ce dernier cas, une réaction de dérivation de l'insuline avec un fluorophore a été mise au point. Une deuxième stratégie a ensuite été initiée pour la quantification de l'insuline par immunodosage en EC. Un anticorps puis un aptamère anti-insuline marqués par un fluorophore ont été testés pour permettre la formation d'un complexe avec l'insuline, sur lequel sera fondée la quantification.

I. Electrophorèse capillaire de zone (ECZ)

I.1. Principe : phénomènes de transport

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique puissante pour la séparation de peptides et protéines en raison de ses qualités intrinsèques : efficacité et résolution élevées, rapidité des analyses et faible consommation d'échantillons. Son principe repose sur la migration d'espèces en solution, porteuses d'une charge électrique globale, sous l'effet d'un champ électrique. La séparation des analytes a lieu au sein d'un capillaire en silice fondue de très faible diamètre (20 à 100 μm) en appliquant aux extrémités de celui-ci une différence de potentiel pouvant atteindre 30 kV.

La séparation des composés en EC résulte de deux mécanismes de transport, l'électroosmose et l'électromigration.

I.1.1. Electroosmose

Le phénomène d'électroosmose correspond à l'écoulement du liquide contenu dans le capillaire sous l'action d'un champ électrique tangentiel. Cet écoulement résulte de l'interaction de l'électrolyte avec la paroi du capillaire de silice présentant des groupements silanols. Ces derniers sont ionisés dès que le pH est supérieur à 2, conférant ainsi un grand nombre de charges négatives au capillaire. Les cations très mobiles de l'électrolyte sont attirés vers ces charges négatives de surface, formant ainsi une double couche polycationique composée d'une première couche dense (couche de Stern) et d'une deuxième couche diffuse (couche de Gouy-Chapman) formée par les cations excédentaires.

La double couche électrique est caractérisée par un potentiel de surface, appelé potentiel zéta (ζ). Ce potentiel dépend de l'épaisseur de la double couche et de la densité des charges, et donc du pH, de la force ionique et de la nature des cations de l'électrolyte utilisé :

$$\zeta = \frac{\delta\sigma}{\epsilon_r\epsilon_0} \quad \text{Equation (5)}$$

avec

$$\delta = \sqrt{\frac{\epsilon_0\epsilon_rRT}{2IF^2}} \quad \text{Equation (6)}$$

où δ est l'épaisseur de la double couche électrostatique (m), σ la densité de charges de surface du capillaire (C.m^{-2}), ϵ_r la constante diélectrique de l'électrolyte, ϵ_0 la permittivité du vide ($8,85.10^{-12} \text{ C}^2.\text{N}^{-1}.\text{m}^{-2}$), R la constante des gaz parfait ($8,325 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), F la constante de Faraday (96500 C.mol^{-1}) et T la température absolue (K).

Sous l'application d'un champ électrique à l'intérieur du capillaire, les cations de la couche diffuse se mettent en mouvement vers la cathode, créant ainsi un écoulement de toutes les espèces présentes au sein du capillaire, nommé électroosmose.

La vitesse linéaire de l'écoulement électroosmotique (v_{eo}) dépend du potentiel ζ et obéit à la relation d'Helmholtz-Smoluchowski :

$$v_{eo} = m_{eo}E = -\frac{\delta\sigma}{\eta}E = -\frac{\zeta\epsilon_r\epsilon_0}{\eta}E \quad \text{Equation (7)}$$

où m_{eo} est la mobilité électroosmotique ($\text{m}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$), E le champ électrique (V.m^{-1}), δ l'épaisseur de la couche électrostatique (m), σ la densité de charge de surface (C.m^{-2}) et η la viscosité de l'électrolyte (Pa.s).

I.1.2. Electromigration

L'électromigration résulte du déplacement d'une espèce chargée lorsqu'elle est soumise à un champ électrique. Les composés chargés se déplacent vers l'électrode de charge opposée à leur charge globale à une vitesse linéaire constante appelée vitesse électrophorétique, obéissant à la relation suivante :

$$v_{ep} = m_{ep} E \quad \text{Equation (8)}$$

où v_{ep} est la vitesse électrophorétique du composé (m.s^{-1}), m_{ep} sa mobilité électrophorétique ($\text{m}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$) et E le champ électrique (V.m^{-1}).

La mobilité électrophorétique d'une espèce chargée est fonction de sa charge électrique (q) et de sa taille, démontré par la relation suivante :

$$m_{ep} = \frac{q}{6\pi r\eta} \quad \text{Equation (9)}$$

où r est le rayon hydrodynamique de l'espèce et η la viscosité de l'électrolyte.

La séparation des espèces en solution est donc permise grâce à la différence de leur mobilité électrophorétique, celle-ci étant dépendante principalement du pH et de la force ionique du tampon. Pour les espèces dont la charge nette est positive la migration s'effectue dans le sens du champ électrique, de l'anode vers la cathode, et la m_{ep} est alors positive. Dans le cas des espèces chargées négativement, la migration s'effectue en sens inverse et la m_{ep} est négative (cf. Figure 58).

Le mode de séparation utilisé dans cette étude est le mode électrophorèse capillaire de zone (ECZ), mode le plus simple à mettre en œuvre et très utilisé pour l'analyse de peptides et protéines. La séparation des espèces est réalisée dans un tampon de pH et de force ionique fixés et est gouvernée par leur rapport charge sur rayon hydrodynamique assimilé au rapport charge sur masse (q/m). Plus le rapport (q/m) des espèces est élevé, plus elles migreront vite, minimisant leur diffusion et améliorant l'efficacité de la séparation. Le pH du tampon joue un rôle prépondérant puisqu'il détermine l'état d'ionisation des polypeptides en fonction de leur point isoélectrique (pI), mais aussi l'amplitude du flux électro-osmotique.

En ECZ, la vitesse globale d'un analyte est fonction de sa mobilité apparente (m_{app}) qui est la résultante des mobilités électroosmotique et électrophorétique, et détaillée dans l'équation 6. Cette mobilité apparente est la mobilité mesurée.

$$m_{app} = m_{eo} + m_{ep} = \frac{L_T l_e}{V t_m} (\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}) \quad \text{Equation (10)}$$

Avec L_T la longueur totale du capillaire (m), l_e la longueur effective du capillaire (m), V le voltage appliqué pendant la séparation (V) et t_m le temps de migration de l'analyte (s).

Comme illustré sur la Figure 58, l'ECZ permet de séparer des anions et des cations simultanément malgré leur sens de migration opposé, à la condition que l'écoulement électroosmotique présente une mobilité supérieure en valeur absolue à la mobilité électrophorétique des anions.

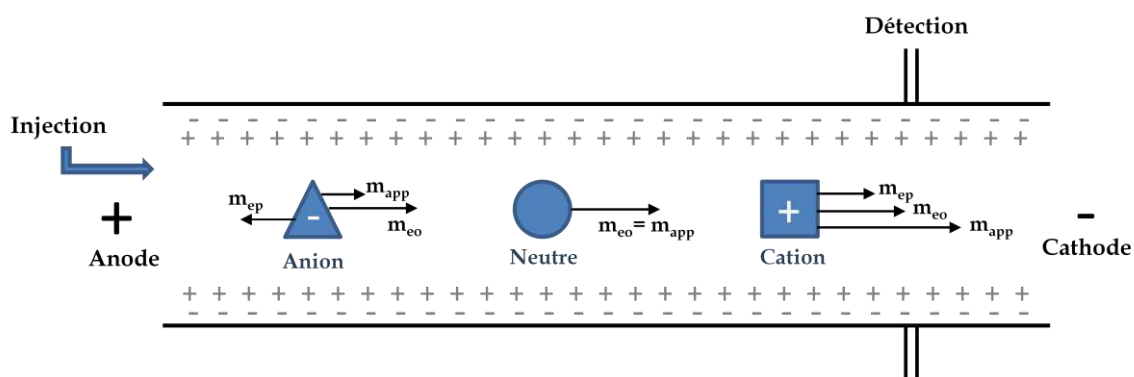


Figure 58. Schéma du principe de séparation en ECZ.

I.2. Particularités spécifiques à l'analyse des protéines et peptides

I.2.1. Phénomènes d'adsorption

L'une des principales difficultés de l'analyse des protéines en ECZ provient de leur adsorption possible sur la paroi interne des capillaires de silice vierge. Il en résulte une diminution importante des performances électrophorétiques, liée notamment à une perturbation du flux électroosmotique et un élargissement des pics conduisant à une faible efficacité et à une reproductibilité des temps de migration et des aires des pics médiocres.

Ces interactions sont le plus souvent de nature électrostatique, et dépendent des états de charge de la protéine et de la surface du capillaire, ces derniers étant gouvernés par le pH et la composition de l'électrolyte (Menon & Zydney 1998; Rabiller-Baudry & Chaufer 2001). Des interactions dipôle-dipôle, des liaisons hydrogènes, ou encore l'exposition de zones hydrophobes après dépliement des protéines (van der Veen *et al.* 2004; Miyahara *et al.* 2006; Ding *et al.* 2005) peuvent également être impliquées dans le phénomène d'adsorption coopérative des protéines entre elles. Enfin, l'exposition répétée du capillaire aux solutions protéiques due aux analyses successives favorise ce phénomène, d'où l'importance d'avoir recours à l'emploi de protocoles de rinçage appropriés entre les analyses pour désorber les protéines et ainsi minimiser l'adsorption.

Plusieurs stratégies pour limiter ce phénomène peuvent être adoptées. La plus simple d'entre elles consiste à jouer sur le pH et/ou la force ionique de l'électrolyte (Rodriguez & Li 1999; McCormick 1988; Stutz *et al.* 2003). Travailler à pH très acide permet de réduire la densité de charges négatives liées à l'ionisation des silanols et donc de réduire les interactions électrostatiques. Travailler à pH très basique permet en revanche de charger les protéines négativement et ainsi provoquer des phénomènes de répulsion entre les protéines et la paroi du capillaire également chargée négativement. Cependant, travailler à pH extrêmes peut conduire à la

dénaturation des protéines voire à leur hydrolyse. Les interactions protéines/capillaire peuvent également être considérablement atténuées en utilisant un tampon de force ionique élevée, les ions de l'électrolyte rentrant alors en compétition avec les protéines vis-à-vis des sites d'interaction de la silice.

L'approche la plus fréquemment utilisée reste la stratégie de recouvrement des capillaires par des agents de revêtement, permettant de réduire ou neutraliser les charges négatives de surface de la paroi du capillaire ou de lui conférer un état de charge positif (Stutz 2009; Lucy *et al.* 2008; Doherty *et al.* 2003). Plusieurs traitements sont possibles, à commencer par des pré-traitements permanents ou semi-permanents du capillaire, à l'aide notamment de polymères stables dans le temps et fixés au capillaire par liaison covalente ou par physisorption (polyacrylamide (PAA), alcool polyvinylique (PVA), polyéthylèneimine, polybrène...). Des revêtements permanents stables peuvent ainsi être obtenus par physisorption de multicouches de polymères cationiques et anioniques permettant de moduler l'amplitude du flux électroosmotique. Il existe aussi des revêtements dits dynamiques, réversibles, mis en place par ajout au tampon d'analyse de différents additifs recouvrant la surface interne du capillaire et masquant les groupements silanols au cours de la séparation (dérivés de la cellulose, alkylamines, polyamines, tensioactifs...) (Nehmé *et al.* 2008).

1.2.2. Dérivation de protéines et peptides par fluorescence

Le mode de détection le plus commun pour la séparation des protéines en EC est la spectrométrie d'absorbance UV, réalisée le plus souvent entre 200 et 220 nm, longueurs d'ondes caractéristiques des liaisons peptidiques. Bien que simple et quantitatif (Dolník & Hutterer 2001), ce mode de détection reste relativement peu sensible dans les cas où des concentrations faibles en analytes doivent être analysées, ce qui est généralement le cas pour les solutions protéiques.

Compatible avec l'analyse en microsystème, le mode de détection par fluorescence (Underberg & Waterval 2002; Lacroix *et al.* 2005; García-Campana *et al.* 2007) se présente comme étant la meilleure alternative au manque de sensibilité rencontré en détection UV. La détection de fluorescence se fait en général en utilisant des longueurs d'onde d'excitation comprises entre 350 nm et 650 nm. Très peu de protéines étant naturellement fluorescentes (proportion faible d'acides aminés tryptophane, phénylalanine ou tyrosine), il est nécessaire de réaliser une étape de dérivation consistant à leur greffer de manière covalente ou non un agent de dérivation fluorescent. Douée d'une très grande sensibilité, la détection par fluorescence, notamment lorsque la source d'excitation est un laser (LIF) permet d'abaisser la limite de détection et donc de

travailler avec des échantillons très peu concentrés. Dans le même temps, elle permet de modifier le rapport charge sur masse, ce qui peut faciliter la séparation électrophorétique dans certains cas. Ce mode de détection est également très sélectif puisque seules les molécules pouvant réagir avec les agents de marquage sont détectables, ce qui diminue le nombre de pics interférents. Néanmoins, l'étape de dérivation conduit bien souvent à l'apparition sur l'électrophérogramme d'interférences dues à la présence d'impuretés ou de produits dérivés du marqueur, celui-ci étant très souvent ajouté en excès afin d'obtenir de bons rendements de marquage. Le marquage de l'échantillon à analyser entraîne également un temps global d'analyse plus long et peut être la source d'une moins bonne reproductibilité.

Dans le cas d'un marquage covalent, trois types de fonctions organiques peuvent être impliquées : les fonctions amines, carboxyliques et thiols, les fonctions amines terminales de la chaîne polypeptidique et des résidus lysine étant les cibles principales de nombreux marqueurs. Les acides carboxyliques sont moins réactifs et nécessitent d'être activés avant la dérivation, tandis que les fonctions thiols des résidus cystéines sont au contraire très réactives mais ces résidus sont malheureusement peu abondants.

Le marquage non covalent des protéines est souvent moins complexe à mettre en œuvre que le marquage covalent, et requiert moins de manipulations des échantillons. Les sondes non covalentes se lient rapidement avec les protéines *via* des interactions électrostatiques et/ou hydrophobes. Leur longueur d'onde d'excitation est généralement dans le domaine du visible.

La dérivation peut être réalisée avant la séparation (mode pré-capillaire), directement dans le capillaire (mode intra-capillaire) ou après la séparation (mode post-capillaire) (Bardelmeijer *et al.* 1997; Bardelmeijer *et al.* 1998; Waterval *et al.* 2000; Underberg & Waterval 2002). La dérivation pré-capillaire présente l'avantage d'offrir une grande flexibilité en ce qui concerne les conditions de réaction. Elle est particulièrement adaptée aux réactions de dérivation lentes ou dans les cas où le milieu de réaction n'est pas compatible avec le tampon de séparation. L'obtention d'un produit dérivé unique est cependant difficile si le polypeptide possède plusieurs groupements fonctionnels susceptibles d'être marqués. Cette méthode peut entraîner un nombre de pics important lié à l'obtention de multiples dérivés fluorescents auxquels peuvent s'ajouter les pics de l'agent de dérivation, rendant difficile l'analyse d'échantillons à des concentrations très faibles. Le mode intra-capillaire possède quant à lui l'avantage majeur de pouvoir dériver des échantillons de très faibles volumes ou très dilués, mais requiert une cinétique de réaction rapide entre la protéine et son marqueur. Enfin, la dérivation post-capillaire présente l'avantage de ne pas perturber la séparation des analytes mais requiert des instruments dédiés, de très courts temps de réaction

pour le maintien d'une bonne efficacité et induit en général une dilution de l'échantillon ce qui diminue la sensibilité de détection.

I.3. Les immunoessais en ECZ pour la quantification de protéines (« EC-based immunoassay »)

Depuis une vingtaine d'années, l'EC a émergé comme outil pour conduire des immunoessais. Par définition, un immunoessai est une technique analytique basée sur la réaction immunologique entre un anticorps (Ac) et son antigène (Ag) spécifique en solution. Les immunoessais sont notamment utilisés pour la détection et/ou la quantification d'Ag (ou analytes d'intérêt) dans des échantillons biologiques complexes (sang ou urine par exemple) en exploitant la grande spécificité et affinité des anticorps pour leur cible. Les immunoessais conventionnels sont cependant mis en œuvre manuellement, sont fastidieux et peu reproductibles, et des réactions de liaisons non spécifiques sont souvent observées, altérant les limites de détection promises par ce type de tests.

Cette approche générale consistant à allier la détection d'analytes par liaisons de haute affinité (immunocomplexation), à leur séparation en EC est désignée sous le terme général de « *Capillary Electrophoresis-based ImmunoAssays* » (CEIA) (Bao 1997; Moser & Hage 2008; Schmalzing & Nashabeh 1997; Yeung *et al.* 2003; Heegaard & Kennedy 2002). Cette nouvelle approche permet de combiner les atouts de l'EC (automatisation, grande efficacité, rapidité d'analyse, faible consommation de réactifs et d'échantillons) à la grande spécificité et sélectivité des tests fondés sur l'immunoaffinité. Le principe de cette nouvelle génération d'immunoessais repose sur la séparation en EC des complexes [antigène (analyte)/anticorps] formés, de l'analyte ou de l'anticorps libre, grâce à leur différence de mobilités électrophorétiques (m_{ep}).

Dans un but de quantification, les CEIA peuvent être employés selon deux modes distincts, le mode compétitif et le mode non compétitif. Dans ce qui suit, pour des raisons de simplicité d'explications, nous nous plaçons dans la configuration où l'analyte d'intérêt est assimilé à l'antigène, le principe étant bien évidemment applicable dans le sens inverse où l'analyte à quantifier correspond à l'anticorps.

Dans le mode compétitif, l'analyte d'intérêt (Ag) entre en compétition avec un analyte analogue marqué généralement avec un fluorophore (Ag*) pour sa liaison à l'anticorps (Ac) présent en quantité limitée (Figure 59a). La concentration de l'Ag dans l'échantillon est directement proportionnelle à celle de l'Ag* libre, mais inversement proportionnelle à celle de l'immunocomplexe* (Ag*/Ac). La concentration de l'analyte d'intérêt dans l'échantillon est alors déterminée par comparaison des aires des pics correspondants à l'analyte compétitif marqué sous

sa forme libre et complexée, et dont la concentration est connue. Le mode non compétitif (Figure 59b), également appelé « *Affinity Probe Capillary Electrophoresis* » (APCE), fait intervenir l'anticorps sous forme marquée (Ac^*) ajouté à concentration constante et en excès dans l'échantillon contenant l'analyte d'intérêt. L'immunocomplexe (Ag/Ac^*) détecté en ECZ est directement relié à la concentration de l'analyte contenu dans l'échantillon.

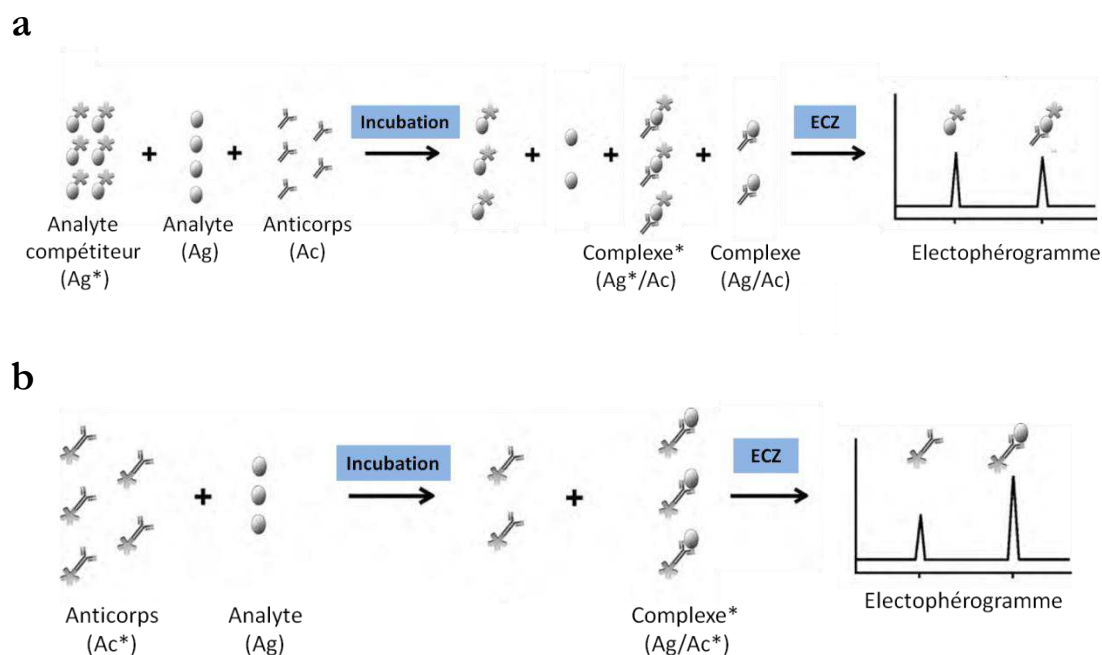


Figure 59. Principe des immunoessais en électrophorèse capillaire.
(a) Mode compétitif ; (b) Mode non compétitif. Adapté de Szöko & Tábi (2010)

En principe, les tests non compétitifs offrent certains avantages par rapport au format compétitif, comme une gamme dynamique plus étendue, ou encore une limite de détection dépendant moins de l'affinité entre l'analyte et le ligand (Shimura & Karger 1994). Malgré ces avantages, plusieurs problèmes pratiques ont limité le développement de dosages non compétitifs en EC, inconvénients inhérents aux anticorps eux-mêmes. L'obtention d'anticorps marqué sous forme de produit homogène est difficile à obtenir, et le contrôle de la position du marqueur est très délicate, et peut venir interférer au niveau du site de liaison du ligand. Les Ac sont également des molécules assez hétérogènes, leurs propriétés électrophorétiques sont alors difficilement prédictibles. Enfin, en raison de leur très grande taille (~ 150 kDa), il peut être très difficile d'obtenir une résolution suffisante entre le pic de l'anticorps libre de celui du complexe, notamment dans le cas où l'analyte est de petite taille et n'affecte par de manière significative la mobilité électrophorétique du complexe (German *et al.* 1998; Schmalzing & Nashabeh 1997).

II. Quantification directe de l'insuline

La première stratégie de quantification de l'insuline a été effectuée de manière directe, dans ce sens qu'elle a été fondée sur l'analyse et l'observation du pic correspondant à la biomolécule. Deux modes de détection ont été utilisés : la détection UV puis la détection LIF.

II.1. Insuline non marquée et détection UV

En étude préliminaire, l'insuline a été analysée par ECZ en utilisant la détection d'absorbance UV (ECZ-UV) afin de déterminer des conditions d'analyse qui serviront de base pour la suite de l'étude. Cette première étude a consisté essentiellement à évaluer l'impact du tampon de séparation (type, pH, force ionique) et le protocole de rinçage du capillaire entre chaque injection sur la qualité des analyses, dans le but d'obtenir les meilleurs profils électrophorétiques possible. Des solutions d'insuline à 0,05 mg/mL dans HCl 0,1 M ont été utilisées et toutes les analyses ont été réalisées avec les paramètres fixes suivants :

- Capillaire en silice vierge de longueur totale (L_t) 60,2 cm, longueur effective (l_e) 50 cm et de diamètre interne 75 μm ;
- Injection des échantillons à 0,5 psi pendant 5 s ;
- Tension appliquée de -20 kV (détection à la cathode).

Pour commencer, plusieurs types de tampon de séparation ont été évalués, tous de force ionique identique (50 mM). L'insuline est une protéine acide avec un point isoélectrique (pI) de 5,7. Nous nous sommes concentrés sur des pH neutre ou basique, afin de travailler dans des conditions où l'insuline et la paroi du capillaire sont chargées négativement. Les phénomènes d'adsorption de l'insuline sur la paroi du capillaire sont ainsi minimisés.

Les résultats obtenus et illustrés sur la Figure 60 montrent bien l'importance de l'impact du tampon de séparation sur les performances électrophorétiques. En effet, parmi les différents systèmes tampons testés ici, seul le tampon borate a permis d'obtenir un profil correct, et plus particulièrement à pH 9 avec l'apparition d'un pic d'insuline fin et symétrique. Dans nos conditions d'analyse, le tampon HEPES pH 8 provoque une forte perturbation de la ligne de base et le tampon phosphate pH 7 entraîne un élargissement important du pic de l'insuline.

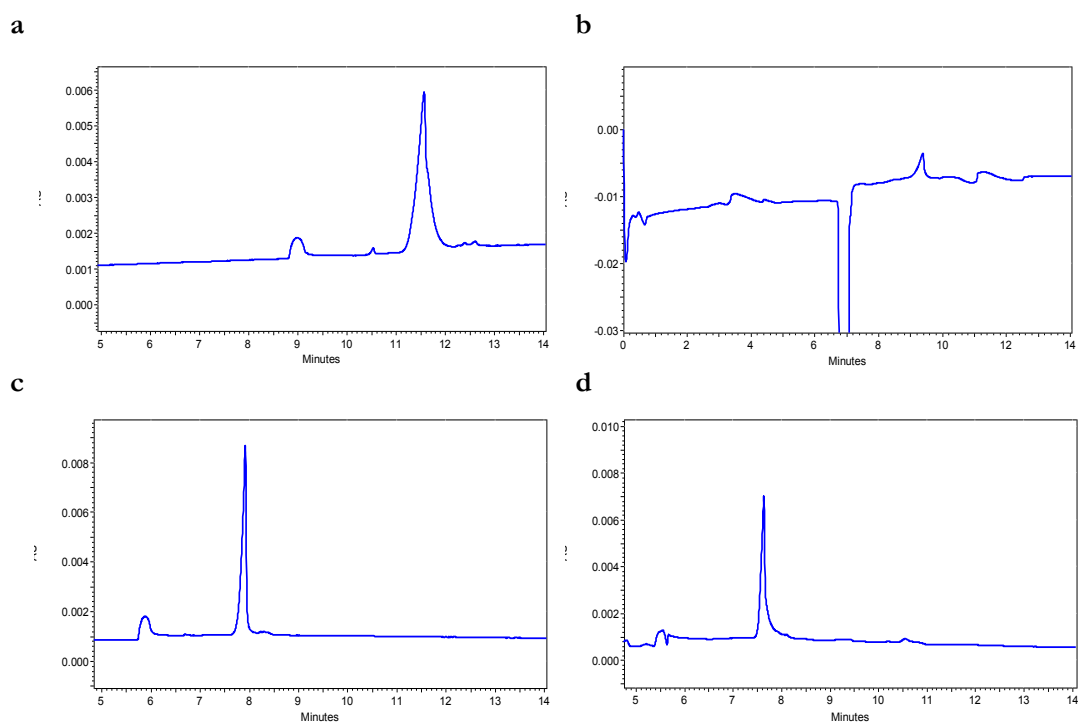


Figure 60. Profils électrophorétiques en ECZ-UV de l'insuline selon le tampon de séparation utilisé : (a) tampon phosphate pH 7, (b) HEPES pH 8, (c) borate pH 9, (d) borate pH 10.
 Capillaire en silice vierge, $l_e=50$ cm, $d_i=75$ μ m. Injection : 0,5 psi, 5 sec. Séparation : $V=+20$ kV ;
 $T=20^\circ\text{C}$

Nous avons ensuite fait varier la force ionique du tampon borate pH 9 de 50 à 100 mM. L'augmentation de la force ionique s'accompagne logiquement d'un temps de migration plus long, mais également d'un élargissement du pic d'insuline, particulièrement marqué à 100 mM. Une force ionique de 50 mM a donc été sélectionnée.

Afin de prévenir l'adsorption de l'insuline sur la paroi du capillaire, le protocole de rinçage mis en œuvre entre chaque analyse a par la suite été optimisé. Les quatre protocoles testés sont détaillés dans le Tableau 6. Les performances de solutions de NaOH, HCl et SDS couramment employées pour désorber les protéines de la paroi des capillaires (Stutz *et al.* 2003) ont été comparées.

Temps de rinçage	Protocole 1	Protocole 2	Protocole 3	Protocole 4
3 min	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
2 min	--	--	SDS 40 mM	HCl 0.1 M
2 min	NaOH 1 M	NaOH 0,1 M	NaOH 1 M	NaOH 0,1 M
2 min	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
3 min	Tampon	Tampon	Tampon	Tampon

Tableau 6. Différents protocoles de rinçage évalués pour limiter l'adsorption de l'insuline analysée en capillaire de silice vierge.

L'efficacité des rinçages a été évaluée en calculant les coefficients de variation (CV) des temps de migration (t_m) et des aires du pic de l'insuline sur 5 analyses successives, et dont les résultats sont présentés dans le Tableau 7.

Paramètre		Protocole 1	Protocole 2	Protocole 3	Protocole 4
t_m (min)	Moyenne	7,12	7,11	7,30	7,10
	CV (%)	0,24	0,24	1,15	0,23
Aire du pic (V.min)	Moyenne	45022	47461	41236	42258
	CV (%)	3,49	5,06	6,76	15,09

Tableau 7. Répétabilité de 5 analyses successives de l'insuline en tampon borate pH 9, FI 50 mM.
Données des temps de migration et aires des pics (moyennes et coefficients de variation (CV)).

Une très bonne répétabilité des temps de migration a été obtenue quelque soit la procédure de rinçage appliquée. La superposition des électrophérogrammes présentés Figure 61 met cependant en évidence une dérive de la ligne de base au fur et à mesure des analyses, notamment pour les protocoles 2 et 4, et dans une moindre mesure pour le protocole 1, signe d'une légère adsorption de l'insuline sur la paroi du capillaire. La présence de SDS permet d'éviter ce phénomène puisqu'aucune dérive de la ligne de base n'est observée pour le protocole 3. A la différence du NaOH, le SDS est en effet capable de se lier aux protéines et de les dénaturer (Lloyd & Wätzig 1995), avec ainsi un pouvoir de désorption plus important.

En ce qui concerne le CV des aires des pics, seul le protocole 1 a permis d'obtenir une très bonne répétabilité avec un CV de 3,2% (<5%). Ce protocole 1 a donc été choisi, une constance de l'air du pic d'insuline ayant été préférée au détriment d'une légère dérive de la ligne de base.

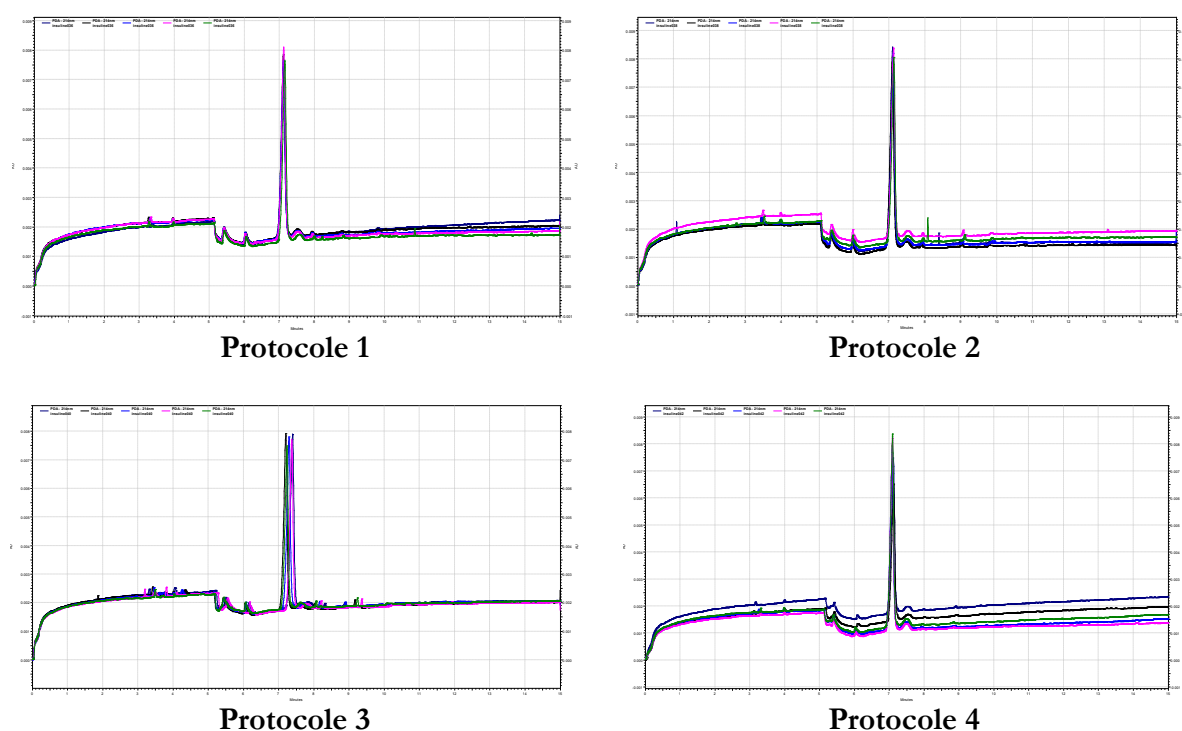


Figure 61. Profils électrophorétiques en ECZ-UV de l'insuline selon le protocole de rinçage appliqué entre chaque analyse. Réalisation de 5 analyses par condition de rinçage (cf. Tableau 6). Conditions expérimentales identiques à la Figure 60.

II.2. Insuline marquée et détection LIF

La sensibilité offerte par la détection UV étant relativement faible (de l'ordre de 10^{-5} M) et afin de pouvoir envisager de détecter de très faibles quantités d'insuline ayant franchie nos barrières miniaturisées, nous avons cherché à améliorer la sensibilité de détection en utilisant la détection par fluorescence. Dans l'optique où l'insuline est destinée à être analysée après passage de la barrière pulmonaire, nous avons opté pour le développement d'une méthode de marquage de l'insuline par un fluorophore. Le passage d'une molécule à travers une barrière biologique dépend en effet grandement de sa masse et de son degré d'hydrophobie. De fait, la présence d'un fluorophore sur la molécule d'intérêt peut modifier l'un et/ou l'autre de ces paramètres, et conduire à une modification de sa perméabilité. Il a par ailleurs été démontré que les dérivés de l'insuline marquée au FITC présentaient une activité biologique modifiée comparée à l'insuline native (Bromer *et al.* 1967; Tietze *et al.* 1962). Pour ces raisons, nous avons choisi de travailler avec une insuline non modifiée pour le passage des barrières pulmonaires et de ne la dériver que par la suite.

Plusieurs marqueurs présentant une longueur d'onde d'excitation autour de 488 nm compatibles avec les lasers disponibles au laboratoire ont été envisagés pour dériver l'insuline en mode pré-capillaire : le 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F), le 3-(2-furoyl)-quinoline-2-carboxaldéhyde (FQ) et Fluoprobes 488 NHS-ester (FP 488) ayant des temps de réaction très rapides, ainsi que l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) au temps de réaction plus long. Le NBD-F et le FQ n'ayant pas donné une sensibilité de détection satisfaisante et le FP 488 ayant conduit à de nombreux pics interférents, seuls les résultats obtenus avec le FITC sont présentés ici.

Plusieurs facteurs comme la concentration en FITC, le temps et la température de réaction, ainsi que le milieu réactionnel ont été évalués afin d'obtenir la meilleure efficacité de marquage possible. Pour optimiser la méthode de séparation en ECZ, les conditions de séparation (type et pH du tampon de séparation) ont ensuite été évaluées.

II.2.1. Optimisation des conditions de dérivation

Le FITC est un fluorophore très communément utilisé en raison de son faible coût et parce qu'il conduit à de hauts rendements quantiques de fluorescence. Le FITC réagit avec les amines primaires des protéines, portant à 3 le nombre de sites de réaction potentiels dans le cas de l'insuline (cf Figure 57) : au niveau des extrémités N-terminales (positions A1 et B1), et au niveau de la chaîne latérale (résidu lysine en position B29). Tous ces sites potentiels de réaction peuvent conduire, selon les conditions de pH utilisées pour la réaction, à 4 dérivés majoritaires d'insuline mono-, di-, ou tri-marqués (A1, B1, A1B1 et A1B1B29) (Hentz *et al.* 1997).

La cinétique de réaction du FITC est connue pour être relativement longue, en effet la plupart des travaux faisant état de la dérivation de protéines au FITC décrivent des temps de réaction en général de 12h à 24h à température ambiante (Hentz *et al.* 1997; Maeda *et al.* 1969; Bromer *et al.* 1967; Albin *et al.* 1991). L'optimisation des conditions de dérivation a été réalisée dans des conditions similaires, soit pendant une nuit à température ambiante.

Différents ratios molaires FITC/insuline ont dans un premier temps été évalués (1, 10 et 100). Une concentration molaire de FITC 100 fois supérieure à celle de l'insuline a permis d'obtenir à la fois une intensité de fluorescence satisfaisante et un nombre de dérivés multimarqués faible, compromis recherché afin de rendre plus aisée la quantification de l'insuline.

L'impact du milieu réactionnel sur l'efficacité de la réaction de marquage a également été étudié. Pour cela, la réaction de dérivation a été réalisée dans différents tampons de nature et pH différents : tampon PBS pH 7,4, tampon borate/phosphate pH 8 et tampon borate pH 9. De

plus grandes intensités de fluorescence ont été obtenues avec les pH basiques, sans néanmoins observer de différence significative entre les tampons pH 8 et 9.

Enfin, le tampon de séparation a été optimisé afin d'obtenir la meilleure résolution possible des pics d'insuline marquée, en testant les systèmes tampons décrits ci-dessus. Les meilleurs profils ont été obtenus avec un tampon borate/phosphate pH 8, 75 mM. Dans ces conditions, deux pics principaux attribués à l'insuline marquée au FITC sont observés, notés Ins-FITC 1 et Ins-FITC 2 sur l'électrophérogramme correspondant présenté Figure 62.

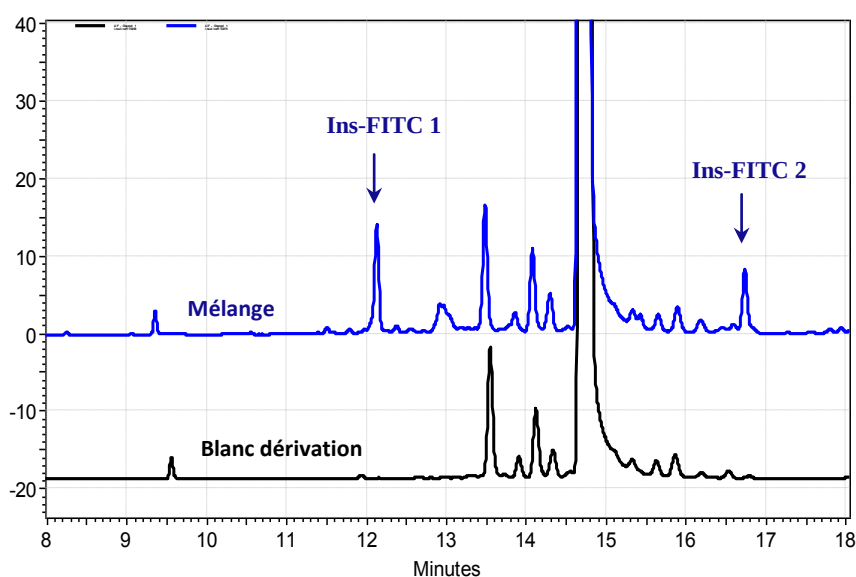


Figure 62. Electrophérogramme ECZ-LIF de l'insuline dérivée au FITC après une nuit à température ambiante. Dérivation en tampon borate pH 8 ; ratio molaire=100 ([FITC] 0,13 mM, [Insuline] 0,0013 mM). Capillaire en silice vierge, le=50 cm, di=50 μ m. Injection : 0,5 psi, 5 sec. Séparation : tampon borate/phosphate pH 8, FI 75 mM ; V=+20 kV ; T= 20°C.

Il est difficile de prédire le nombre de sites marqués pour chacun des deux dérivés fluorescents de l'insuline (Ins-FITC 1 et Ins-FITC 2) formés dans nos conditions de dérivé. Néanmoins, l'ajout d'une molécule de FITC (389 Da avant marquage) conduit à un changement de masse de l'insuline (5808 Da) de 7%. Cependant à pH 8, la charge de la protéine après dérivé est modifiée par l'ajout d'au moins une charge négative apportée par le FITC possédant une fonction carboxylique, en remplacement de la charge positive de l'amine avec laquelle le fluorophore réagit. La différence de charge est alors de l'ordre de 25% (le nombre de charges négatives étant estimé à 4 pour l'insuline non marquée à pH 8). La contribution de la charge est donc plus importante que celle de la masse. Une insuline mono-marquée posséderait alors un rapport charge/masse (q/m) et donc une m_{ep} plus faible qu'une insuline multi-marquée. Sous cette

hypothèse, le premier pic supplémentaire (~12 min) correspondrait à l'insuline mono-marquée, et le deuxième (~16,5 min) à un dérivé multi-marqué.

II.2.2. Dérivation de l'insuline au FITC par chauffage

Bien qu'une réaction de marquage de l'insuline relativement satisfaisante ait été obtenue à température ambiante, le temps de réaction nécessaire, excessivement long, rend difficile son adaptation en microsystème. Pour tenter de diminuer ce temps de réaction, les solutions de dérivation ont été incubées à plus haute température, à 37°C et 55°C. L'accélération de la réactivité du FITC sous l'effet de la température a en effet été démontrée par plusieurs auteurs, avec en général des températures de travail se situant entre 40°C et 100°C permettant de diminuer le temps de réaction à quelques heures (<10h) (Román *et al.* 2004; Li *et al.* 2001; Zinellu *et al.* 2009). Une étude beaucoup moins conventionnelle fait état d'un temps de réaction de seulement 2 min en plaçant le mélange réactionnel dans un micro-ondes à une puissance de 700W (Zhou *et al.* 2010).

Afin de s'assurer que le FITC ne se dégrade pas sous l'action de la température, différents aliquots d'un blanc de dérivation (FITC dans le tampon de dérivation) ont été injectés à différents temps d'incubation (0h, 1h, 2h et 4h). L'analyse a été réalisée en utilisant comme électrolyte le tampon borate/phosphate pH 8, FI 75 mM et en sélectionnant une détection par absorbance UV. A 37°C, les profils électrophorétiques obtenus et illustrés Figure 63 mettent en évidence la présence d'un pic majoritaire de FITC qui ne diminue que très légèrement au profit de l'augmentation des pics minoritaires au fil du temps. En revanche, la même étude réalisée à 55°C a montré que le FITC subissait une dégradation très importante en seulement 1h d'incubation, avec l'intensité du pic majoritaire diminuée de plus de moitié. Cette température de réaction n'a donc pas été retenue.

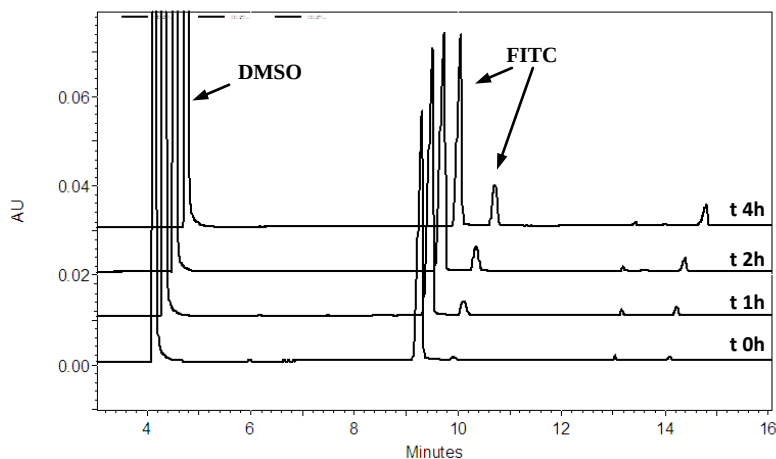


Figure 63. Cinétique de dégradation du FITC à 37 °C en ECZ-UV. Capillaire en silice vierge, le=40 cm, di=50 µm. Injection : 0.5 psi, 5 sec. Séparation : tampon borate/phosphate pH 8, FI 75 mM ; V=+20 kV ; T= 20°C. Détection : UV 214 nm.

L'influence du temps d'incubation sur le rendement de marquage a ensuite été évaluée à 37°C, en ECZ-UV afin de pouvoir observer l'évolution du pic de l'insuline non marquée, non détectable en détection LIF. Une solution de dérivation a été préparée par ajout de FITC dilué dans le DMSO à une solution d'insuline en tampon borate pH 9 (FI 40 mM), avec un ratio molaire FITC/insuline de 100 (soit des concentrations finales de 0,013 mM en insuline et 1,3 mM en FITC). La solution de dérivation, répartie en plusieurs aliquots, a été placée dans un bain-marie à 37°C à l'abri de la lumière. Les différents aliquots ont ensuite été injectés à différents temps de réaction, les électrophérogrammes obtenus sont présentés Figure 64.

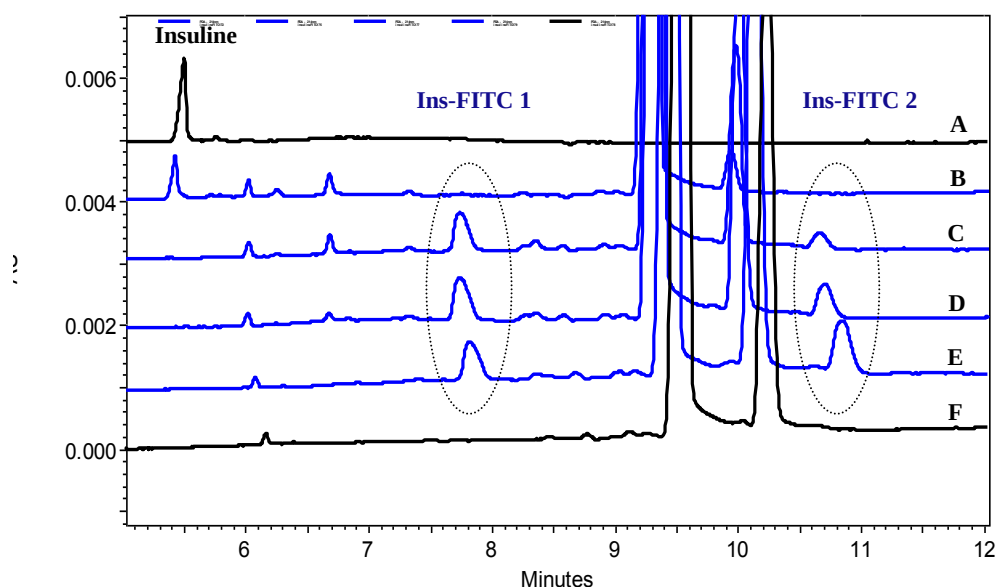


Figure 64. Influence du temps d'incubation sur la réaction de dérivation de l'insuline au FITC à 37°C. (A) Blanc insuline ; (B) mélange t0 ; (C) mélange t1h ; (D) mélange t2h ; (E) mélange t4h ; (F) blanc dérivation t4h. Capillaire en silice vierge, le=40 cm, di=50 µm. Injection : 0.5 psi, 5 sec. Séparation : tampon borate/phosphate pH 8, FI 75 mM ; V=+20 kV ; T= 20°C. Détection : UV 214 nm.

La disparition du pic d'insuline non marquée ($t_m=5,5$ min) montre que la réaction est totale après seulement 1h d'incubation. Tout comme à température ambiante, deux pics supplémentaires non présents dans le blanc de dérivation apparaissent également après 1h d'incubation. Ces pics sont attribués aux deux dérivés de l'insuline marquée, Ins-FITC 1 et 2, avec des temps de migration de 7,8 min et 10,8 min respectivement. Il faut noter que le décalage des temps de migration des pics d'insuline marquée obtenus ici par rapport à ceux obtenus après réaction à température ambiante (cf Figure 62) est dû à des longueurs de capillaire différentes. Ces résultats mettent également en évidence une augmentation de la hauteur du pic du dérivé Ins-FITC 2 avec le temps d'incubation, ce qui n'est pas le cas pour le dérivé Ins-FITC 1. Ceci pourrait confirmer l'hypothèse que nous avons faite précédemment concernant l'attribution des pics d'insuline marquée. La réaction avec le FITC n'étant pas immédiate, une certaine proportion d'insuline mono-marquée devient di- puis tri-marquée au cours du temps, ce qui expliquerait l'augmentation progressive du pic Ins-FITC 2 correspondant à dérivé multi-marqué et la constance du pic Ins-FITC 1 correspondant à l'insuline mono-marquée.

Un temps d'incubation de 4h a donc été choisi pour la suite afin d'assurer une réaction la plus totale possible, en vue d'obtenir une sensibilité de détection élevée.

Le profil électrophorétique de la solution d'insuline marquée a été observé en ECZ-LIF après 4h d'incubation à 37°C. Celui-ci a mis en évidence la présence de pics secondaires de FITC non détectés en UV, un certain nombre d'entre eux possédant des mobilités électrophorétiques proches du dérivé Ins-FITC 2, ce qui ne nous a pas permis d'obtenir une bonne résolution pour ce dérivé. Une meilleure résolution a été obtenue en augmentant la longueur effective du capillaire de 40 cm à 50 cm. Le profil électrophorétique ainsi obtenu est présenté Figure 65.

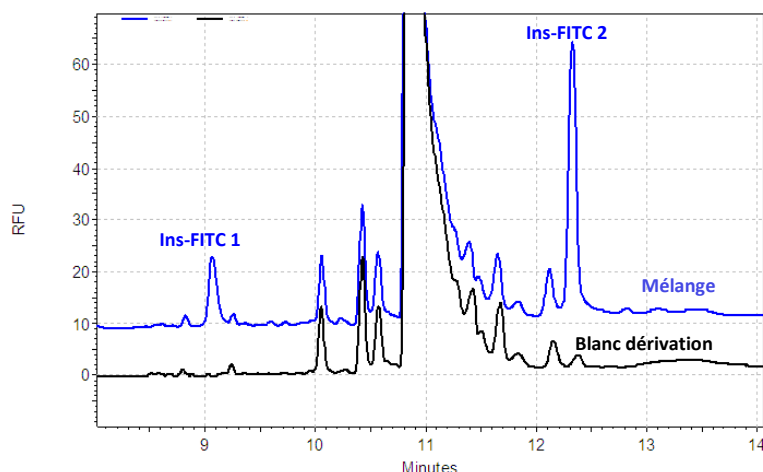


Figure 65. Electrophérogramme ECZ-LIF de l'insuline dérivée au FITC après 4 h d'incubation à 37°C. Capillaire en silice vierge, $l_e=50$ cm, $d_i=50$ μ m. Injection : 0,5 psi, 5 sec. Séparation : tampon borate phosphate pH 8, FI 75 mM ; $V=+20$ kV ; $T=20^\circ\text{C}$. Ratio molaire insuline/FITC : 1/100.

Sous ces conditions, les deux pics d'insuline marquée sont bien séparés des pics secondaires du FITC ce qui nous a permis d'étudier la linéarité de la réponse en fonction de la concentration d'insuline dans l'échantillon.

Pour cela, une série de solutions de dérivation contenant un volume constant de concentrations croissantes en insuline a été préparée (0-130 μ M) par dilutions successives, la concentration en FITC ayant été fixée à 1300 μ M. Tous les échantillons ont été préparés à partir de solutions mères d'insuline à 2 mM en tampon borate pH 9, 40 mM et de FITC à 25,6 mM dans le DMSO. Après 4h d'incubation à 37°C, les échantillons ont été placés à -20°C pour stopper la réaction puis décongelés au fur et à mesure des analyses. Ces dernières sont présentées sur la Figure 66.

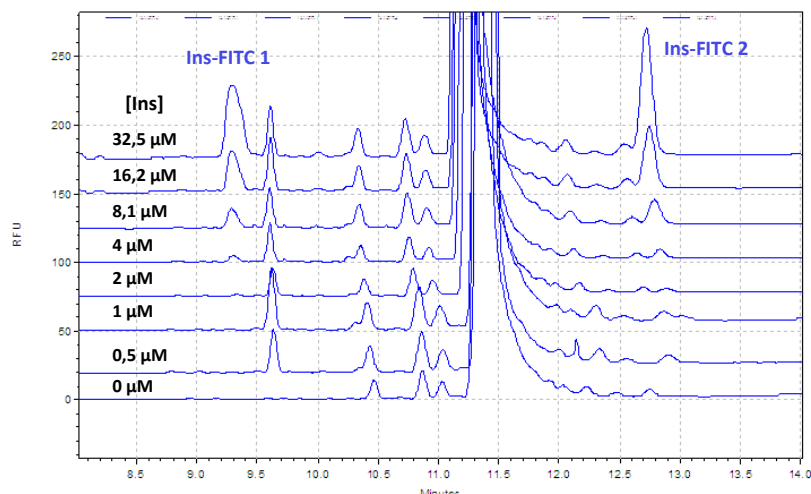


Figure 66. Electrophérogammes ECZ-LIF de l'insuline dérivée au FITC après 4 h d'incubation à 37°C et à concentrations croissantes. Conditions expérimentales identiques à la Figure 65.

Les aires du pic d'insuline marquée correspondant au dérivé Ins-FITC 2 ont ensuite été tracées en fonction de la concentration en insuline introduite dans chaque échantillon. Un domaine de linéarité a été obtenu dans une gamme de concentrations en insuline de 0,5 à 32,5 μM (Figure 67). En effet, le tracé de l'aire des pics en fonction de la concentration en insuline aboutit à une courbe de calibration qui tend vers 0, ce qui confirme l'absence d'interférences avec les pics de FITC, et dont le coefficient de détermination r^2 est de 0,994.

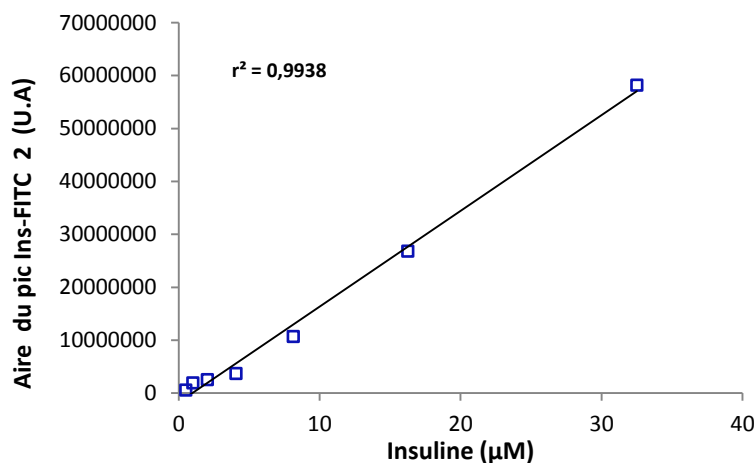


Figure 67. Courbe de calibration pour la quantification de l'insuline marquée au FITC.
Réaction 4h à 37°C.

Au total, l'ensemble des résultats montrent que la réaction de dérivation de l'insuline par le FITC est totale dans les conditions expérimentales étudiées (incubation 4h à 37°C). La méthode d'analyse ECZ-LIF optimisée permet de quantifier la présence d'insuline dans un échantillon de

concentration inconnue, avec une limite de détection (LOD) plus faible que celle obtenue en UV. Un gain de sensibilité d'un facteur 20 a en effet été obtenu, avec une LOD de 0,5 μ M.

III. Quantification de l'insuline par CE-based immunoassay et détection LIF

Afin d'espérer diminuer davantage la LOD de l'insuline en exploitant le potentiel de la détection LIF, nous avons envisagé une autre approche consistant à mettre au point une méthode de CEIA avec une détection LIF, reposant dans un premier temps sur l'emploi d'un Ac marqué à l'AlexaFluor 488, puis sur l'emploi d'un aptamère marqué à l'Atto 488, tous deux spécifiquement dirigés contre l'insuline.

III.1. Complexation de l'insuline avec un anticorps

Pour une première approche, nous avons choisi de réaliser la quantification de l'insuline en mode non compétitif, en utilisant un Ac fluorescent (Ac*), l'insuline étant non marquée (cf. Figure 59b). La quantification de la biomolécule repose dans ces conditions sur l'étude de l'évolution du pic de l'Ac* non complexé et de celui représentant le complexe Ac*/insuline. Ce mode non compétitif n'a jamais été reporté dans la littérature pour la quantification de l'insuline en EC. En revanche, une méthode de quantification de l'insuline en mode compétitif a été décrite par Dishinger *et al.* (2009) et Roper *et al.* (2003) en micropuce analytique, où l'insuline sécrétée par des cellules pancréatiques a été quantifiée, par mise en compétition de l'insuline biologique avec une insuline marquée au FITC pour la liaison à un Ac anti-insuline commun. Un mode compétitif a également été reporté, mais celui-ci s'est basé sur la quantification de l'Ac anti-insuline, en utilisant une insuline marquée et une détection LIF dans le proche infra-rouge (Sowell *et al.* 2001).

L'Ac utilisé ici est un Ac anti-insuline fluorescent commercial (Ac monoclonal de lapin conjugué à l'Alexa Fluor 488, Cell Signaling Technology®). Afin de favoriser la réaction de complexation, nous avons choisi de réaliser les incubations de l'Ac avec l'insuline dans un tampon à pH 7,4 correspondant au pH physiologique sanguin. Nous avons également choisi d'utiliser comme électrolyte un tampon de pH identique en vue de ne pas déstabiliser le complexe formé lors de la séparation électrophorétique. Avant toute chose, nous avons évalué le profil électrophorétique de l'Ac. Les premières analyses réalisées en capillaire de silice vierge ayant révélé un phénomène d'adsorption de l'Ac sur la paroi du capillaire, nous avons travaillé par la suite sur des capillaires revêtus. Deux coatings neutres permanents ont été testés : l'EpDMA (epoxy-poly-(diméthylacrylamide)) et le PAA (poly(acrylic acid)), tous deux compatibles et stables à pH 7,4.

De nombreux paramètres et conditions d'analyse ont été étudiés : type du tampon de séparation, voltage appliqué à la séparation et temps d'injection. Le profil électrophorétique de l'Ac le plus satisfaisant a été obtenu avec le coating EpDMA, en effectuant la séparation en tampon borate/phosphate pH 7,4, et en appliquant une pression lors de la séparation en plus de l'application de la différence de potentiel. Comme illustré Figure 68, plusieurs pics apparaissent, dont un majoritaire relativement symétrique mais très large.

Des mélanges d'incubation de l'Ac avec l'insuline ont par la suite été analysés, et plusieurs conditions ont été testées, notamment le type du tampon d'incubation, le temps et la température d'incubation. L'insuline a été ajoutée à une solution d'Ac dans une proportion permettant d'être en excès d'Ac. Malgré de nombreux essais, aucune condition ne nous a permis d'obtenir le profil attendu, soit l'apparition d'un pic supplémentaire témoin de la formation d'un complexe [Insuline/Ac]. Tous les profils électrophorétiques obtenus sont en effet identiques à ceux de l'Ac seul, comme le montre l'exemple d'électrophérogramme présenté dans l'encadré de la Figure 68.

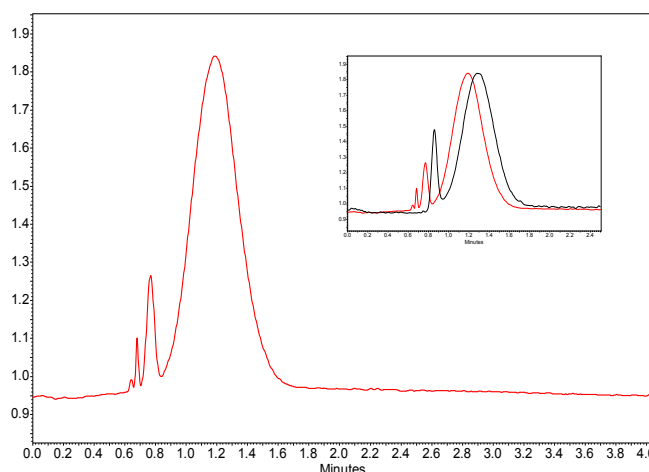


Figure 68. Profils électrophorétiques ECZ-LIF de l'Ac anti-insuline seul (rouge) et en présence d'insuline (noir) sur capillaire neutre EpDMA. Capillaire $l=50$ cm, $d_i=75$ μ m. Injection : 0,1 psi, 5 sec. Séparation : tampon borate phosphate pH 7,4, FI 75 mM ; $V= +15$ kV + 0,5 psi. Ratio molaire Ac/insuline: 2/1.

L'insuline possédant un poids moléculaire très faible comparé à celui de l'Ac (5808 contre 150 000 Da), la probabilité pour que la mobilité électrophorétique du complexe [Insuline/Ac*] comparée à celle de l'Ac* non complexé soit inchangée est très forte, conduisant à une co-migration des deux analytes. Bien qu'une optimisation de la méthode soit envisageable en modifiant d'autres paramètres (pH et force ionique de l'électrolyte par exemple) et conduise à l'amélioration de la résolution, nous avons souhaité explorer une autre méthode reposant sur la complexation de l'insuline avec un autre partenaire possédant un poids moléculaire nettement

plus faible, pour favoriser la séparation de l'espèce complexée de celle non complexée. Nous nous sommes alors penchés sur les aptamères, qui de manière très récente, sont utilisés en lieu et place des Ac pour réaliser ce type de méthode de quantification.

III.2. Complexation de l'insuline avec un aptamère

Les aptamères se présentent comme une nouvelle alternative aux problématiques liées à l'utilisation des Ac, et sont de manière relativement récente, utilisés comme sondes d'affinité pour les études d'APCE en mode non compétitif (German *et al.* 1998; Shen *et al.* 2010; Huang *et al.* 2004). Les aptamères sont de courtes séquences oligonucléotidiques synthétiques de quelques dizaines de bases nucléiques (ADN ou ARN) capables de se lier à de nombreux types de molécules cibles (Famulok & Mayer 1999) (peptides, protéines, molécules organiques et inorganiques, cellules) avec une grande affinité et une grande spécificité (Patel *et al.* 1997; Clark & Remcho 2002). Les aptamères sont utilisés dans le cadre de nombreuses applications impliquant un phénomène de reconnaissance moléculaire. Dans un premier temps employés comme agents thérapeutiques ou de diagnostic (Brody & Gold 2000), ils ont été plus récemment exploités pour diverses applications analytiques (Mairal *et al.* 2008): essais bioanalytiques, techniques séparatives ou élaboration de biocapteurs.

Les aptamères présentent des propriétés de reconnaissance moléculaire semblables à celles des anticorps tout en présentant de nombreux avantages par rapport à ces derniers (Jayasena 1999) :

- leur sélection est effectuée *in vitro* (méthode SELEX, pour *Systematic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment*) et ne dépend pas de processus biologiques (culture de cellules, production chez l'animal) leur conférant une sûreté vis-à-vis des réactions immunogènes ;
- les conditions de sélection peuvent être modulées afin d'obtenir des aptamères affins pour une cible spécifique dans des conditions particulières (par exemple un tampon ou une température spécifique) en fonction de l'application envisagée ;
- produits par synthèse chimique avec une grande précision et une grande reproductibilité, les variabilités inter-lots sont minimisées drastiquement ;
- le marquage avec un fluorophore est très aisé, et peut être réalisé pendant la synthèse avec un contrôle de la position de la modification ;
- enfin, les aptamères présentent une meilleure stabilité temporelle que les anticorps, et peuvent être conservés à température ambiante. Après dénaturation, ils peuvent être régénérés facilement et ce en seulement quelques minutes.

Encore très peu de publications sont consacrées à l'utilisation des aptamères dans le but de développer des méthodes de détection de complexes aptamères-ligands pour la CEIA. Il en ressort néanmoins que certains paramètres de séparation comme le tampon de séparation, la tension appliquée, le temps et la température de séparation sont des paramètres importants à optimiser pour non seulement maintenir l'intégrité des complexes formés, mais également pour observer le complexe aptamère-ligand (Buchanan *et al.* 2003; Shen *et al.* 2010; German *et al.* 1998). Par exemple, une longueur de capillaire courte et une température de séparation < 20°C seraient des paramètres importants. Parallèlement, les tampons d'incubation et/ou de séparation joueraient un rôle crucial dans la formation du complexe et son maintien pendant la séparation. Notamment, la composition en sels et leur concentration peuvent changer la conformation de l'aptamère et donc impacter la complexation par changement de la structure impliquée dans la liaison avec l'analyte considéré. Les acides nucléiques sont des structures polyanioniques (présence de nombreux phosphates) et requièrent des contre-ions pour un repliement correct. Par exemple, le potassium (ou le sodium) serait requis pour la formation et/ou la stabilisation des structures en G-quadruplexes et le magnésium serait favorable à la stabilisation thermodynamique de certaines structures.

III.2.1. Structure et propriétés de l'aptamère anti-insuline

L'aptamère dirigé contre l'insuline est un oligonucléotide ADN de 30 bases dont la séquence est la suivante : 5'-GGT-GGT-GGG-GGG-GGT-TGG-TAG-GGT-GTC-TTC-3' (Yoshida *et al.* 2009). L'aptamère a été synthétisé, marqué en position 3' par le fluorophore Atto 488 et purifié par la société Eurogentech. Sa masse moléculaire avec prise en compte du fluorophore est de 10273 Da. Cet aptamère possède une structure secondaire en G-quadruplexes (Figure 69), structures à quatre brins reposant sur des appariements de base en plateau de 4 guanines (G), déterminée par dichroïsme circulaire (Yoshida *et al.* 2009). En revanche, la zone de liaison spécifique à l'insuline reste non identifiée.

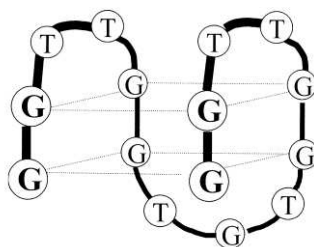


Figure 69. Structure quadruplexe constituée de 2 tétrades de G. (Rehder-Silinski & McGown 2003)

Les acides nucléiques sont des enchaînements de nucléosides 5' phosphate (ou nucléotides) dont l'assemblage est réalisé par des ponts phosphodiester possédant une seule fonction acide au $pK_a \sim 1,7$. Chacun de ces groupes possède donc à pH alcalin un seul groupement ionisé : l'acide nucléique porte alors un nombre de charges négatives équivalent au nombre de nucléotides.

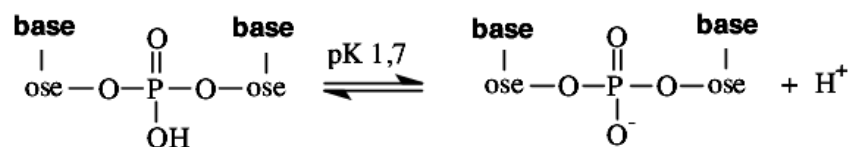


Figure 70. Liaison phosphodiester entre deux nucléotides d'un acide nucléique.

III.2.2. Choix des tampons de séparation et d'incubation

Aucune publication ne faisant état de l'utilisation de l'aptamère anti-insuline à des fins de détection par EC, nous nous sommes donc inspirés de différents travaux expérimentaux décrits dans la littérature pour d'autres couples aptamères-ligands pour définir nos conditions d'analyse.

Les différents résultats décrits ci-après s'attachent donc à décrire dans un premier temps l'effet du tampon de séparation et du tampon d'incubation (pH, composition en sels) sur les profils électrophorétiques de l'aptamère anti-insuline. Ensuite les conditions de séparation optimales ont été utilisées pour réaliser les premières analyses du mélange aptamère-insuline, pour lequel différentes conditions d'incubation ont été testées. Enfin, une étude préliminaire d'affinité a été conduite pour évaluer la formation d'une complexation entre l'aptamère et son ligand insuline.

Dans un premier temps nous avons caractérisé le comportement électrophorétique de l'aptamère seul sous différentes conditions de séparation, en faisant varier le type et le pH du tampon de séparation (Tableau 8). Certains de ces systèmes tampons ont également été utilisés pour solubiliser l'aptamère. Différents électrolytes ont ainsi été testés, à des pH neutre ou basique (pH 7 à 9) de sorte que lors de l'analyse ultérieure des solutions d'incubation de l'insuline et de l'aptamère, ces molécules soient toutes deux chargées négativement pour limiter leur adsorption sur la paroi du capillaire. Le tampon TKN correspond au tampon ayant servi à la sélection de l'aptamère anti-insuline (Yoshida *et al.* 2009), les tampons TGK et TG2X ont été utilisés pour des études de séparation aptamère-protéines (érythropoïétine- α , thrombine, IgE) (Shen *et al.* 2010; Buchanan *et al.* 2003), et le tampon borate correspond au tampon optimisé pour l'analyse de l'insuline que nous avons décrit dans la première partie de ce chapitre. Seuls les tampons

contenant des ions potassium (stabilisant les structures G-quadruplexes) ont été testés comme tampons échantillon (TKN et TKG).

Phosphate pH 7	HEPES pH 7,5	TKN* pH 8	TGK* pH 8,4	TG2X* pH 8,5	Borate pH 9
Acide phosphorique 25 mM	HEPES 55 mM	Tris HCl 50 mM	Tris 25 mM	Tris 50 mM	Acide borique 120 mM
NaOH 38 mM	NaOH 50 mM	KCl 10 mM	Glycine 192 mM	Glycine 384 mM	NaOH 50 mM
		NaCl 100 mM	K ₂ HPO ₄ 5 mM	NaCl 1 mM	

Tableau 8. Composition des électrolytes testés pour la caractérisation électrophorétique de l'aptamère.
Tous ces électrolytes ont été utilisés comme tampon de séparation et ceux indiqués par des astérisques (*) ont été utilisés comme tampon échantillon.

L'aptamère reçu lyophilisé a été repris dans de l'eau exempte de nucléases (50 μ M) puis aliquoté et conservé à -20°C à l'abri de la lumière. Toutes les séparations ont été effectuées en capillaire de silice vierge de longueur effective (l_e) de 30 cm. L'aptamère a été dilué à 1 μ M dans le tampon TKN ou TKG puis a été soumis à une activation thermique par chauffage au bain-marie pendant 5 min à 95°C, suivi d'un refroidissement de 30 min à température ambiante.

L'influence du tampon échantillon sur la qualité de la séparation (forme et intensité des pics) a été réalisée en utilisant comme électrolyte les tampons borate, TKN, TKG et TGX2. Lors de cette étude, les meilleurs profils ont été obtenus avec une séparation en tampon borate pH 9 (Figure 71a). Le profil de l'aptamère, qu'il soit dilué dans le TKN ou le TKG comporte deux pics majoritaires fins ($\sim$ 4,5 min et $\sim$ 6,5 min), et un troisième beaucoup plus large avec une mobilité électrophorétique intermédiaire. On observe cependant une nette différence d'intensité de fluorescence dans le cas où l'aptamère est dilué dans le TKN. Cette différence pourrait s'expliquer par la présence de NaCl à forte concentration dans ce tampon. Les ions Na⁺ agissant en contre-ions neutralisent les groupements phosphates présents tout le long de la séquence nucléotidique de l'aptamère (cf. Figure 70), écrantant dans le même temps le fluorophore présent à l'extrémité 3', ce qui conduit à un effet d'extinction de fluorescence (ou quenching). L'intensité de fluorescence obtenue avec le TKN restant très satisfaisante, ce tampon échantillon a été préféré car il correspond au tampon dans lequel l'aptamère a été sélectionné par Yoshida *et al.* (2009) et dont la séquence nucléotidique a été tirée. Le tampon TKN sera donc utilisé comme tampon d'incubation pour les essais à venir de complexation de l'aptamère avec l'insuline.

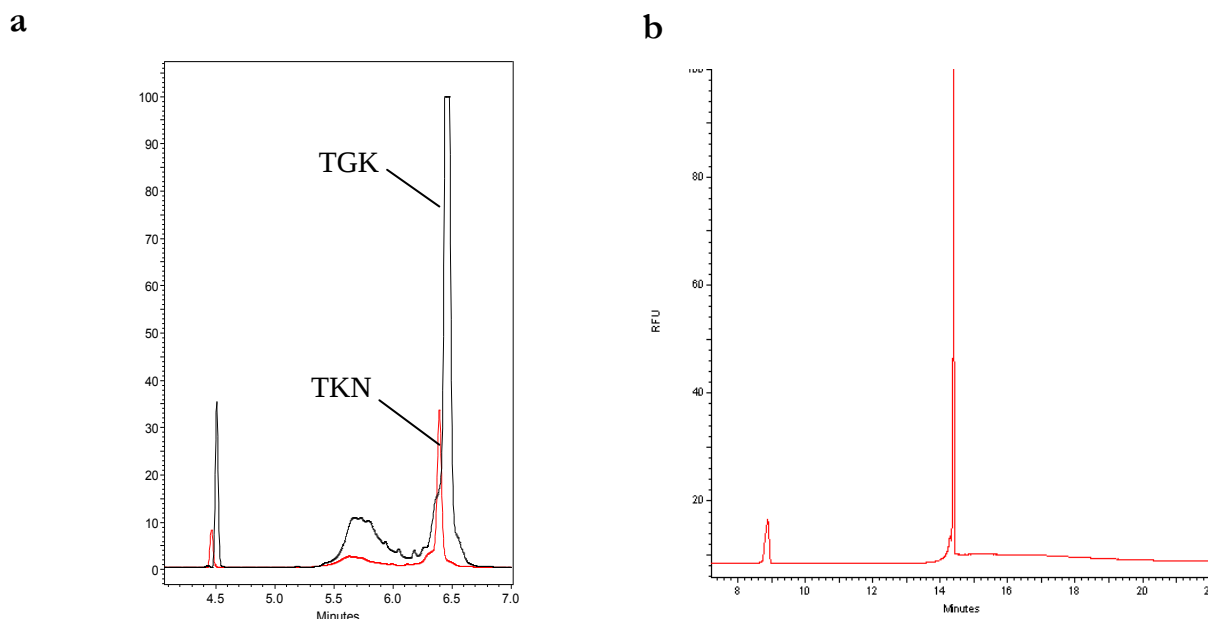


Figure 71. Electrophérogammes de l'aptamère anti-insuline analysé (a) en tampon borate pH 9, FI 50 mM ou (b) en tampon phosphate pH 7, FI 50 mM. Aptamère à 1 μ M dilué dans le tampon TKN (rouge) ou dans le tampon TGK (noir). Capillaire en silice vierge, le=30 cm, di=50 μ m. Injection : 0,5 psi, 5 sec. Séparation : V=+20 kV ; T= 15°C.

Le pH du tampon de séparation a ensuite été optimisé, en évaluant les différents tampons présentés dans le Tableau 8 (gamme de pH allant de 7 à 9, force ionique 50 mM). L'aptamère a été injecté dilué à 1 μ M dans le tampon TKN. Un tampon phosphate pH 7 a permis d'obtenir un profil électrophorétique de l'aptamère plus satisfaisant encore qu'avec le tampon borate pH 9 (Figure 71b). On observe en effet une intensité de fluorescence plus élevée et une disparition du pic intermédiaire, ce qui devrait faciliter la quantification puisque celle-ci sera basée sur les évolutions de l'aire des pics.

Dans ces conditions (électrolyte phosphate pH 7, tampon échantillon TKN), une LOD de l'aptamère seul de 30 nM a été obtenue.

III.2.3. Evaluation des conditions d'incubation du mélange aptamère/insuline

Plusieurs conditions d'incubation d'un mélange aptamère/insuline au ratio molaire 2/1 ont été évaluées. Pour chaque condition, l'aptamère a dans un premier temps été activé dans le tampon TKN (chauffage à 90°C pendant 5 min, puis refroidissement à température ambiante pendant 30 min). Un volume de solution d'insuline diluée dans le TKN a ensuite été ajouté à la solution d'aptamère pour atteindre les concentrations respectives d'aptamère et d'insuline de 1 μ M et 0,5 μ M. Le mélange a été incubé à 37°C pendant 15 min ou pendant 1h à température ambiante. Les échantillons ont été analysés en tampon phosphate pH 7, 50 mM. Des échantillons

d'aptamère seul à la même concentration et ayant subi les mêmes conditions (activation + incubation) ont également été analysés. Pour chaque condition testée, les profils électrophorétiques des mélanges aptamère/insuline sont semblables au profil de l'aptamère seul correspondant. Aucun pic supplémentaire n'est observé.

Au vu de ces résultats, il nous a semblé souhaitable de confirmer si la complexation entre l'aptamère et l'insuline était effective. Nous avons alors initié une étude d'affinité en employant une méthode électrocinétique, l'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE pour *Affinity Capillary Electrophoresis*).

III.2.4. Etude de l'affinité de l'aptamère anti-insuline avec l'insuline

L'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) consiste à effectuer la migration électrophorétique d'un des partenaires de l'interaction (substrat) dans un électrolyte contenant une concentration variable de l'autre partenaire (ligand). L'évolution de la mobilité électrophorétique du substrat en fonction de la concentration en ligand conduit à une isotherme d'association, qui permet la détermination de la constante d'affinité *via* des méthodes de linéarisation mathématique.

Dans le cas d'un équilibre dynamique de stoechiométrie 1:1 caractérisé par une constante d'association K_A entre le substrat (S) et le ligand (L) avec formation d'un complexe (SL) selon : $S + L \leftrightarrow SL$, la mobilité mesurée est donnée par l'équation (11).

$$\mu_i = \frac{\mu_s + \mu_{SL}K_A[L]}{1 + K_A[L]} \quad \text{Equation (11)}$$

où μ_i est la mobilité électrophorétique mesurée, μ_s la mobilité du substrat libre (S), μ_{SL} la mobilité électrophorétique du complexe (SL), $[L]$ la concentration molaire en ligand et K_A la constante d'association. Dans nos conditions, le ligand s'apparente à l'insuline et le substrat à l'aptamère.

Différents tampons phosphate pH 7 (force ionique 50 mM) contenant une concentration croissante d'insuline (0 à 0,6 μ M) ont été préparés la veille, agités fortement manuellement, conservés une nuit à température ambiante puis filtrés sur filtre 0,22 μ m. L'aptamère a été dilué dans le tampon TKN à la concentration de 0,5 μ M puis activé thermiquement. La migration électrophorétique de l'aptamère a été effectuée dans les différents tampons contenant l'insuline. Deux injections successives ont été réalisées pour chaque électrolyte support. La mobilité électrophorétique mesurée (μ_i) du pic de l'aptamère a été tracée en fonction de la concentration en insuline présente dans le tampon de séparation. Seul le premier pic observé lors de l'analyse de l'aptamère a ici été évalué, le deuxième pic ayant montré des différences aléatoires de mobilité

électrophorétique parfois importantes d'une analyse à l'autre. L'isotherme d'association obtenue et présenté Figure 72 montre une augmentation de la μ_i lorsque la concentration en insuline dans le tampon de séparation augmente. La constante de dissociation (K_d) mesurée à partir de ces expériences est d'environ $30 \text{ nM} \pm 13 \text{ nM}$. Il faut rappeler qu'ici nous donnons une valeur de K_d approximative, celle-ci n'ayant pas été corrigée de la viscosité du tampon de séparation. En effet, la présence d'insuline dans le tampon peut conduire à une variation de sa viscosité, conduisant elle-même à une modification possible de la mobilité mesurée. Aucune constante de dissociation n'a été décrite pour le couple aptamère-insuline, néanmoins cette valeur se situe dans un intervalle tout à fait cohérent, au vu des différentes valeurs en général observées pour les associations aptamère-protéine (de l'ordre du nM).

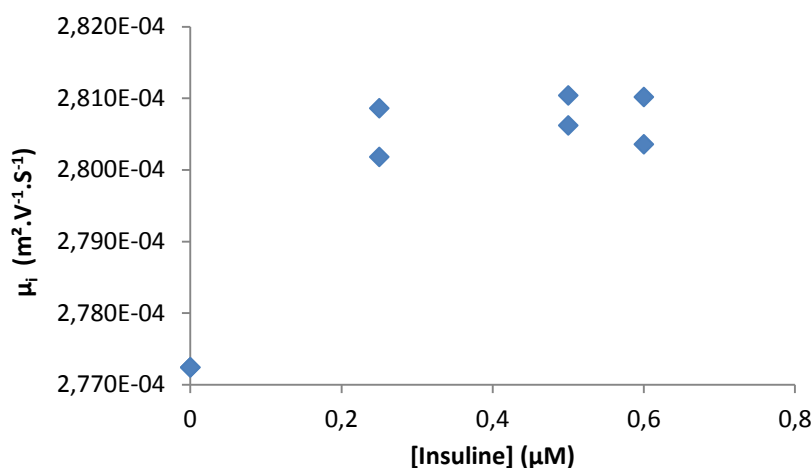


Figure 72. Evolution de la mobilité électrophorétique de l'aptamère en fonction de la concentration en insuline introduite dans le tampon de séparation selon l'équation.

Grâce à ces résultats obtenus en ACE, nous avons montré qu'il existe bien une association de l'aptamère avec l'insuline dans nos conditions d'analyse. Un complexe se formerait donc mais nous n'avons pas encore trouvé les conditions de séparation idéales pour le mettre en évidence. Ces résultats sont prometteurs et nous permettent de penser qu'une séparation du pic du complexe de l'aptamère non complexé est possible. Les conditions de séparation restent encore à optimiser.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons employé différentes méthodes en vue de quantifier de très faibles quantités d'insuline. La première approche, qui a consisté à évaluer l'insuline directement après marquage avec un fluorophore et une détection LIF s'avère être aujourd'hui la seule méthode applicable pour quantifier le passage de l'insuline à travers nos barrières cellulaires pulmonaires miniaturisées. La sensibilité de détection atteinte au terme de l'optimisation de cette méthode reste cependant encore élevée et nous empêcherait de détecter des concentrations inférieures à 0,5 μM d'insuline. La technique d'APCE envisagée avec l'aptamère anti-insuline mériterait d'être poursuivie. En effet, ce type de méthode appliquée à une détection LIF permet en principe de travailler à des concentrations plus faibles. De plus, l'étude préliminaire d'ACE réalisée montre qu'il y a bien interaction entre l'aptamère et l'insuline et ouvre la voie à de nouvelles optimisations pour trouver les conditions qui permettront d'observer l'apparition d'un pic correspondant à celui du complexe.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse a eu pour but de concevoir un microsystème dédié à l'évaluation du passage de biomolécules, formulées ou non, à travers un modèle de barrière épithéliale pulmonaire (cellules Calu-3). Ce système miniaturisé a pour objectif de faciliter le criblage en série de différentes biomolécules actives et de sélectionner les formulations les plus adaptées à leur pénétration à travers cette barrière, en vue de sélectionner les meilleurs candidats à une administration par voie pulmonaire.

Pour répondre à cet objectif, la conception de ce système miniaturisé a été réfléchi et mise au point pour répondre aux deux défis principaux suivants : (i) rendre possible la parallélisation et le criblage en série, en développant une méthode de fabrication non complexe permettant d'intégrer de multiples chambres de culture sur un même dispositif ; (ii) simplifier la mise en œuvre, l'utilisation et la maintenance du dispositif en s'affranchissant de tout appareillage associé.

Dans un premier temps, nous avons consacré une étude préliminaire à la détermination des conditions de culture optimales pour l'obtention de barrières épithéliales pulmonaires représentatives de l'épithélium natif, et exploitables pour réaliser des tests de transports de molécules. Nous avons ainsi cultivé à l'échelle macroscopique en systèmes perméables Transwell® les cellules bronchiques Calu-3 sous différentes conditions de culture et évalué l'impact de différents paramètres critiques sur leur croissance, leur morphologie et leur capacité à se différencier en épithéliums polarisés et jointifs. Ces caractéristiques ont été évaluées à l'aide de différentes méthodes que nous avons par la suite appliquées à la caractérisation des barrières cellulaires formées en micropuits, à savoir la mesure de TEER, la détermination de la perméabilité des épithéliums vis-à-vis du ^{14}C -sucrose et l'immunomarquage cellulaire.

Nous avons ainsi montré que le type et la taille de pores des membranes microporeuses utilisées comme support à la culture jouent un rôle important pour la culture des cellules Calu-3. Si l'utilisation des différents types de membranes utilisées permet d'obtenir des épithéliums bien formés, les membranes en PET avec une taille de pores de $0,4\ \mu\text{m}$ donnent de meilleures performances en permettant d'atteindre une confluence plus rapidement. Grâce à la combinaison des trois techniques de caractérisation, nous avons pu démontrer que la confluence correspond à une stabilisation des valeurs de TEER et à la présence effective de jonctions serrées démonstratives d'un épithélium polarisé et jointif, qui peuvent être observées en 7 jours en moyenne.

Nous avons ensuite consacré une part du travail à optimiser la fabrication de notre microsystème, que nous avons conçu sous forme de deux configurations distinctes, en faisant intervenir différents compartiments indépendants les uns des autres. Différentes méthodes de fabrication ou différentes conceptions ont été envisagées, puis optimisées, pour chacun des compartiments du microsystème, pour répondre aux objectifs que nous nous étions fixés.

Dans sa version définitive, la première configuration du microsystème (*configuration culture*) est utilisée pour la culture des barrières pulmonaires Calu-3 miniaturisées. Elle se compose d'une plateforme de culture en verre pouvant accueillir à l'heure actuelle jusqu'à 12 micropuits et qui repose sur un support circulaire en PMMA. L'étape critique de fabrication s'est révélée être l'étape d'insertion des membranes microporeuses, utilisées comme support à la culture des cellules Calu-3. Une méthode par collage thermique à l'aide de paraffine sur une lame de verre percée nous a permis d'obtenir une taille et une surface de micropuits reproductibles de 1 mm². Cette méthode de fabrication est aujourd'hui standardisée et permet, par sa simplicité de mise en œuvre, de fabriquer un grand nombre de plateformes en un temps réduit à partir des mêmes lames de verre réutilisables (<1h par plateforme), et permet ainsi d'envisager de nombreuses mises en culture en parallèle. La *configuration culture* du microsystème permet de considérablement minimiser la maintenance associée à la culture de barrières cellulaires, grâce à l'utilisation du support en PMMA qui crée un réservoir de milieu basolatéral commun à l'ensemble des micropuits d'une même plateforme de culture. Le volume très important de ce milieu de culture comparé aux surfaces des micropuits ne nécessite aucun renouvellement de milieu pendant toute la durée de la culture, et permet de s'affranchir de tout système ou appareillage microfluidique pendant la phase de croissance des cellules. La simplification des tâches relatives aux changements de milieu présente l'avantage de garantir la stérilité du système et limiter le risque de contamination. Dans cette configuration, nous avons démontré que la compatibilité des matériaux utilisés, la méthode de fabrication et la forme des micropuits permettent d'offrir un environnement favorable à l'obtention de barrières Calu-3 confluentes, avec expression de jonctions effectives sur toute la surface des micropuits restreignant le passage paracellulaire, en seulement 7 jours de culture.

La deuxième configuration du microsystème (*configuration perméabilité*) composée de la plateforme de culture transférée sur un support recueil en PMMA contenant des chambres de recueil individuelles, a été ensuite exploitée pour réaliser les essais de perméabilité des barrières Calu-3 formées. Un système a été mis au point pour permettre l'assemblage des deux compartiments entre eux. Un vissage léger et la mise en place de joints en PDMS très fins déposés entre chaque

micropuits de culture et sa chambre de recueil associée permettent de rendre le système totalement étanche et d'assurer l'indépendance de chaque couple micropuits de culture/chambre de recueil. La présence de canaux de fuite gravés dans le support recueil pour évacuer l'air, permettent de réaliser sans difficulté des remplissages/retraits répétés des chambres de recueil. Cette configuration requiert encore néanmoins quelques améliorations dans la conception du support recueil. Nous avons en effet mis en évidence que la manière de récupérer les échantillons contenant les molécules à doser, au moyen d'une simple aspiration avec une pipette munie d'un cône, pouvait forcer le passage des molécules à travers le modèle d'épithélium. Un coefficient de perméabilité augmenté d'un facteur 5 a en effet été observé pour le ^{14}C -sucrose par rapport aux systèmes perméables Transwell®. Il serait donc intéressant d'améliorer le design de ce support recueil, en redessinant par exemple les canaux d'alimentation pour espérer s'affranchir de ce phénomène.

Le volet suivant de nos travaux a consisté à évaluer la capacité du microsystème à déterminer l'aptitude de différents analytes à traverser la barrière pulmonaire. Une première étude avec des nanoparticules développées pour l'imagerie médicale et marquées à la cyanine 5.5 (NP DOTA-Gd-Cy5.5) n'a pas permis de mettre en évidence un passage de ces NP à travers l'épithélium, pourtant démontré chez la souris. Cette absence de passage a été attribuée à un phénomène d'adsorption important des NP dû à la présence du fluorophore hydrophobe sur différents compartiments du microsystème, en particulier sur la membrane microporeuse et sur le PDMS utilisé pour créer les compartiments apicaux, combiné à une méthode de quantification peu adaptée. La proportion très faible de NP réellement marquées avec le fluorophore aurait nécessité une méthode de quantification extrêmement sensible que nous n'avons pas à disposition. Ces résultats suggèrent là encore la nécessité d'une optimisation du microsystème, qui pourrait être apportée en effectuant un traitement des différentes surfaces en contact avec les solutions contenant les molécules à doser. Par exemple, une activation par plasma d'azote ou un recouvrement à l'aide de solutions de collagène ou fibronectine de la partie supérieure et de l'intérieur des réservoirs apicaux en PDMS pourraient permettre de minimiser l'adsorption d'analytes hydrophobes et éviter les pertes importantes que nous avons observées.

Un passage d'environ 0,01% d'insuline a en revanche été mesuré à travers nos barrières Calu-3 miniaturisées et nous a permis de confirmer que la miniaturisation des puits de culture et la *configuration recueil* du microsystème permettent d'effectuer des études de transport de biomolécules. La quantité d'insuline ayant traversé notre modèle de barrière a pu être corrélée à différentes études réalisées sur le modèle Calu-3 cultivé en systèmes Transwell®. L'effet du

poloxamère 188 (PF68) sur la pénétration de l'insuline à travers l'épithélium pulmonaire a également été évalué lors de cette étude, et un effet positif sur la vitesse de passage de l'insuline a pu être observé. Ce résultat préliminaire est encourageant et mériterait d'être poursuivi. Le PF68 en solution a montré son innocuité vis-à-vis des cellules Calu-3 mais n'a jamais été décrit comme promoteur d'absorption de biomolécules à travers l'épithélium pulmonaire. Le PF68 est un copolymère aux propriétés tensioactives capable de former des micelles en solution aqueuse. Il serait intéressant d'optimiser les proportions de PF68 et d'insuline à associer, ce qui n'a pas été effectué ici, pour favoriser la création de structures micellaires et observer l'effet du passage de l'insuline grâce à ce type de formulation. D'autres poloxamères différant par leur taille et la nature des chaînes polymériques les constituants pourraient également être testés.

Enfin, en étudiant le passage de deux types de NP biodégradables de PLGA de taille équivalente mais différant par leurs charges de surface en systèmes Transwell®, nous avons confirmé un passage d'environ 6 % dans le cas de NP positives revêtues de chitosane (NP PLGA/CS). Ces résultats ont permis de montrer le rôle joué par les charges de surface sur la capacité de ces NP à traverser l'épithélium pulmonaire. Ces NP PLGA/CS se présentent donc comme des candidats prometteurs pour l'administration facilitée de protéines ou peptides thérapeutiques au niveau pulmonaire.

Ces différentes expériences préliminaires ont également mis en exergue la nécessité de développer à l'avenir une méthode de quantification adaptée aux faibles volumes manipulés dans notre microsystème. Nous avons en effet utilisé les techniques de spectrofluorimétrie et ELISA. Ces techniques, bien que très simple à mettre en œuvre pour la première, et offrant une grande sensibilité de détection pour la deuxième, nécessitent la manipulation de volumes importants ($\geq 100 \mu\text{L}$) comparés aux volumes des échantillons manipulés dans notre microsystème ($30 \mu\text{L}$ pour les échantillons basolatéraux). Une dilution est alors nécessaire ce qui conduit à une perte de sensibilité et à l'impossibilité de réaliser des mesures répétées pour un même échantillon.

Dans un dernier temps, nous avons alors évalué les performances de l'électrophorèse capillaire (EC) couplée à une détection par fluorescence induite par laser (EC-LIF) comme méthode analytique alternative pour la quantification de l'insuline et testé différentes méthodologies. L'EC permet en effet de répondre à la contrainte principale imposée par notre microsystème, celle de travailler avec des échantillons de faible volume et de surcroît peu concentrés en analyte d'intérêt. Un volume d'échantillon de l'ordre de la dizaine de μL seulement est en effet suffisant pour réaliser des analyses par cette technique, qui est de plus automatisée et permet d'obtenir une grande efficacité et une rapidité d'analyse. Parmi les différentes méthodologies testées, la méthode

de marquage de l'insuline en mode pré-capillaire avec le FITC est aujourd'hui la seule applicable pour réaliser la quantification de l'insuline ayant franchie nos barrières cellulaires pulmonaires miniaturisées. Une limite de détection (LOD) de 0,5 μM a été obtenue. Une LOD nettement inférieure de 43,5 nM a été atteinte en quantifiant l'insuline ayant traversée nos barrières pulmonaires par test ELISA. Cependant, l'optimisation des conditions d'analyse en EC-LIF, qui n'a pas été effectuée ici, pourrait permettre de diminuer la LOD. Par exemple, nous pourrions augmenter le temps d'injection de l'échantillon. Des injections de 5 s ont été appliquées, ce qui est relativement court et pourrait être augmenté à 15 ou 20 s. Il serait également intéressant de mettre en œuvre une méthode de « stacking », qui consiste à utiliser un tampon échantillon et un tampon d'analyse de conductivités différentes, pour provoquer un effet de compression de l'échantillon injecté dans une zone restreinte au sein du capillaire, et conduire ainsi à la concentration de la bande échantillon. Nous pourrions également recourir à un fluorophore possédant un quantum de fluorescence plus élevé que le FITC.

La deuxième méthodologie envisagée pour la quantification de l'insuline a consisté à mettre en œuvre un immunoessai en EC (APCE), soit avoir recours à la formation d'un immunocomplexe pour la quantification de l'insuline, avec un anticorps et un aptamère anti-insuline. Si les résultats obtenus avec l'anticorps sont difficilement optimisables, ceux obtenus avec l'aptamère sont plus prometteurs et mériteraient d'être poursuivis. Nous avons en effet déterminé une LOD de l'ordre de 30 nM pour l'aptamère seul permettant d'espérer atteindre par complexation un seuil de quantification du même ordre de grandeur pour l'insuline. De plus, l'étude préliminaire d'affinité (ACE) destinée à montrer que l'aptamère a été bien choisi, montre qu'il y a bien interaction entre l'aptamère et l'insuline. De nouvelles optimisations restent maintenant à apporter pour trouver les conditions qui permettront d'observer l'apparition d'un pic correspondant à celui du complexe. Un revêtement neutre du capillaire pourrait par exemple permettre de favoriser la séparation des deux espèces correspondant au complexe et à l'aptamère seul. Cela permettrait de diminuer voire d'annuler le flux électroosmotique et la séparation ne serait fondée que sur les différences de mobilité électrophorétique. Une meilleure résolution pourrait également être obtenue en augmentant la longueur du capillaire.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis de participer à l'émergence des « cells-on-chip », en concevant un microsystème, qui après quelques optimisations supplémentaires, pourrait réellement être utilisable comme outil de criblage du passage de biomolécules candidates à une administration pulmonaire, pour faciliter et accélérer la sélection des meilleurs candidats lors de la phase amont de la découverte de médicaments. Un microsystème abouti à 3 micropuits est

aujourd'hui utilisable pour des applications de transport et une augmentation d'échelle est envisageable à très court terme pour augmenter la capacité de parallélisation, pour laquelle seul le support recueil reste à optimiser.

Ce microsystème a ici été développé pour une application spécifique de test de transport à travers l'épithélium pulmonaire. Dans sa *configuration culture*, il pourrait néanmoins être utilisé très aisément pour tester par exemple la toxicité au niveau pulmonaire des différentes formulations développées au laboratoire pour une application pulmonaire. La fabrication des plateformes de culture en verre, très simple à mettre en œuvre et ne nécessitant aucune technique de microfabrication spécifique particulière, la rend accessible à n'importe quelle personne non initiée et rend cette partie du microsystème facilement démocratisable. Le microsystème pourrait également être utilisé pour reproduire de nombreuses autres barrières épithéliales ou endothéliales.

Références

- Agu, R.U. et al., 2001. The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. *Respiratory Research*, 2(4), p.198-209.
- Ahsan, F. et al., 2003. Effects of the permeability enhancers, tetradecylmaltoside and dimethyl- β -cyclodextrin, on insulin movement across human bronchial epithelial cells (16HBE14o-). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(1), p.27-34.
- Albin, M. et al., 1991. Fluorescence detection in capillary electrophoresis: evaluation of derivatizing reagents and techniques. *Analytical Chemistry*, 63(5), p.417-422.
- Anderson, J.M. & Van Itallie, C.M., 1995. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 269(4), p.G467-G475.
- Anderson, J.M. & Itallie, C.M.V., 2009. Physiology and Function of the Tight Junction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(2), p.a002584.
- Andrade, F. et al., 2011. Nanocarriers for pulmonary administration of peptides and therapeutic proteins. *Nanomedicine*, 6(1), p.123-141.
- Antosova, Z. et al., 2009. Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever? *Trends in Biotechnology*, 27(11), p.628-635.
- Anwar, K., Han, T. & Kim, S.M., 2011. Reversible sealing techniques for microdevice applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 153(2), p.301-311.
- Artursson, P. et al., 1994. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharmaceutical research*, 11(9), p.1358-1361.
- Babu, P.B.R., Chidekel, A. & Shaffer, T.H., 2004. Protein composition of apical surface fluid from the human airway cell line Calu-3: effect of ion transport mediators. *Clinica Chimica Acta*, 347(1-2), p.81-88.
- Baginski, L. et al., 2012. Investigations into the Fate of Inhaled Salmon Calcitonin at the Respiratory Epithelial Barrier. *Pharmaceutical Research*, 29(1), p.332-341.
- Balda, M. & Matter, K., 1998. Commentary - Tight junctions. *Journal of Cell Science*, 111, p.541-547.
- Bao, J.J., 1997. Capillary electrophoretic immunoassays. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 699(1-2), p.463-480.
- Bardelmeijer, H.A. et al., 1998. Derivatization in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 807(1), p.3-26.
- Bardelmeijer, H.A. et al., 1997. Pre-, on- and post-column derivatization in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 18(12-13), p.2214-2227.
- Barrett, A.J. & McDonald, J.K., 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochemical Journal*, 237(3), p.935.

- Baudoin, R. et al., 2007. Development of a renal microchip for in vitro distal tubule models. *Biotechnology Progress*, 23(5), p.1245-1253.
- Bhat, M. et al., 1993. Regulation of tight junction permeability by calcium mediators and cell cytoskeleton in rabbit tracheal epithelium. *Pharmaceutical research*, 10(7), p.991-997.
- Bianchi, A. et al., 2013. Contrast enhanced lung MRI in mice using ultra-short echo time radial imaging and intratracheally administrated Gd-DOTA-based nanoparticles. *Magnetic Resonance in Medicine*, 70(5), p.1419-1426.
- Bianchi, A. et al., Quantitative biodistribution and pharmacokinetics of multimodal gadolinium-based nanoparticles for lungs using ultrashort TE MRI. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, p.1-14.
- Bilati, U., Allémann, E. & Doelker, E., 2005. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 59(3), p.375-388.
- Bilek, A.M., Dee, K.C. & Gaver, D.P., 2003. Mechanisms of surface-tension-induced epithelial cell damage in a model of pulmonary airway reopening. *Journal of Applied Physiology*, 94(2), p.770-783.
- Booth, R. & Kim, H., 2012. Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (μ BBB). *Lab Chip*, 12, p.1784-1792.
- Bosquillon, C., 2010. Drug transporters in the lung—do they play a role in the biopharmaceutics of inhaled drugs? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(5), p.2240-2255.
- Braeckman, R., 2002. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Peptide and Protein Drugs. In *Pharmaceutical Biotechnology: An Introduction for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*. Taylor & Francis Inc, p. 105-131.
- Bravo-Osuna, I. et al., 2007. In vitro evaluation of calcium binding capacity of chitosan and thiolated chitosan poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 338(1-2), p.284-290.
- Bridges, R.J., 2012. Mechanisms of Bicarbonate Secretion: Lessons from the Airways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8).
- Brody, E.N. & Gold, L., 2000. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 74(1), p.5-13.
- Bromer, W.W. et al., 1967. Preparation and Properties of Fluoresceinthiocarbamyl Insulins*. *Biochemistry*, 6(8), p.2378-2388.
- Buchanan, D.D. et al., 2003. Effect of buffer, electric field, and separation time on detection of aptamer-ligand complexes for affinity probe capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 24(9), p.1375-1382.
- Bur, M. et al., 2009. A novel cell compatible impingement system to study in vitro drug absorption from dry powder aerosol formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), p.350-357.

- Byron, P.R. & Patton, J.S., 1994. Drug Delivery via the Respiratory Tract. *Journal of Aerosol Medicine*, 7(1), p.49-75.
- Carafa, M. et al., 2012. Novel Concept in Pulmonary Delivery. In K.-C. Ong, éd. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease - Current Concepts and Practice*. InTech.
- Clark, S.L. & Remcho, V.T., 2002. Aptamers as analytical reagents. *Electrophoresis*, 23(9), p.1335-1340.
- Claude, P., 1978. Morphological factors influencing transepithelial permeability: A model for the resistance of the Zonula Occludens. *The Journal of Membrane Biology*, 39(2-3), p.219-232.
- Cleland, J.L., Daugherty, A. & Mersny, R., 2001. Emerging protein delivery methods. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), p.212-219.
- Cooney, D., Kazantseva, M. & Hickey, A.J., 2004. Development of a size-dependent aerosol deposition model utilising human airway epithelial cells for evaluating aerosol drug delivery. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, 32(6), p.581-590.
- Cozens, A.L. et al., 1994. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 10(1), p.38-47.
- Davoren, M. et al., 2007. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicology in Vitro*, 21(3), p.438-448.
- Ding, H.-M. et al., 2005. Silica nanotubes for lysozyme immobilization. *Journal of Colloid and Interface Science*, 290(1), p.102-106.
- Dishinger, J.F., Reid, K.R. & Kennedy, R.T., 2009. Quantitative monitoring of insulin secretion from single islets of Langerhans in parallel on a microfluidic chip. *Analytical chemistry*, 81(8), p.3119-3127.
- Doherty, E.A.S. et al., 2003. Microchannel wall coatings for protein separations by capillary and chip electrophoresis. *Electrophoresis*, 24(1-2), p.34-54.
- Dolník, V. & Hutterer, K.M., 2001. Capillary electrophoresis of proteins 1999-2001. *Electrophoresis*, 22(19), p.4163-4178.
- Dombu, C.Y. & Betbeder, D., 2013. Airway delivery of peptides and proteins using nanoparticles. *Biomaterials*, 34(2), p.516-525.
- Donovan, M.D., Flynn, G.L. & Amidon, G.L., 1990. Absorption of Polyethylene Glycols 600 Through 2000: The Molecular Weight Dependence of Gastrointestinal and Nasal Absorption. *Pharmaceutical Research*, 7(8), p.863-868.
- Douville, N.J. et al., 2011. Combination of fluid and solid mechanical stresses contribute to cell death and detachment in a microfluidic alveolar model. *Lab on a Chip*, 11(4), p.609-619.
- Duan, X. & Mao, S., 2010. New strategies to improve the intranasal absorption of insulin. *Drug Discovery Today*, 15(11-12), p.416-427.
- Duffy, D.C. et al., 1998. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Analytical chemistry*, 70(23), p.4974-4984.

- Ehrhardt, C. et al., 2003. 16HBE14o- Human Bronchial Epithelial Cell Layers Express P-Glycoprotein, Lung Resistance-Related Protein, and Caveolin-1. *Pharmaceutical Research*, 20(4), p.545-551.
- Ehrhardt, C. et al., 2002. Drug Absorption by the Respiratory Mucosa: Cell Culture Models and Particulate Drug Carriers. *Journal of Aerosol Medicine*, 15(2), p.131-139.
- Ehrhardt, C. et al., 2002. Influence of apical fluid volume on the development of functional intercellular junctions in the human epithelial cell line 16HBE14o-: implications for the use of this cell line as an in vitro model for bronchial drug absorption studies. *Cell and Tissue Research*, 308(3), p.391-400.
- El-Ali, J., Sorger, P.K. & Jensen, K.F., 2006. Cells on chips. *Nature*, 442(7101), p.403-411.
- Elbert, K.J. et al., 1999. Monolayers of human alveolar epithelial cells in primary culture for pulmonary absorption and transport studies. *Pharmaceutical Research*, 16(5), p.601-608.
- El-Shabouri, M.H., 2002. Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. *International Journal of Pharmaceutics*, 249(1-2), p.101-108.
- EMA, 2000. Note for the guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence.
- Evans, C.M. & Koo, J.S., 2009. Airway mucus: The good, the bad, the sticky. *Pharmacology & Therapeutics*, 121(3), p.332-348.
- Fahy, J.V. & Dickey, B.F., 2010. Airway Mucus Function and Dysfunction. *New England Journal of Medicine*, 363(23), p.2233-2247.
- Famulok, M. & Mayer, G., 1999. Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Current topics in microbiology and immunology*, 243, p.123-136.
- FDA, 2000. Guidance for industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system.
- Felder, M. et al., 2012. Microfluidic wound-healing assay to assess the regenerative effect of HGF on wounded alveolar epithelium. *Lab on a Chip*, 12(3), p.640-646.
- Fiegel, J. et al., 2003. Large porous particle impingement on lung epithelial cell monolayers--toward improved particle characterization in the lung. *Pharmaceutical Research*, 20(5), p.788-796.
- Florea, B.I. et al., 2003. Drug transport and metabolism characteristics of the human airway epithelial cell line Calu-3. *Journal of Controlled Release*, 87(1-3), p.131-138.
- Florea, B.I. et al., 2002. Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *AAPS pharmSci*, 4(3), p.E12.
- Fogh, J., Fogh, J.M. & Orfeo, T., 1977. One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 59(1), p.221-226.
- Folkesson, H.G. et al., 1996. Alveolar epithelial clearance of protein. *Journal of applied physiology*, 80(5), p.1431-1445.

- Forbes, B. et al., 2002. An in vitro technique for evaluating inhaled nasal delivery systems. *STP pharma sciences*, 12(1), p.75-79.
- Forbes, B. et al., 2000. Formulation of Inhaled Medicines: Effect of Delivery Vehicle on Immortalized Epithelial Cells. *Journal of Aerosol Medicine*, 13(3), p.281-288.
- Forbes, B., 2000. Human airway epithelial cell lines for in vitro drug transport and metabolism studies. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 3(1), p.18-27.
- Forbes, B. & Ehrhardt, C., 2005. Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 60(2), p.193-205.
- Foster, K.A. et al., 1998. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental cell research*, 243(2), p.359-366.
- Foster, K.A. et al., 2000. Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 208(1-2), p.1-11.
- Furuse, M., 2010. Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(1), p.a002907.
- Gao, D. et al., 2013. Characterization of drug permeability in Caco-2 monolayers by mass spectrometry on a membrane-based microfluidic device. *Lab on a chip*, 13(5), p.978-985.
- García-Campaña, A.M., Taverna, M. & Fabre, H., 2007. LIF detection of peptides and proteins in CE. *Electrophoresis*, 28(1-2), p.208-232.
- Gehr, P., Bachofen, M. & Weibel, E.R., 1978. The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity. *Respiration physiology*, 32(2), p.121-140.
- Gel, M. et al., Fabrication of free standing microporous COC membranes optimized for in vitro barrier tissue models. *Sensors and Actuators A: Physical*.
- German, I., Buchanan, D.D. & Kennedy, R.T., 1998. Aptamers as Ligands in Affinity Probe Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 70(21), p.4540-4545.
- Geys, J., Nemery, B. & Hoet, P.H.M., 2007. Optimisation of culture conditions to develop an in vitro pulmonary permeability model. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 21(7), p.1215-1219.
- Ghadiali, S.N. & Gaver, D.P., 2008. Biomechanics of liquid–epithelium interactions in pulmonary airways. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 163(1–3), p.232-243.
- Ghaemmaghami, A.M. et al., 2012. Biomimetic tissues on a chip for drug discovery. *Drug Discovery Today*, 17(3–4), p.173-181.
- Giard, D.J. et al., 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), p.1417-1423.
- Godfrey, R.W., 1997. Human airway epithelial tight junctions. *Microscopy Research and Technique*, 38(5), p.488-499.

- Goldberg, M. & Gomez-Orellana, I., 2003. Challenges for the oral delivery of macromolecules. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(4), p.289-295.
- Grabowski, N. et al., 2013. Toxicity of surface-modified PLGA nanoparticles toward lung alveolar epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 454(2), p.686-694.
- Grainger, C.I. et al., 2006. Culture of Calu-3 Cells at the Air Interface Provides a Representative Model of the Airway Epithelial Barrier. *Pharmaceutical Research*, 23(7), p.1482-1490.
- Grainger, C.I. et al., 2009. The permeability of large molecular weight solutes following particle delivery to air-interfaced cells that model the respiratory mucosa. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 71(2), p.318-324.
- Grenha, A. et al., 2007. Chitosan nanoparticles are compatible with respiratory epithelial cells in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31(2), p.73-84.
- Griep, L.M. et al., 2013. BBB ON CHIP: microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate blood-brain barrier function. *Biomedical Microdevices*, 15(1), p.145-150.
- Groneberg, D.A. et al., 2003. Fundamentals of pulmonary drug delivery. *Respiratory Medicine*, 97(4), p.382-387.
- Gruenert, D.C., Finkbeiner, W.E. & Widdicombe, J.H., 1995. Culture and transformation of human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 268(3), p.L347-L360.
- Gstraunthaler, G. & Hartung, T., 2003. Good cell culture practice: good laboratory in the cell culture laboratory for the standardization and quality assurance of in vitro studies. In *Cell Culture Models of Biological Barriers: In vitro Test Systems for Drug Absorption and Delivery*. Claus-Michael Lehr, p. 112-120.
- Gumbleton, M. et al., 2011. Spatial expression and functionality of drug transporters in the intact lung: Objectives for further research. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(1-2), p.110-118.
- Gupta, S. et al., 2013. Oral delivery of therapeutic proteins and peptides: a review on recent developments. *Drug Delivery*, 20(6), p.237-246.
- Haghi, M. et al., 2010. Time- and passage-dependent characteristics of a Calu-3 respiratory epithelial cell model. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36(10), p.1207-1214.
- Hamilton, K.O., Topp, E., et al., 2001. Multidrug resistance-associated protein-1 functional activity in Calu-3 cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(3), p.1199-1205.
- Hamilton, K.O., Yazdanian, M.A. & Audus, K.L., 2001. Modulation of P-glycoprotein activity in Calu-3 cells using steroids and beta-ligands. *International Journal of Pharmaceutics*, 228(1-2), p.171-179.
- Heegaard, N.H.H. & Kennedy, R.T., 2002. Antigen-antibody interactions in capillary electrophoresis. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 768(1), p.93-103.

- Hentz, N.G. et al., 1997. Synthesis and Characterization of Insulin–Fluorescein Derivatives for Bioanalytical Applications. *Analytical Chemistry*, 69(24), p.4994-5000.
- Hermanns, M.I. et al., 2004. Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier in vitro. *Laboratory Investigation*, 84(6), p.736-752.
- Hierlemann, A. et al., 2011. Growing Cells Atop Microelectronic Chips: Interfacing Electrogenic Cells In Vitro With CMOS-Based Microelectrode Arrays. *Proceedings of the IEEE*, 99(2), p.252-284.
- Hillery, A.M., 2001. Drug Delivery: The Basic Concepts. In *Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*. London: A.M. Hillery, A.W. Lloyd, J. Swarbrick, p. 1-48.
- Huang, C.-C. et al., 2004. Protein–Protein Interaction Studies Based on Molecular Aptamers by Affinity Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 76(23), p.6973-6981.
- Huh, D. et al., 2007. Acoustically detectable cellular-level lung injury induced by fluid mechanical stresses in microfluidic airway systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(48), p.18886-18891.
- Huh, D. et al., 2010. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5986), p.1662-1668.
- Huh, D., Hamilton, G.A. & Ingber, D.E., 2011. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in Cell Biology*, 21(12), p.745-754.
- Hung, P.J., Lee, P.J., Sabounchi, P., Aghdam, N., et al., 2005. 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 on a Chip*, 5(1), p.44.
- Hung, P.J., Lee, P.J., Sabounchi, P., Lin, R., et al., 2005. Continuous perfusion microfluidic cell culture array for high-throughput cell-based assays. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(1), p.1-8.
- Hussain, S. et al., 2010. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Particle and fibre toxicology*, 7, p.10.
- Illum, L., 1998. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical research*, 15(9), p.1326-1331.
- Imura, Y. et al., 2009. A microfluidic system to evaluate intestinal absorption. *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 25(12), p.1403-1407.
- Itallie, C.M.V. & Anderson, J.M., 2004. The Molecular Physiology of Tight Junction Pores. *Physiology*, 19(6), p.331-338.
- Jayasena, S.D., 1999. Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. *Clinical Chemistry*, 45(9), p.1628-1650.
- Kim, H. et al., 2011. Albumin-coated porous hollow poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles bound with palmityl-acylated exendin-4 as a long-acting inhalation delivery system for the treatment of diabetes. *Pharmaceutical Research*, 28(8), p.2008-2019.

- Kimura, H. et al., 2008. An integrated microfluidic system for long-term perfusion culture and on-line monitoring of intestinal tissue models. *Lab on a Chip*, 8(5), p.741.
- Kitchell, J.P. & Wise, D.L., 1985. [32] Poly(lactic/glycolic acid) biodegradable drug—polymer matrix systems. In *Methods in Enzymology*. Elsevier, p. 436-448.
- Kobayashi, S., Kondo, S. & Juni, K., 1995. Permeability of peptides and proteins in human cultured alveolar A549 cell monolayer. *Pharmaceutical research*, 12(8), p.1115-1119.
- Kumar Mahto, S., Tenenbaum-Katan, J. & Sznitman, J., 2012. Respiratory Physiology on a Chip. *Scientifica*, 2012.
- Kumari, A., Yadav, S.K. & Yadav, S.C., 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), p.1-18.
- Kushwaha, S.K., Keshari, R.K. & Rai, A., 2011. Advances in nasal trans-mucosal drug delivery. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(7), p.21-28.
- Labiris, N.R. & Dolovich, M.B., 2003. Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 56(6), p.588-599.
- Lacroix, M. et al., 2005. Laser-induced fluorescence detection schemes for the analysis of proteins and peptides using capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 26(13), p.2608-2621.
- Lee, N.Y., 2013. Recent Progress in Lab-on-a-Chip Technology and Its Potential Application to Clinical Diagnoses. *International Neurology Journal*, 17(1), p.2.
- Lewis, A.L., Jordan, F. & Illum, L., 2013. CriticalSorb™: enabling systemic delivery of macromolecules via the nasal route. *Drug Delivery and Translational Research*, 3(1), p.26-32.
- Li, L. et al., 2006. Carbopol-mediated paracellular transport enhancement in Calu-3 cell layers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(2), p.326-335.
- Li, Y.M. et al., 2001. Analysis of extracellular gamma-aminobutyric acid, glutamate and aspartate in cat visual cortex by in vivo microdialysis and capillary electrophoresis-laser induced fluorescence detection. *Journal of neuroscience methods*, 105(2), p.211-215.
- Lieber, M. et al., 1976. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International Journal of Cancer*, 17(1), p.62-70.
- Lloyd, D.K. & Wätzig, H., 1995. Sodium dodecyl sulfate solution is an effective between-run rinse for capillary electrophoresis of samples in biological matrices. *Journal of chromatography. B, Biomedical applications*, 663(2), p.400-405.
- Lo, C.M., Keese, C.R. & Giaever, I., 1999. Cell-substrate contact: another factor may influence transepithelial electrical resistance of cell layers cultured on permeable filters. *Experimental cell research*, 250(2), p.576-580.
- Lucy, C.A., MacDonald, A.M. & Gulcev, M.D., 2008. Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1184(1-2), p.81-105.
- Lux, F. et al., 2011. Ultrasmall Rigid Particles as Multimodal Probes for Medical Applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(51), p.12299-12303.

- Maack, T. et al., 1979. Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular-weight proteins: A review. *Kidney International*, 16(3), p.251-270.
- Madlova, M. et al., 2009. Poly(vinyl alcohol) nanoparticle stability in biological media and uptake in respiratory epithelial cell layers in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), p.438-443.
- Maeda, H. et al., 1969. Reaction of fluorescein-isothiocyanate with proteins and amino acids. I. Covalent and non-covalent binding of fluorescein-isothiocyanate and fluorescein to proteins. *Journal of biochemistry*, 65(5), p.777-783.
- Mairal, T. et al., 2008. Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(4), p.989-1007.
- Manford, F. et al., 2005. Drug permeability in 16HBE14o- airway cell layers correlates with absorption from the isolated perfused rat lung. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(5), p.414-420.
- Mathias, N.R. et al., 2002. Permeability characteristics of calu-3 human bronchial epithelial cells: in vitro-in vivo correlation to predict lung absorption in rats. *Journal of Drug Targeting*, 10(1), p.31-40.
- Mathias, N.R. & Hussain, M.A., 2010. Non-invasive systemic drug delivery: Developability considerations for alternate routes of administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(1), p.1-20.
- Mayer, J.P., Zhang, F. & DiMarchi, R.D., 2007. Insulin structure and function. *Peptide Science*, 88(5), p.687-713.
- McCormick, R.M., 1988. Capillary zone electrophoretic separation of peptides and proteins using low pH buffers in modified silica capillaries. *Analytical Chemistry*, 60(21), p.2322-2328.
- McDonald, J.C. & Whitesides, G.M., 2002. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Accounts of Chemical Research*, 35(7), p.491-499.
- Mehling, M. & Tay, S., 2014. Microfluidic cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 25, p.95-102.
- Melin, J. & Quake, S.R., 2007. Microfluidic large-scale integration: The evolution of design rules for biological automation. In *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. Palo Alto: Annual Reviews, p. 213-231.
- Menon, M.K. & Zydney, A.L., 1998. Measurement of Protein Charge and Ion Binding Using Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 70(8), p.1581-1584.
- Mesiha, M., Plakogiannis, F. & Vejosoth, S., 1994. Enhanced oral absorption of insulin from desolvated fatty acid-sodium glycocholate emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 111(3), p.213-216.
- Michaelis, S. et al., 2012. Macroporous silicon chips for laterally resolved, multi-parametric analysis of epithelial barrier function. *Lab on a Chip*, 12(13), p.2329.

- Miyahara, M. et al., 2006. Adsorption study of heme proteins on SBA-15 mesoporous silica with pore-filling models. *Thin Solid Films*, 499(1–2), p.13–18.
- Miyoshi, J. & Takai, Y., 2005. Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(6), p.815–855.
- Moser, A.C. & Hage, D.S., 2008. Capillary electrophoresis-based immunoassays: principles and quantitative applications. *Electrophoresis*, 29(16), p.3279–3295.
- Müller, L. et al., 2010. Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways. *Journal of The Royal Society Interface*, 7(Suppl 1), p.S27–S40.
- Mukherjee, M., Pritchard, D.I. & Bosquillon, C., 2012. Evaluation of air-interfaced Calu-3 cell layers for investigation of inhaled drug interactions with organic cation transporters in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, 426(1–2), p.7–14.
- Mukherjee, T. et al., 2004. Transepithelial electrical resistance is not a reliable measurement of the Caco-2 monolayer integrity in Transwell. *Drug delivery*, 11(1), p.11–18.
- Mura, S., Hillaireau, H., et al., 2011a. Biodegradable nanoparticles meet the bronchial airway barrier: how surface properties affect their interaction with mucus and epithelial cells. *Biomacromolecules*, 12(11), p.4136–4143.
- Mura, S., Hillaireau, H., et al., 2011b. Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells. *International Journal of Nanomedicine*, 6, p.2591–2605.
- Nalayanda, D.D. et al., 2009. An open-access microfluidic model for lung-specific functional studies at an air-liquid interface. *Biomedical Microdevices*, 11(5), p.1081–1089.
- Nalayanda, D.D. et al., 2010. Engineering an artificial alveolar-capillary membrane: a novel continuously perfused model within microchannels. *Journal of Pediatric Surgery*, 45(1), p.45–51.
- Nazar, H. et al., 2013. A once-a-day dosage form for the delivery of insulin through the nasal route: in vitro assessment and in vivo evaluation. *Biomaterials Science*.
- Nehmé, R. et al., 2008. Influence of polyelectrolyte coating conditions on capillary coating stability and separation efficiency in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 29(14), p.3013–3023.
- Nilsson, H.E. et al., 2010. CFTR and tight junctions in cultured bronchial epithelial cells. *Experimental and Molecular Pathology*, 88(1), p.118–127.
- Park, K., Kwon, I.C. & Park, K., 2011. Oral protein delivery: Current status and future prospect. *Reactive & functional polymers*, 71(3), p.280–287.
- Patel, D.J. et al., 1997. Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes. *Journal of molecular biology*, 272(5), p.645–664.
- Patel, J. et al., 2002. Transport of HIV-protease inhibitors across 1 alpha,25di-hydroxy vitamin D3-treated Calu-3 cell monolayers: modulation of P-glycoprotein activity. *Pharmaceutical Research*, 19(11), p.1696–1703.

- Patton, J.S., 1996. Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 19(1), p.3-36.
- Patton, J.S. et al., 2010. The Particle has Landed—Characterizing the Fate of Inhaled Pharmaceuticals. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 23(S2), p.S-71-S-87.
- Patton, J.S. & Byron, P.R., 2007. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(1), p.67-74.
- Patton, J.S., Fishburn, C.S. & Weers, J.G., 2004. The Lungs as a Portal of Entry for Systemic Drug Delivery. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 1(4), p.338-344.
- Pauletti, G.M. et al., 1996. Structural requirements for intestinal absorption of peptide drugs. *Journal of Controlled Release*, 41(1-2), p.3-17.
- Peppas, N.A. & Carr, D.A., 2009. Impact of absorption and transport on intelligent therapeutics and nanoscale delivery of protein therapeutic agents. *Chemical Engineering Science*, 64(22), p.4553-4565.
- Petronis, S. et al., 2006. Transparent polymeric cell culture chip with integrated temperature control and uniform media perfusion. *BioTechniques*, 40(3), p.368-376.
- Pezron, I. et al., 2002. Insulin aggregation and asymmetric transport across human bronchial epithelial cell monolayers (Calu-3). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(4), p.1135-1146.
- Powell, D.W., 1981. Barrier function of epithelia. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 241(4), p.G275-G288.
- Prabhakarandian, B. et al., 2013. SyM-BBB: a microfluidic blood brain barrier model. *Lab on a Chip*, 13(6), p.1093-1101.
- Primiceri, E. et al., 2013. Cell chips as new tools for cell biology – results, perspectives and opportunities. *Lab on a Chip*, 13(19), p.3789.
- Rabiller-Baudry, M. & Chaufer, B., 2001. Specific adsorption of phosphate ions on proteins evidenced by capillary electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 753(1), p.67-77.
- Rabkin, R. & Dahl, D.C., 1993. Renal Uptake and Disposal of Proteins and Peptides. In K. L. Audus & T. J. Raub, éd. *Biological Barriers to Protein Delivery*. Pharmaceutical Biotechnology. Springer US, p. 299-338.
- Rehder-Silinski, M.A. & McGown, L.B., 2003. Capillary electrochromatographic separation of bovine milk proteins using a G-quartet DNA stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 1008(2), p.233-245.
- Renukuntla, J. et al., 2013. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 447(1-2), p.75-93.
- Rodriguez, I. & Li, S.F.Y., 1999. Surface deactivation in protein and peptide analysis by capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 383(1-2), p.1-26.

- Rojanasakul, Y. et al., 1992. The transport barrier of epithelia: a comparative study on membrane permeability and charge selectivity in the rabbit. *Pharmaceutical research*, 9(8), p.1029-1034.
- Román, D.A. et al., 2004. Subminute and sensitive determination of the neurotransmitter serotonin in urine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Biomedical chromatography: BMC*, 18(7), p.422-426.
- Roper, M.G. et al., 2003. Microfluidic Chip for Continuous Monitoring of Hormone Secretion from Live Cells Using an Electrophoresis-Based Immunoassay. *Analytical Chemistry*, 75(18), p.4711-4717.
- Rothen-Rutishauser, B.M., Kiama, S.G. & Gehr, P., 2005. A Three-Dimensional Cellular Model of the Human Respiratory Tract to Study the Interaction with Particles. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 32(4), p.281-289.
- Sahoo, S.K. & Labhasetwar, V., 2003. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today*, 8(24), p.1112-1120.
- Sakagami, M., 2006. In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(9-10), p.1030-1060.
- Schmalzing, D. & Nashabeh, W., 1997. Capillary electrophoresis based immunoassays: A critical review. *Electrophoresis*, 18(12-13), p.2184-2193.
- Schneeberger, E.E. & Lynch, R.D., 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 286(6), p.C1213 -C1228.
- Seki, T. et al., 2007. Effects of a sperminated gelatin on the nasal absorption of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, 338(1-2), p.213-218.
- Seki, T. et al., 2011. Effects of Sperminated Pullulans on the Pulmonary Absorption of Insulin. *Yakugaku Zasshi*, 131(2), p.307-314.
- Shao, J. et al., 2010. A microfluidic chip for permeability assays of endothelial monolayer. *Biomedical Microdevices*, 12(1), p.81-88.
- Shapiro, D.L. et al., 1978. Phospholipid biosynthesis and secretion by a cell line (A549) which resembles type II alveolar epithelial cells. *Biochimica et biophysica acta*, 530(2), p.197-207.
- Shen, B.Q. et al., 1994. Calu-3: a human airway epithelial cell line that shows cAMP-dependent Cl⁻ secretion. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 266(5), p.L493-L501.
- Shen, R. et al., 2010. Highly sensitive determination of recombinant human erythropoietin-alpha in aptamer-based affinity probe capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of chromatography. A*, 1217(35), p.5635-5641.
- Shimura, K. & Karger, B.L., 1994. Affinity probe capillary electrophoresis: analysis of recombinant human growth hormone with a fluorescent labeled antibody fragment. *Analytical Chemistry*, 66(1), p.9-15.

- Shojaei, A.H., 1998. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques*, 1(1), p.15-30.
- Shoyele, S.A. & Slowey, A., 2006. Prospects of formulating proteins/peptides as aerosols for pulmonary drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 314(1), p.1-8.
- Sia, S.K. & Whitesides, G.M., 2003. Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis*, 24(21), p.3563-3576.
- Simon-Deckers, A. et al., 2008. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology*, 253(1-3), p.137-146.
- Skolimowski, M. et al., 2012. Modular microfluidic system as a model of cystic fibrosis airways. *Biomicrofluidics*, 6(3), p.034109-034109-11.
- Sowell, J., Parihar, R. & Patonay, G., 2001. Capillary electrophoresis-based immunoassay for insulin antibodies with near-infrared laser induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 752(1), p.1-8.
- Spiekermann, G.M. et al., 2002. Receptor-mediated Immunoglobulin G Transport Across Mucosal Barriers in Adult Life Functional Expression of FcRn in the Mammalian Lung. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(3), p.303-310.
- Sporty, J.L., Horáková, L. & Ehrhardt, C., 2008. *In vitro* cell culture models for the assessment of pulmonary drug disposition. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4(4), p.333-345.
- Steimer, A., Haltner, E. & Lehr, C.-M., 2005. Cell culture models of the respiratory tract relevant to pulmonary drug delivery. *Journal of aerosol medicine: the official journal of the International Society for Aerosols in Medicine*, 18(2), p.137-182.
- Stentebjerg-Andersen, A. et al., 2011. Calu-3 cells grown under AIC and LCC conditions: Implications for dipeptide uptake and transepithelial transport of substances. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(1), p.19-26.
- Stutz, H., 2009. Protein attachment onto silica surfaces – a survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in CE. *Electrophoresis*, 30(12), p.2032-2061.
- Stutz, H., Bordin, G. & Rodriguez, A.R., 2003. Separation of selected metal-binding proteins with capillary zone electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 477(1), p.1-19.
- Sugiura, S. et al., 2008. Pressure-driven perfusion culture microchamber array for a parallel drug cytotoxicity assay. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(6), p.1156-1165.
- Sung, J.C., Pulliam, B.L. & Edwards, D.A., 2007. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. *Trends in Biotechnology*, 25(12), p.563-570.
- Sung, J.H. & Shuler, M.L., 2009. A micro cell culture analog (mu CCA) with 3-D hydrogel culture of multiple cell lines to assess metabolism-dependent cytotoxicity of anti-cancer drugs. *Lab on a Chip*, 9(10), p.1385-1394.

- Szöko, E. & Tábi, T., 2010. Analysis of biological samples by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 53(5), p.1180-1192.
- Tang, L. & Meibohm, B., 2006. Pharmacokinetics of Peptides and Proteins. In B. Meibohm, éd. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Biotech Drugs*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 15-43.
- Tavana, H. et al., 2010. Dynamics of Liquid Plugs of Buffer and Surfactant Solutions in a Micro-Engineered Pulmonary Airway Model. *Langmuir*, 26(5), p.3744-3752.
- Tavana, H. et al., 2011. Epithelium damage and protection during reopening of occluded airways in a physiologic microfluidic pulmonary airway model. *Biomedical Microdevices*, 13(4), p.731-742.
- Tavana, H. et al., 2009. Microfluidics, Lung Surfactant, and Respiratory Disorders. *Lab Medicine*, 40(4), p.203-209.
- Tavelin, S. et al., 2002. Applications of Epithelial Cell Culture in Studies of Drug Transport. In C. Wise, éd. *Epithelial Cell Culture Protocols*. Methods In Molecular Medicine™. Humana Press, p. 233-272.
- Teijeiro-Osorio, D., Remuñán-López, C. & Alonso, M.J., 2009. Chitosan/cyclodextrin nanoparticles can efficiently transfect the airway epithelium in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(2), p.257-263.
- Tietze, F., Mortimore, G.E. & Lomax, N.R., 1962. Preparation and properties of fluorescent insulin derivatives. *Biochimica et biophysica acta*, 59, p.336-346.
- Toh, A.G.G. et al., 2014. Engineering microfluidic concentration gradient generators for biological applications. *Microfluidics and Nanofluidics*, 16(1-2), p.1-18.
- Toh, Y.-C. et al., 2009. A microfluidic 3D hepatocyte chip for drug toxicity testing. *Lab on a Chip*, 9(14), p.2026.
- Underberg, W.J.M. & Waterval, J.C.M., 2002. Derivatization trends in capillary electrophoresis: An update. *Electrophoresis*, 23(22-23), p.3922-3933.
- Del Valle, E.M.M., Galan, M.A. & Carbonell, R.G., 2009. Drug Delivery Technologies : The Way Forward in the New Decade. *Industrial & engineering chemistry research*, 48(5), p.2475-2486.
- Van der Veen, M., Norde, W. & Stuart, M.C., 2004. Electrostatic interactions in protein adsorption probed by comparing lysozyme and succinylated lysozyme. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 35(1), p.33-40.
- Vllasaliu, D. et al., 2011. Barrier characteristics of epithelial cultures modelling the airway and intestinal mucosa: a comparison. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 415(4), p.579-585.
- Vllasaliu, D. et al., 2012. Fc-mediated transport of nanoparticles across airway epithelial cell layers. *Journal of Controlled Release*, 158(3), p.479-486.
- Vllasaliu, D. et al., 2010. Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: Comparison with chitosan solution. *International Journal of Pharmaceutics*, 400(1-2), p.183-193.

- Wan, H. et al., 2000. Tight junction properties of the immortalized human bronchial epithelial cell lines Calu-3 and 16HBE14o-. *European Respiratory Journal*, 15(6), p.1058 -1068.
- Wang, S., Chow, M.S.S. & Zuo, Z., 2011. An approach for rapid development of nasal delivery of analgesics—Identification of relevant features, in vitro screening and in vivo verification. *International Journal of Pharmaceutics*, 420(1), p.43-50.
- Wang, Z. et al., 2007. High-density microfluidic arrays for cell cytotoxicity analysis. *Lab on a Chip*, 7(6), p.740-745.
- Wang, Z., Zhang, Y. & Zhang, Q., 2004. Transport of proteins and peptides across human cultured alveolar A549 cell monolayers. *Yao Xue Xue Bao = Acta Pharmaceutica Sinica*, 39(5), p.392-395.
- Waterval, J.C.M. et al., 2000. Derivatization trends in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 21(18), p.4029-4045.
- Weibel, D.B. & Whitesides, G.M., 2006. Applications of microfluidics in chemical biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(6), p.584-591.
- Weibel, E.R. & Gomez, D.M., 1962. Architecture of the Human Lung Use of quantitative methods establishes fundamental relations between size and number of lung structures. *Science*, 137(3530), p.577-585.
- Whitesides, G.M., 2006. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101), p.368-373.
- Winton, H.L. et al., 1998. Cell lines of pulmonary and non-pulmonary origin as tools to study the effects of house dust mite proteinases on the regulation of epithelial permeability. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 28(10), p.1273-1285.
- Winton, H.L. et al., 1998. Class specific inhibition of house dust mite proteinases which cleave cell adhesion, induce cell death and which increase the permeability of lung epithelium. *British Journal of Pharmacology*, 124(6), p.1048-1059.
- Witschi, C. & Mrsny, R.J., 1999. In vitro evaluation of microparticles and polymer gels for use as nasal platforms for protein delivery. *Pharmaceutical research*, 16(3), p.382-390.
- Wlodkowic, D., Skommer, J., et al., 2009. Chip-based dynamic real-time quantification of drug-induced cytotoxicity in human tumor cells. *Analytical chemistry*, 81(16), p.6952-6959.
- Wlodkowic, D., Faley, S., et al., 2009. Microfluidic Single-Cell Array Cytometry for the Analysis of Tumor Apoptosis. *Analytical Chemistry*, 81(13), p.5517-5523.
- Wottrich, R., Diabaté, S. & Krug, H.F., 2004. Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *International journal of hygiene and environmental health*, 207(4), p.353-361.
- Yang, W., Peters, J.I. & Williams III, R.O., 2008. Inhaled nanoparticles—A current review. *International Journal of Pharmaceutics*, 356(1-2), p.239-247.

- Yang, X. et al., 2000. Characterization of proteolytic activities of pulmonary alveolar epithelium. *International Journal of Pharmaceutics*, 195(1–2), p.93–101.
- Yeon, J. et al., 2012. Reliable permeability assay system in a microfluidic device mimicking cerebral vasculatures. *Biomedical Microdevices*, 14, p.1–8.
- Yeon, J.H. & Park, J.-K., 2009. Drug permeability assay using microhole-trapped cells in a microfluidic device. *Analytical Chemistry*, 81(5), p.1944–1951.
- Yeon, J.H. & Park, J.-K., 2007. Microfluidic Cell Culture Systems for Cellular Analysis. *Biochip journal*, 1(1), p.17–27.
- Yeung, W.S.B. et al., 2003. Capillary electrophoresis-based immunoassay. *Journal of Chromatography B*, 797(1–2), p.217–228.
- Yoshida, W. et al., 2009. Selection of DNA aptamers against insulin and construction of an aptameric enzyme subunit for insulin sensing. *Biosensors & bioelectronics*, 24(5), p.1116–1120.
- Young, E.W.K. et al., 2010. Technique for real-time measurements of endothelial permeability in a microfluidic membrane chip using laser-induced fluorescence detection. *Analytical chemistry*, 82(3), p.808–816.
- Young, E.W.K. & Beebe, D.J., 2010. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. *Chemical Society reviews*, 39(3), p.1036–1048.
- Zhou, L. et al., 2010. Microwave-accelerated derivatization for capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: A case study for determination of histidine, 1- and 3-methylhistidine in human urine. *Talanta*, 82(1), p.72–77.
- Zinellu, A. et al., 2009. Taurine determination by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: from clinical field to quality food applications. *Amino acids*, 36(1), p.35–41.
- Ziolkowska, K. et al., 2010. PDMS/glass microfluidic cell culture system for cytotoxicity tests and cells passage. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 145(1), p.533–542.

Annexe A :

Matériels et méthodes relatifs au chapitre 1

A.1. Optimisation des conditions de culture à l'échelle macroscopique en systèmes perméables

1. Entretien des cellules Calu-3

Les cellules Calu-3 (ATCC n°HTB-55) ont été cultivées en flasques 75 cm² (Dominique Dutscher) en milieu DMEM contenant du rouge de phénol et complété avec 10 % de sérum de veau fœtal (FBS) et 50 U/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine (Lonza). Les cellules ont été incubées à 37 °C sous atmosphère humide (~90%) et enrichie à 5% de CO₂. Le milieu a été renouvelé tous les 3-4 jours et un passage (repiquage) a été effectué environ une fois par semaine à un ratio 1 : 3 en suivant les étapes suivantes :

- Lavage rapide des tapis cellulaires avec du DPBS (Lonza) pour éliminer toute traces de FBS ;
- Introduction de 2 mL de trypsine 2,5X diluée dans du DPBS et incubation à 37 °C, 15-20 min le temps d'observer le décollement presque total des cellules ;
- Introduction de 4 mL de milieu de culture pour stopper l'action de la trypsine de par la présence de FBS contenant des inhibiteurs de protéases ;
- Transfert de 2 mL de la suspension cellulaire dans chaque nouvelle flasque de culture contenant 10 mL de milieu.

2. Comparaison des lots de sérum par construction de courbes de croissance

Les cellules ont dans un premier temps été cultivées pendant deux semaines avec chaque nouveau lot de sérum (FBS) à tester ainsi qu'avec le lot de référence. Au terme de cette période d'adaptation, les cellules arrivées à environ 90% de confluence ont été ensemencées en plaques 24 puits, à raison d'une plaque par lot de FBS à tester. Cette taille de puits (1,9 cm²) a ici été volontairement choisie dans le but de se rapprocher au plus près de la surface des inserts Transwell® utilisés (1,12 cm²). Le nombre initial de cellules déposées dans chaque puits a été fixé à 30 000 cellules/cm², nombre moyen de cellules habituellement transférées lors des passages des cellules Calu-3 cultivées avec le lot FBS de référence.

Le suivi de la prolifération cellulaire a été effectué par comptages réguliers sur cellules de Malassez, deux puits de chaque plaque étant utilisés pour chaque comptage. L'évolution de la

confluence a été rigoureusement suivie au microscope optique inversé et le milieu des puits renouvelé tous les deux jours. L'influence de chaque lot de FBS sur la prolifération cellulaire a été évaluée par construction de courbes de croissance, exprimant le nombre de cellules au cm^2 par unité de temps.

3. Ensemencement en systèmes Transwell®

Tous les travaux relatifs à l'étude préliminaire sur les conditions de culture ont été réalisés en plaques Transwell® 12 puits ($1,12 \text{ cm}^2$) de chez Costar® Corning®. Plusieurs types de membranes et tailles de pores ont été utilisés : PC $0,4 \mu\text{m}$ (Costar#3401), PET $0,4 \mu\text{m}$ (Costar#3460), PC $3 \mu\text{m}$ (Costar#3402), PET $0,4 \mu\text{m}$ (Costar#3462).

Les suspensions cellulaires issues de plusieurs flasques d'entretien ont été mises en commun puis passées à l'aiguille pour individualiser les cellules afin d'assurer un ensemencement homogène entre chaque insert des plaques Transwell®. Le nombre de cellules/mL de la suspension cellulaire commune a été déterminé par comptage sur cellule de Malassez, puis la suspension diluée dans du milieu de culture pour atteindre la concentration souhaitée. $0,5 \text{ mL}$ de cette suspension cellulaire diluée a été déposé dans le compartiment supérieur de l'insert (apical) puis $1,5 \text{ mL}$ de milieu ont été ajoutés dans le compartiment inférieur du puits (basolatéral). Par exemple, pour un ensemencement à $270\,000 \text{ cellules/cm}^2$ (soit $300\,000 \text{ cellules/puits}$), une suspension cellulaire de $600\,000 \text{ cellules/mL}$ a été utilisée.

Après 24 ou 48h d'incubation, les cellules ont été cultivées en interface air-liquide (AIC) par retrait du milieu côté apical. Les premiers jours, le milieu ayant diffusé du compartiment basolatéral vers le compartiment apical a été régulièrement éliminé par aspiration douce pour assurer le mode AIC pendant toute la durée de la culture. Le milieu basolatéral a été renouvelé tous les deux jours. Afin de ne pas endommager ou décoller les tapis cellulaires pendant cette étape, l'insert a été retiré du puits à l'aide d'une pince pendant que le milieu basolatéral a été réintroduit dans le fond du puits.

4. Mesure de la TEER en système Transwell®

Les mesures de TEER ont été réalisées avec le Volt-Ohm-Mètre EVOM et les électrodes STX2 de chez WPI (World Precision Instruments).

Les tapis cellulaires ont été pré-incubés à 37°C pendant 30 min après ajout de $0,5 \text{ mL}$ de milieu apical et changement de milieu basolatéral. Les électrodes de mesure ont préalablement été

stérilisées à l'éthanol 70% puis trempées dans du milieu de culture avant d'être introduites dans les puits Transwell®. Cette opération a été répétée entre chaque puits.

La TEER est calculée à partir de la valeur de résistance mesurée à travers l'épithélium (R_E) à laquelle est soustraite la résistance de la membrane de l'insert en absence de cellules (R_M), et est exprimée en fonction de la surface (S) de l'insert selon l'équation suivante :

$$TEER (\Omega.cm^2) = (R_E - R_M) \times S \quad \text{Equation (1)}$$

5. Immunomarquage des tapis cellulaires en systèmes Transwell®

L'immunomarquage des jonctions serrées et des filaments d'actine des tapis cellulaires a été réalisé selon les étapes suivantes, à température ambiante :

- *Fixation par le formaldéhyde.* Cette étape a pour but d'immobiliser les antigènes (protéine ZO-1 et actine dans notre cas) tout en conservant l'architecture cellulaire en créant des pontages intermoléculaires qui stabilisent le tissu. Pour cela, les tapis cellulaires ont été rincés avec du tampon DPBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+} , puis immergés pendant 15 min avec du formaldéhyde 3,7% dilué dans le tampon de rinçage (DPBS). Après 3 rinçages successifs de 5 min, la réactivité des aldéhydes a été bloquée par immersion des cellules pendant 10 min dans du chlorure d'ammonium 50 mM (NH_4Cl).
- *Perméabilisation.* Cette étape permet de favoriser la pénétration des anticorps dirigés contre les antigènes cibles dans toutes les cellules et compartiments cellulaires. Après élimination du NH_4Cl , les tapis cellulaires ont été immergés 5 min dans du Triton-X100 0,2% dans le DPBS, puis rincés 2 fois pendant 5 min.
- *Saturation.* Pour réduire l'adsorption non-spécifique des anticorps, les tapis cellulaires ont été immergés 1 h dans une solution de gélatine 0,2% + FBS 10% dans le DPBS.
- *Immunodétection des protéines ZO-1.* Cette étape a été réalisée en chambre humide, à l'obscurité et sous agitation. L'anticorps primaire (rabbit anti-ZO-1, Zymed) dilué à 1,25 $\mu g/mL$ en solution 0,2% de gélatine dans le DPBS a été incubé pendant 2 h, les tapis cellulaires ensuite lavés trois fois 5 min avec une solution de Tween 20 0,2% dans le DPBS. L'anticorps secondaire (FluoProbes®488 donkey anti-rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories) dilué à 10 $\mu g/mL$ dans le même tampon a ensuite été incubé 1 h et les tapis cellulaires de nouveau lavés à trois reprises pendant 5 min.

- *Co-marquage des filaments d'actine.* Cette étape a été réalisée en chambre humide, à l'obscurité et sous agitation. Les filaments d'actine ont été marqués par la phalloïdine (Phalloidin-FluoProbes® 547H, Interchim) par une incubation pendant 45 min à une concentration de 5 U/mL (0,165 nmol/L), suivi de trois lavages successifs de 5 min avec la solution de Tween 20 0,2% dans le DPBS.

- *Préparation des lames.* Les membranes de chaque insert ont été découpées à l'aide d'un scalpel puis déposées sur une lame de verre pour microscopie (cellules vers le haut). Après dépôt d'une goutte de milieu de montage (Vectashield® mounting medium, Vector Laboratories) sur les tapis cellulaires, une lamelle de verre a été posée sur la lame. Le montage a été scellé hermétiquement à l'aide de vernis déposé à cheval sur la lame et la lamelle. Les lames peuvent en principe être conservées plusieurs mois à +4°C dans l'obscurité.

6. Microscopie confocale

L'observation des résultats d'immunomarquage a été effectuée à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (LSM-510 Zeiss®). Les protéines de jonctions ZO-1 (fluorescence verte) ont été observées après illumination de l'échantillon avec un laser Argon multi-raies 30 mW (excitation 488 nm, émission 505-550 nm avec un filtre passe-bande), les filaments d'actine (fluorescence rouge) avec un laser Hélium-Néon 1 mW (excitation 543 nm, émission > 560 nm avec un filtre passe-haut). Différents objectifs ont été utilisés : objectif Plan-Néofluar 10X/ouverture numérique 0,3 s ; objectif C-Apochromat 40X à immersion dans l'eau/ ouverture numérique 1,20 s; objectif Plan-Apochromat 63X à immersion dans l'huile / ouverture numérique 1,40 s. Les images ont été obtenues grâce au logiciel d'acquisition LSM 510 version 3.2 (Zeiss®).

7. Mesure de perméabilité Au ¹⁴C-sucrose en systèmes Transwell®

Le ¹⁴C-sucrose (activité spécifique 498 mCi/mmol), les flacons à scintillation en polyéthylène (20 mL) et le liquide de scintillation UltimaGold ont été obtenus auprès de PerkinElmer®. Le nombre de désintégration par minute (dpm) a été déterminé à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Beckman-LS 6000SE Series, Beckman Coulter, Inc.).

Une solution à 0,1 µCi/mL (solution mère) a été préparée dans le milieu de culture complet à partir de la solution stock à 0,1 mCi/mL, puis équilibrée à 37°C dans un incubateur dédié à la manipulation de produits radioactifs. Trois échantillons de solution mère (100 µL) ont été

immédiatement transférés dans des flacons à scintillation qui serviront à déterminer la concentration initiale déposée sur les tapis cellulaires (C_0).

0,5 mL de solution mère a été déposé dans le compartiment apical des inserts. Les compartiments basolatéraux ont préalablement été renouvelés avec 1,5 mL de milieu de culture complet. Après 15, 30 et 60 min, la totalité de la solution apicale (0,5 mL) et un échantillon de la solution basolatérale (1 mL) ont été déposés dans des flacons à scintillation. Entre chaque temps, l'insert a été transféré dans un puits adjacent contenant 1,5 mL de milieu de culture complet. La même manipulation a été réalisée dans des inserts contrôle ne contenant pas de cellules pour déterminer la perméabilité des membranes microporeuses.

Chaque flacon à scintillation contenant l'échantillon a été pesé afin de déterminer le volume exact prélevé (chaque flacon étant préalablement pesé vide). La même manipulation a été réalisée pour la solution mère de départ, avant d'être déposée sur les cellules. 10 mL de scintillant ont été ajoutés, les flacons vortexés à grande vitesse pendant 15 s puis laissés à reposer 1 h avant comptage.

Les coefficients de perméabilité du ^{14}C -sucrose (exprimés en cm.s^{-1}) à travers les tapis cellulaires ou la membrane de l'insert sont calculés selon l'équation suivante :

$$P_{app} = \left(\frac{dC}{dt} \right) \left(\frac{V}{A C_0} \right) \quad \text{Equation (2)}$$

où dC/dt est le flux linéaire de marqueur du compartiment apical vers le compartiment basolatéral ($\text{dpm.mL}^{-1}.\text{s}^{-1}$), V le volume dans le compartiment basolatéral (mL), A la surface de l'épithélium et de la membrane (cm^2) et C_0 la concentration initiale de ^{14}C -sucrose déposé dans le compartiment apical (dpm.mL^{-1}).

A.2. Microfabrication : mise au point et optimisation du microsystème

1. Collage de la membrane microporeuse sur la plateforme de culture sous irradiation UV

L'insertion de la membrane microporeuse à la base des micropuits de la plateforme de culture a été effectuée selon les étapes suivantes :

Etape 1. Un polymère liquide adhésif (Norland Optical Adhesive, NOA83H) réticulant sous l'action d'une lampe à rayons ultraviolets et faisant office de « colle » a été étalé sur la face externe des plateformes de culture, autour et au niveau du micropuits. Un morceau de scotch a été déposé de l'autre côté du micropuits (côté face interne) de sorte que la colle reste dans le micropuits. Le système a été disposé sous une lampe UV (Hamamatsu LC5), puis exposé à un rayonnement ($\lambda=365$ nm) à la puissance de 15 mW/cm^2 pendant 80s (distance en hauteur entre la lampe et le système : 30 cm). Un morceau de PDMS, qui laisse passer les rayonnements UV a été utilisé provisoirement pour faciliter l'étalement de la colle en couche fine sur les bords du micropuits. Le PDMS, poreux, laisse passer l' O_2 et a permis d'obtenir une fine couche de colle NOA non réticulée en surface.

Etape 2. La colle non réticulée présente dans le micropuits a ensuite été retirée par simple arrachage du scotch.

Etape 3. La membrane microporeuse (en PET ou en PC) a été déposée sur la colle NOA partiellement réticulée, côté face externe du micropuits. Un morceau de PDMS auquel la membrane microporeuse adhère a là encore été utilisé provisoirement pour assurer le dépôt de la membrane sur un plan bien horizontal. Le système a été une nouvelle fois exposé à un rayonnement UV cette fois-ci plus intense (60 mW/cm^2 pendant 80 s), qui a entraîné la réticulation complète de la colle NOA et le scellage définitif de la membrane à la base des micropuits.

2. Collage thermique de la membrane microporeuse sur la plateforme de culture

L'insertion de la membrane microporeuse à la base des micropuits de la plateforme de culture a été effectuée selon les étapes suivantes :

Etape 1. Les micropuits ont été créés dans des lames de verre de microscopie par perçage à la microbilleuse. Pour cela, la lame de verre a été fixée à un support métallique percé de trous de 2 mm, puis celui-ci a été bombardé de microbilles de silice à forte pression, créant ainsi des trous de profil conique dans la lame de verre en quelques dizaines de secondes.

Etape 2. Après nettoyage, un film de paraffine (PARAFILM®) a été déposé sur la lame de verre (elle recouvre alors la base des micropuits) et est chauffée à 80°C pendant 1 min à l'aide d'une plaque chauffante. A cette température, la paraffine fond mais ne coule pas, et devient transparente. Lorsqu'elle refroidit en l'espace de quelques secondes, la paraffine durcit à nouveau et retrouve son aspect opaque initial tout en ayant adhéré au support.

Etape 3. Afin d'obtenir une taille de puits reproductible, ce qui est difficile après perçage à la microbilleuse, la paraffine a été percée au centre des micropuits à l'aide d'un poinçon (Harris Uni-Core™, Ted Pella Inc.), dont nous avons fait varier les diamètres de 1 à 1,5 mm. Un diamètre de 1,2 mm permettant d'obtenir une surface de 1 mm² a finalement été sélectionné.

Etape 4. La membrane microporeuse a ensuite été apposée sur la paraffine (à l'aide d'un morceau de PDMS pour les mêmes raisons que la méthode de fabrication précédente) et la lame de verre a de nouveau été chauffée à 80°C pendant 2 min, en appliquant une pression manuelle sur le morceau de PDMS afin de favoriser la prise en masse de la membrane microporeuse dans la paraffine. L'ensemble lame de verre + PDMS a enfin été retiré de la plaque chauffante, puis seulement après refroidissement total de plusieurs minutes, le PDMS a été retiré délicatement.

A.3. Culture miniaturisée : mise au point et caractérisation du microsystème

1. Mise en culture des plateformes de culture

La mise en culture des plateformes de culture est effectuée selon la succession des étapes suivantes :

1. La plateforme de culture et son support circulaire en PMMA sont stérilisés à l'éthanol 70% ;
2. Sous hotte à flux laminaire, le support et la plateforme de culture sont installés dans une boîte de Petri 60 cm² ;
3. L'ensemencement des micropuits est réalisé avec 10 µL de suspension cellulaire Calu-3 à 1×10^6 cellules/mL soit 10 000 cellules/cm². Une pipette munie d'un cône effilé est utilisé pour permettre le dépôt de la suspension cellulaire au fonds des micropuits;
4. Le fond de la boîte de Petri est ensuite remplie de milieu de culture complet, de manière progressive jusqu'à mouiller le dessous de la plateforme de culture. Environ 30 mL de milieu basolatéral est ainsi introduit.
5. La boîte de Petri refermée à l'aide de son couvercle est placée dans l'incubateur à 37°C.

2. Caractérisation du microsystème final

Les méthodes employées pour caractériser les barrières cellulaires en microsystème sont décrites dans la publication intitulée « A microdevice for parallelized pulmonary permeability studies » incluse dans le chapitre 1.

Annexe B :

Matériels et méthodes relatifs au chapitre 2

B.1. Etude du passage de nanoparticules biodégradables de PLGA utilisées pour la vectorisation de molécules thérapeutiques

1. Préparation des nanoparticules de PLGA

Les nanoparticules (NPs) de PLGA sont fabriquées par la méthode d'émulsion-évaporation de solvant, selon deux protocoles distincts en fonction de la nature du tensio-actif utilisé pour conférer un état de charge spécifique aux nanoparticules. Le poly(vinyl alcool) (PVA), le chitosane (CS) et le poloxamère Pluronic F68 (PF68) ont été utilisés comme tensio-actifs. Les NPs préparées sont rendues fluorescentes grâce à l'utilisation d'un mélange 70/30 (m/m) de PLGA libre (75 :25 Resomer[®] RG756) et de PLGA marqué à la rhodamine B (50 :50 Resomer[®] RG503H) (Borhinger Ingelheim).

• *NPs au potentiel de surface neutre (RhodB-PLGA/PVA) et au potentiel de surface positif (RhodB-PLGA/CS)* (Figure 73a)

Les NPs sont préparées par dissolution de 100 mg de PLGA dans 5 mL d'un mélange dichlorométhane/acétone (1/1 v/v). La solution organique est pré-émulsionnée au vortex pendant 1 min avec 20 mL d'une solution aqueuse de PVA 0,25% (m/v) (Sigma-Aldrich) pour les NPs PLGA/PVA, ou avec 20 mL d'une solution aqueuse de chitosane 0,6% (m/v) (chitosan chloride PROTASANTM UP CL 113, NovaMatrix) dans une solution de Mowiol[®] 4-88 PVA 0,5 % (m/v) (Kuraray Europe GmbH) pour les NPs PLGA/CS. Dans les deux cas, la pré-émulsion est conservée dans la glace, puis mise aux ultrasons pendant 1 min, amplitude 40% (VibraCell 75041, Fisher Scientific). La phase organique est ensuite évaporée à température ambiante sous agitation magnétique. La suspension de NPs est ajustée à 20 mL avec de l'eau ultrapure puis purifiée par ultracentrifugation à 27440g à 4°C pendant 1 h (ultracentrifugeuse Optima LE-80K, Beckman Coulter). Le surnageant est ensuite conservé à +4°C pendant une nuit avant de redisperser les NPs dans de l'eau ultrapure au vortex.

• *NPs au potentiel de surface négatif (RhodB-PLGA/PF68)* (Figure 73b)

Les nanoparticules sont préparées par dissolution de 50 mg de PLGA dans 5 mL d'acétate d'éthyle. Sous forte agitation magnétique, cette phase organique est ajoutée au goutte à goutte dans 10 mL d'une solution aqueuse de PF68 à 1% (m/v) (BASF). Une minute de vortex permet d'obtenir une pré-émulsion grossière, affinée par la suite par ultra turrax pendant 1 min à 1000 tours par minute. Ce type de nanoparticules étant très difficile à re-suspendre après ultracentrifugation, l'émulsion est cette fois-ci purifiée après évaporation du solvant par dialyse contre 1 L d'eau ultrapure (seuil de rétention moléculaire 50 000 Da) pendant 24h.

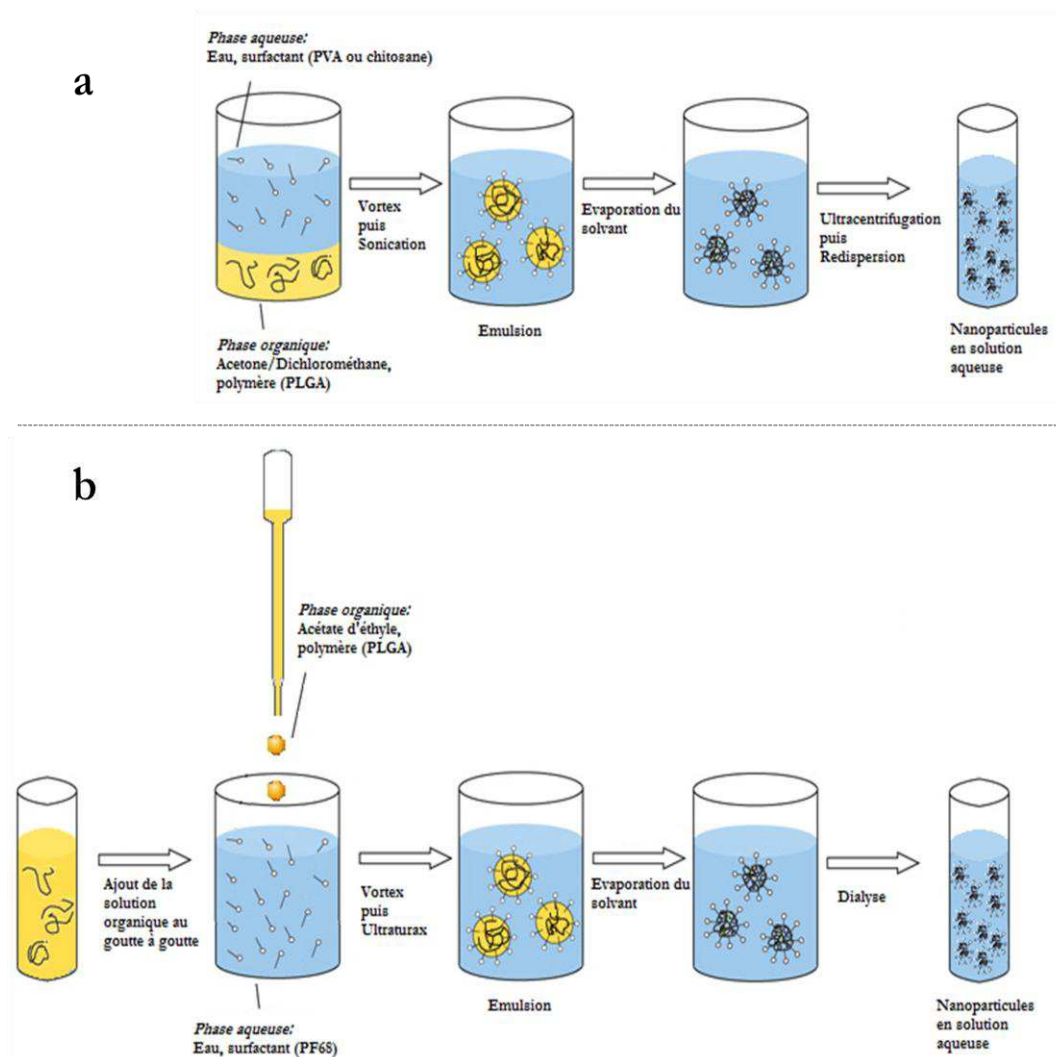


Figure 73. Etapes de la fabrication des nanoparticules de RhodB-PLGA par le processus d'émulsion-évaporation de solvant. Méthode appliquée (a) pour les nanoparticules au potentiel de surface neutre et positif ou (b) négatif.

Annexe C :

Matériels et méthodes relatifs au chapitre 3

Instrumentation

Toutes les expériences de ce chapitre ont été réalisées avec les systèmes d'électrophorèse capillaire Beckman Coulter PA 800 et PA800+. Ces appareils sont couplés à une détection UV, à une barette de diode ou à la détection LIF. Les données sont retraitées par le logiciel karat 7.0. Les capillaires utilisés sont composés de silice fondue de chez PHYMEP et présentent un diamètre interne de 50 ou 75 μm . Tout nouveau capillaire est conditionné par des rinçages hydrodynamiques successifs de 5 min à 40 psi avec de la soude à 1 M, de la soude à 0,1 M puis de l'eau ultra-pure.

Résumé

La voie pulmonaire suscite un intérêt grandissant pour l'administration systémique des peptides et protéines thérapeutiques, aujourd'hui encore administrés essentiellement par voie parentérale. Un microsystème a été conçu pour permettre de faciliter et accélérer les études *in vitro* de criblage de différentes biomolécules actives et de sélectionner les formulations les plus adaptées à leur pénétration à travers l'épithélium pulmonaire, en vue de sélectionner les meilleurs candidats à une administration par voie pulmonaire. Organisé en deux configurations distinctes, ce microsystème permet dans un premier temps d'obtenir des barrières épithéliales pulmonaires polarisées et jointives (cellules Calu-3) en seulement 7 jours dans des micropuits de 1mm², sans avoir à renouveler le milieu nutritif ni avoir recours à un appareillage externe associé au microsystème. Grâce à la mise au point d'une technique simple de fabrication, des plateformes de culture contenant de nombreux micropuits en parallèle sont aujourd'hui fabriquées de manière standardisée. L'évaluation du passage de molécules est ensuite réalisée sous une deuxième configuration dédiée à la mesure de la perméabilité des barrières épithéliales cultivées en micropuits. La capacité de différents candidats (nanoparticules et biomolécules) à traverser l'épithélium pulmonaire a été étudiée. Le passage de nanoparticules de PLGA revêtues de chitosane ainsi que le passage de l'insuline ont été démontrés avec succès. Enfin, l'électrophorèse capillaire couplée à une détection par fluorescence induite par laser (EC-LIF), compatible avec les faibles volumes manipulés dans ce microsystème, a été exploitée pour la détection et la quantification de l'insuline après passage des barrières pulmonaires miniaturisées. A cette fin, l'insuline a soit été marquée par le FITC, soit complexée à un anticorps ou à un aptamère fluorescents. A l'heure actuelle, seule la méthode développée pour le marquage de l'insuline par le FITC est utilisable à des fins de quantification, mais le recours à un aptamère a montré des premiers résultats encourageants.

Mots clés

Voie pulmonaire, microsystème, épithélium pulmonaire, tests de transport, criblage, électrophorèse capillaire

Laboratoire de rattachement

UMR CNRS 8612, Institut Galien Paris-Sud
Equipe Protéines et Nanotechnologies en Sciences Séparatives
Université Paris-Sud
UFR de Pharmacie
5 rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry