



Microsystèmes magnétiques et électriques pour la modification spatio-temporelle de voies de signalisation biologiques

Elsa Mazari

► To cite this version:

Elsa Mazari. Microsystèmes magnétiques et électriques pour la modification spatio-temporelle de voies de signalisation biologiques. Autre [cond-mat.other]. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112136 . tel-01089022

HAL Id: tel-01089022

<https://theses.hal.science/tel-01089022>

Submitted on 1 Dec 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.



Comprendre le monde,
construire l'avenir®

UNIVERSITÉ PARIS-SUD
ÉCOLE DOCTORALE : STITS
Laboratoire de *Photonique et de Nanostructures*

DISCIPLINE PHYSIQUE

THÈSE DE DOCTORAT SUR TRAVAUX

soutenue le 19/07/2013

par

Elsa Mazari

**Microsystèmes magnétiques et électriques pour la
modification spatio-temporelle de voies de
signalisation biologiques**

Directeur de thèse :
Co-directrice de thèse :

Charlie Gosse
Aitana Perea-Gomez

Chargé de recherche
Chargée de recherche

Composition du jury :
Présidente du jury :

Anne-Hélène Monsoro

Directrice de recherche

Rapportrices :

Antigoni Alexandrou
Séverine Le Gac

Directrice de recherche
Professeur associée

Examinatrice :

Marie-Pierre Rols

Directrice de recherche

Membres invités :

Zoher Gueroui
Valérie Marchi

Chargé de recherche
Directrice de recherche

Résumé

Les voies de signalisation exercent à l'échelle moléculaire un contrôle spatio-temporel précis sur de nombreux processus cellulaires. Par exemple, à l'échelle d'un organisme en développement, ces réseaux complexes d'interaction opèrent entre différents groupes cellulaires et établissent une régulation fine, dynamique et intégrée de multiples processus tels la spécification, la différenciation, la prolifération et la migration cellulaire. Comprendre ces phénomènes requiert d'étudier la fonction précise de ces molécules et de ces réseaux de signalisation. Il est donc nécessaire de concevoir des outils adaptés contrôlant localement l'activité de molécules de signalisation pour étudier leur implication dans la régulation de processus cellulaires fondamentaux.

Afin de développer des outils innovants pour l'étude de systèmes biologiques, nous proposons d'implémenter la technique de la relaxation chimique au sein de microsystemes. Cette approche repose sur la conception de microdispositifs dédiés qui génèrent une modulation spatio-temporelle précise de la concentration de molécules de signalisation. Une telle perturbation génère une réponse spécifique du système biologique qui livre des informations décisives quant à la dynamique des réactions et quant à l'organisation des réseaux moléculaires à l'œuvre.

Cette stratégie d'ingénierie pour l'étude de systèmes biologiques est générique et intrinsèquement multidisciplinaire. Au cours de ce travail, elle a été mise en œuvre pour deux projets collaboratifs, d'une part BioModulator à l'échelle cellulaire, et d'autre part Electromice à l'échelle d'un organisme complet. Nous avons mis nos compétences de physiciens spécialistes de micro/nanofabrication au service de l'équipe du Dr. Zoher Gueroui de l'Ecole Normale Supérieure ainsi que de l'équipe du Dr. Aitana Perea-Gomez de l'Institut Jacques Monod, ces deux équipes étudiant respectivement les processus impliqués dans l'auto-assemblage des microtubules et le développement de l'embryon précoce de souris.

Plus précisément, le projet BioModulator repose sur la génération de gradients localisés de protéines présumées régulatrices du fuseau mitotique. Pour ce faire, nous avons contrôlé la position de nanoparticules magnétiques conjuguées aux protéines essentielles à la régulation du réseau de signalisation de la protéine Ran. Cette étude s'effectue au sein d'extraits d'œufs de xénope, un système acellulaire utilisé de manière privilégiée pour l'étude de l'assemblage des microtubules. Cet environnement biochimique est localement et rapidement perturbé par la concentration magnétique des biomolécules qui stimulent ou inhibent les microtubules. Nous avons ainsi pu identifier les effets induits sur la nucléation et la croissance des microtubules et, par là même, mettre en évidence certains traits caractérisant les cascades moléculaires sous-jacentes. Cette méthode de

perturbation nous a permis de confirmer le fait que les phénomènes de réaction-diffusion sont à la base du contrôle de l'auto-organisation des microtubules.

Le projet Electromice propose l'électroporation localisée d'acides nucléiques au sein d'embryons de souris pour modifier spatio-temporellement l'expression des gènes qui régissent le devenir des cellules visées et ainsi étudier les interactions contrôlant la croissance, la migration et la spécification de différents types cellulaires. Nous avons conçu et réalisé des microsystèmes électriques dédiés aux embryons de souris aux stades post-implantatoires. Outre le développement technique de ces microdispositifs, nous avons élaboré un modèle biophysique décrivant leurs performances et nous avons établi des protocoles expérimentaux spécifiques pour parvenir à des électro-transfections reproductibles, localisées et garantissant la survie cellulaire de ces organismes délicats.

Au cours de cette thèse, nous avons donc développé des méthodologies expérimentales ainsi que des protocoles adaptés à l'utilisation d'une instrumentation miniaturisée dédiée à l'étude de systèmes biologiques multi-échelles. Enfin, nous avons pu démontrer l'efficacité ainsi que la validité d'approches collaboratives et multidisciplinaires. En effet, elles permettent à la fois l'émergence de stratégies innovantes et ambitieuses et aussi de répondre à d'importantes questions en sciences de la vie et ce, pour le plus grand profit de toutes les communautés scientifiques participant à ce type de projet.

Va, cours, vole et nous profite !

Remerciements

Mes premiers remerciements iront aux membres de mon jury. Je remercie Antigoni Alexandrou et Séverine Le Gac pour avoir accepté de juger et de corriger mon travail de thèse (dans des délais aussi courts). Je tiens aussi à remercier Marie-Pierre Rols, venue de Toulouse apporter toute son expertise en matière d'électroporation ainsi que son enthousiasme quant à mes travaux. Je suis très reconnaissante à Anne-Hélène Monsoro-Burq de son intérêt pour ce travail ainsi que de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Enfin, un grand merci à Valérie Marchi ainsi qu'à Zoher Gueroui pour avoir participé à l'écriture de ce manuscrit ainsi qu'à sa soutenance mais aussi pour leurs implications respectives tout au long de ma thèse.

Je souhaite également remercier le tandem scientifique de choc formés par mes directeurs de thèse Aitana Perea-Gomez et Charlie Gosse. Tout au long de ces quatre ans, ils ont su me laisser suffisamment de liberté tout en étant toujours présents lorsque cela était nécessaire. Avec gentillesse et convivialité, ils furent de véritables guides, modèles de rigueur et de professionnalisme, désireux de me faire partager leurs connaissances. De plus, ils n'ont cessé de me prodiguer de précieux conseils et corrections dans mes travaux et ce, jusque très tard dans la nuit. J'aimerais donc leur co-exprimer vivement ma gratitude : un grand merci à vous Aitana et Charlie !

Ma thèse m'a amené à évoluer au sein de diverses équipes, issues de divers laboratoires aux domaines de compétences scientifiques variées, mues par la volonté de travailler collectivement tout en partageant leurs savoir-faire. Je garderai de cette aventure multidisciplinaire et collaborative un souvenir ému et très agréable. En guise de préambule, j'en profite pour remercier le réseau RATP/SNCF pour m'avoir acheminé d'un lieu à l'autre et en général sans trop de retard et sans qui, je le souligne, rien n'aurait été possible durant ma thèse. Plus sérieusement, je commencerais par remercier les membres de mon équipe originelle, les «Nanoflu» du LPN. Un grand merci aux permanents, Anne-Marie Haghiri-Gosnet, Dominique Decanini (en particulier pour toutes ces commandes SU8!), Antoine Pallandre, André Estevez-Torres, Gilgueng Hwang et en dernier mais non des moindres Jean-Christophe Galas pour les discussions enrichissantes et les conseils avisés. Je n'oublie pas mes petits camarades non permanents anciens et actuels : Sébastien A, Syrine, Sébastien M, Guillaume A (parti trop vite!), Joni (arrivée un peu trop tard à mon goût), Mathieu, Sophie, Zaïd, Adhytia, Leila, Joachim, Karima ... et tous ceux que ma mémoire vacillante auraient omis. Une mention bien évidemment spéciale pour le jeune et sémillant amateur de Baron de Lestac (2009 ou 2010), le petit Hugo : bonne 3ème année ! Ensuite, je voudrais remercier l'équipe Collignon de l'IJM, mon équipe «d'adop-

tion». Cette dernière accueillit en effet nos nombreuses, délicates mais joyeuses expériences d'électroporation. Merci à Jérôme, Délara, Anne, Marieke, Costis et Ataaïllah pour m'avoir toujours fait une place, pour votre aide précieuse et pour m'avoir communiquée votre passion pour la souris. Une autre équipe «d'accueil» fût l'équipe de biophysiciens de Zohar Gueroui à l'Ecole Normale Supérieure. Plus particulièrement, je tiens à remercier Céline avec laquelle les manips étaient un réel plaisir à la frontière entre résultats scientifiques stimulants et bonne humeur ! Je n'oublie pas l'équipe de sympathiques chimistes rennais de l'Institut des Sciences Chimiques dirigée par Valérie Marchi. Bon courage à Cyrille et à Thomas (et à Valérie) pour leurs thèses respectives et bravo à Marie pour la sienne !

Evidemment, les microsystèmes magnétiques comme électriques conçus durant ma thèse n'ont pu être produits que grâce à la centrale technologique du LPN. Cette structure importante ne tourne pas toute seule et je souhaite remercier l'ensemble des personnes travaillant au bon fonctionnement de la salle blanche tout en restant disponibles mais aussi en distillant une atmosphère conviviale. Merci donc à Laurence, Christophe R, Sophie, Xavier, Nathalie, Edmond, Laetitia, David, Antonella, Christian, Anne, Kamel, Ali, Jean-Claude... J'ai bien sûr été amenée à importuner certains plus que d'autres notamment Laurent Couraud que je remercie pour les très nombreuses métallisations et doucement sur le sirop Canadou. Monsieur Guilet, merci pour... l'eau de Salau ou les conseils photos, j'avoue ne pas avoir trouvé de raison professionnelle ! Et aussi, un grand merci à l'ineffable Monsieur D', membre actif depuis 19.. super-ingénieur spécialisé dans le conseil en litho, en chimie, en métallisation, microscopie électronique... en bref opérationnel sur (presque) tous les postes de la salle blanche et ce, assorti d'une petite anecdote truculente remarquablement contée. En parlant de microscopie électronique, je ne peux pas ici oublier de mentionner Ludovic (bien qu'il soit un habitant du D2...) qui m'a fait découvrir avec bonne humeur la puissance ainsi que les joies du STEM-HAADF.

Bien-sûr, j'ai eu l'occasion de croiser dans les couloirs du LPN d'autres personnages qu'il me faut impérativement citer. Tout d'abord, merci et un grand bravo (pour son poste !) à Lina avec qui partager le bureau depuis mon arrivée fût un réel plaisir ! Ensuite, une pensée émue pour Alzira, toujours à l'écoute ! Je vais aussi citer une tribu rivale quant à l'occupation de territoire en salle blanche, à savoir les «Phydis». Nicolas, Emilie, Christelle, Clément et Inès bien sûr, je vous souhaite maintenant le meilleur pour la suite de votre parcours scientifique ! Mais aussi, je n'oublie pas le très fameux club des 5 (et ses non moins fameux pique-nique gastronomiques) malheureusement dissout en 2012 pour cause de départs simultanés de Papi et Mamie (qui fût plus exactement une véritable mère pour moi !). Merci à toi Luc d'être resté et de m'avoir fait

découvrir la Pataterie ! Enfin, comment oublier de remercier les Klearia pour nos midis animés et caustiques à la Sodexo mais aussi pour leur soutien ainsi que leur écoute ! Merci donc à toi Greg (mon petit préféré !), Kool-Shen Guillaume (mon autre petit préféré !) et... même à toi Clément ! Je vous souhaite sincèrement à tous les trois abondance, paix et prospérité !

Je souhaite encore remercier vivement Gaële Perrusson et Arnaud Bournel pour leur disponibilité, leur aide ainsi que leur encadrement au cours de mes activités de monitrice exercées à l'IEF de l'Université Paris XI. Une pensée aussi pour Abelin avec lequel les préparations des TP électronique de L3 furent pour le moins festives !

Il est grand temps de remercier pour leurs continuels encouragements, leur écoute patiente ainsi que leur indulgence pendant les moments de stress, ma famille. Les frérots (dans l'ordre d'arrivée : Robert, François et Axel), mes neveux préférés Linnka et Tinnlay (continuez à bien travailler à l'école !), Nadia, Sarah, Christine, Pascal, Marélie, Denise, Pierre et bien évidemment Maman ! Les efforts familiaux ont aussi été heureusement relayés et soutenus par une équipe d'amis volontaires et dynamiques : Christophe, Marie, Arnaud (et le petit Louis), Aymeric, Sophie, Grégory, Mathieu, Agnès, Stéphane, Vincent, Pascal (dont les plaintes répétées quant au manque de nouvelles données ont été enregistrées), Pauline, Marion, Hanh, Emma... j'en oublie très certainement cependant il n'en demeure pas moins : merci à tous !

Enfin, il m'est très difficile de décrire la reconnaissance, l'estime et la joie que j'éprouve à l'encontre de 4 personnes qui m'ont accompagné quotidiennement durant ces quatre années. Une fois n'est pas coutume, je commencerais par Pierre-Antoine, ma tendre moitié, mon amour, mon associé, ma lumière stellaire éternelle, réincarnée, cosmique et phénoménale ! Ensuite, ce sont 2 ravissantes et merveilleuses jeunes filles. Pêle-mêle : un tonnerre de mercis à Xuan Zhao, la pékinoise déjantée, amie éperdument dévouée, déraisonnablement laborieuse, et follement délirante, une tornade de remerciements à Anne-Claire Louër que le monde entier nous envie pour sa générosité, son charisme, son professionnalisme, son sens de l'humour, son dynamisme, sa bonne humeur, sa cordialité, sa famille accueillante... et oui même son joli grain de voix ! Et, je prie une certaine Christelle Durand d'agréer mes salutations sincères et distinguées.

Ultimement, je te remercie, ô toi lecteur, qui prend le temps de lire ce texte. Je ne peux d'ailleurs que vivement t'encourager, le plus dur de la lecture étant déjà fait, à dévorer le reste du manuscrit qui est le fruit de la participation de toutes les personnes susnommées.

Table des matières

I	Introduction générale	12
1	Méthodologie d'étude des processus biologiques	13
1.1	Biologie des systèmes	13
1.1.1	Cadre et objectifs	13
1.1.2	Objets d'étude	15
1.2	Approches perturbatives	16
1.2.1	Considérations générales	16
1.2.2	Application aux systèmes à deux états	19
1.2.3	Principes et mise en œuvre en sciences de la vie	23
1.2.4	Exemples de techniques existantes	24
2	Ingénierie de la génération de stimuli spatio-temporels	28
2.1	Microsystèmes dédiés à la biologie	28
2.1.1	Historique	28
2.1.2	Spécificités	29
2.2	Démarche guidant conception et validation	31
2.3	Enjeux collaboratifs	32
2.4	Enjeux de formation	34
II	Microsystèmes magnétiques pour la modification spatio-temporelle du réseau de signalisation Ran	35
1	Contexte scientifique	37
1.1	Le fuseau mitotique	37
1.1.1	Aspects structuraux	37
1.1.2	Mécanismes d'assemblage	41
1.1.3	Processus de régulation	44
1.2	Structure et objectifs du projet	48
1.2.1	Nanocargos magnétiques et fluorescents pour l'étude de mécanismes cellulaires	49

1.2.2	Systèmes acellulaires	50
1.2.3	Modulation de la concentration de nanocargos par application d'un champ magnétique	51
1.2.4	Observation de la réponse biologique	55
1.2.5	Modèle de réseaux de réactions chimiques	55
2	Résultats	59
2.1	Préparation des nanocargos biofonctionnalisés	59
2.1.1	Les nanocargos	59
2.1.2	Les nanobilles superparamagnétiques	63
2.1.3	La fonctionnalisation des nanobilles par les protéines Ran et RCC1	66
2.1.4	Les stratégies mises en œuvre	68
2.2	Spatiotemporal control of microtubule nucleation and assembly using magnetic nanoparticles	70
2.3	Magnetic control of protein spatial patterning to direct microtubule self-assembly	112
3	Discussion et perspectives	128
3.1	Discussion	128
3.2	Perspectives	130
3.2.1	Une approche générique	130
3.2.2	Applications potentielles	130
III	Microsystèmes électriques pour la modification spatiotemporelle de la concentration à l'échelle d'un tissu en développement	132
1	Cadre et problématique	133
1.1	L'embryon précoce de souris, un ensemble cellulaire en développement	133
1.1.1	Contexte et enjeux	133
1.1.2	Événements morphologiques	134
1.1.3	Spécification et régulation des destins cellulaires	136
1.1.4	Principales techniques de perturbations localisées appliquées aux embryons de souris	140
1.2	L'électroporation : une technique robuste, courante et efficace	143
1.2.1	Présentation de la technique pour des cellules en culture	143
1.2.2	Effets d'un champ électrique sur des cellules	147
1.2.3	Applications de la méthode	152

1.3	Méthodologie implémentée	156
2	Résultats	157
2.1	Optimisation de la conception	157
2.1.1	Génération d'un champ électrique localisé adapté aux embryons à stade précoce	157
2.1.2	Les microsystèmes successifs	158
2.1.3	Les divers matériaux employés	160
2.2	Optimisation du design	162
2.2.1	Modèle électrique utilisé et indicateur de performances	162
2.2.2	Simulations numériques	163
2.3	Optimisation des protocoles	169
2.3.1	Utilisation de marqueurs fluorescents	169
2.3.2	Recherche de conditions électriques satisfaisantes	171
2.4	A new microsystem for efficient and reproducible local electroporation of early post-implantation mouse embryos	176
3	Perspectives	219
3.1	Perspectives technologiques	219
3.2	Perspectives en biologie du développement	220
3.2.1	Lignage du DVE	220
3.2.2	Mécanismes de migration du DVE	223
IV	Conclusion générale	225
1.0	Une approche conceptuelle	226
1.0.1	Des outils dédiés	226
1.0.2	Une méthode générique	226
2.0	Une approche collaborative enrichissante	227
2.0.1	Savoir-faire	227
2.0.2	Organisation	227
3.0	Récapitulatif	227
V	Annexes	229
1	Annexe 1. Travaux additionnels réalisés avec l'équipe de V. Marchi de l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes	230
1.1	Three-Dimensional Self-Assembling of Gold Nanorods with Controlled Macroscopic Shape and Local Smectic B Order	230
1.2	Peptidic ligands to control the three-dimensional self-assembly of quantum rods in aqueous media	241

2	Annexe 2. Microsystèmes magnétiques pour la modification spatiotemporelle du réseau de signalisation Ran	259
2.1	Annexe 2.A. La méthode de Debye-Scherrer	259
2.2	Annexe 2.B. Caractérisation magnétique de nanobilles superparamagnétiques	263
2.2.1	Propriétés magnétiques	263
2.2.2	Calcul de susceptibilité magnétique	263
2.2.3	Conclusions	265
2.3	Annexe 2.C. Les aimants	267
2.3.1	Calcul semi-analytique de l'induction magnétique produite par des aimants permanents	267
2.3.2	Mesure de l'induction magnétique	271
2.3.3	Comparaison des données théoriques et expérimentales	272
2.4	Annexe 2.D. Approche d'un aimant permanent à proximité d'une suspension de nanobilles superparamagnétiques. Considérations théoriques	274
2.4.1	Principe	274
2.4.2	Considérations générales	274
2.4.3	Applications	282
2.5	Annexe 2.E. Approche d'un aimant permanent à proximité d'une suspension de nanobilles superparamagnétiques. Simulations par éléments finis	286
2.5.1	Elaboration	286
2.5.2	Validation	288
2.5.3	Simulations complémentaires	295
3	Annexe 3. Microsystèmes électriques pour la modification spatiotemporelle de la concentration à l'échelle d'un tissu en développement	299
3.1	Annexe 3.A. Protocole de fabrication du microsystème de première génération	299
3.2	Annexe 3.B. Protocole de fabrication du microsystème de deuxième génération	302
3.3	Annexe 3.C. Protocole de fabrication du microsystème de troisième génération	307

Première partie

Introduction générale

Chapitre 1

Méthodologie d'étude des processus biologiques

Au cours de cette thèse, nous voulons mettre en évidence et analyser les mécanismes exercés par des réseaux moléculaires de régulation sur des processus cellulaires spécifiques. Notre première étude se concentrera, à l'échelle intracellulaire, sur la compréhension des mécanismes moléculaires fondamentaux nécessaires à l'auto-assemblage du fuseau mitotique lors de la division cellulaire. La seconde étude présentée dans ce travail concerne la régulation dynamique, fine et précise, mise en jeu entre divers groupes cellulaires au cours du développement embryonnaire précoce.

Comprendre ces phénomènes requiert l'étude de la fonction des molécules de signalisation et des réseaux qu'elles constituent. A ce titre, un domaine de recherche, appelé biologie systémique, ou biologie des systèmes, tente, à l'aide d'outils conceptuels issus de la physique théorique (physique statistique, physique non linéaire), des mathématiques (approche logique, processus de Markov), ou de l'informatique (algorithmes génétiques), de mieux comprendre l'organisation spatio-temporelle du vivant et notamment ce qui touche aux réseaux de régulation. Cette discipline va donc nous renseigner quant aux méthodologies pertinentes d'étude de tels processus dynamiques.

1.1 Biologie des systèmes

1.1.1 Cadre et objectifs

La biologie des systèmes se concentre sur l'étude des organismes vivants en apportant, par des interactions transdisciplinaires, une vision intégrée de leur fonctionnement. La biologie systémique propose, entre autres, la compréhension de l'émergence de phénomènes complexes à partir des propriétés dynamiques de réseaux de réactions chimiques dans lesquels sont impliquées diverses bio-

molécules. Les systèmes biologiques sont formés par des entités variées : des métabolites, des macromolécules, des cellules, des organes et/ou encore des organismes. Pour étudier les processus biologiques, deux approches majeures se sont développées parallèlement [1, 2]. L’une, impulsée par le développement de la génomique, de la protéomique et de la bioinformatique, analyse et interprète des données produites par des expériences réalisées à haut-débit. L’autre, analyse la dynamique de processus biologiques particuliers, à partir de données qualitatives et quantitatives généralement issues d’expériences à petite échelle. Ces deux approches conjointement implémentées sont essentielles pour considérer les niveaux d’organisations multi-échelles s’influençant réciproquement propre, aux structures des systèmes vivants [3, 4].

De nombreux travaux illustrent l’idée qu’une assemblée d’éléments simples en interaction locale peut produire de riches structures spatio-temporelles. Par exemple, citons la «théorie générale des systèmes» qui se concentre sur les relations entre les éléments constitutifs plutôt que sur leurs spécificités individuelles [5] ou encore l’étude de systèmes numériques discrets appelés «automates cellulaires» [6]. Les données collectées grâce à des expériences à haut-débit permettent l’étude des propriétés des éléments lorsqu’ils sont intégrés dans un ensemble. Une telle démarche apporte une vision globale des phénomènes et fournit des informations quant aux divers composants impliqués [1, 2]. De manière complémentaire, les approches menées à petite échelle s’attachent à décrire les mécanismes élémentaires impliqués dans un processus biologique pour tenter d’expliquer comment des propriétés globales peuvent émerger [1, 2].

Au cours de ce travail, nous nous concentrerons sur ce dernier type d’approches. En fait, à l’échelle cellulaire et subcellulaire, bien que la majeure partie des acteurs moléculaires impliqués au sein de processus biologiques soit connue, l’organisation et la régulation spatio-temporelles de ces acteurs le sont beaucoup moins. Peu d’informations sont disponibles sur la cinétique d’assemblage et l’architecture des complexes macromoléculaires, l’intensité des boucles de rétroaction, ou encore sur la régulation spatiale des interactions.

L’accès à une compréhension fine à l’échelle moléculaire des réseaux d’interactions de réactions chimiques constitue un enjeu important pour la biologie. Il s’agit de fonder une description formelle de la régulation des processus biologiques sur des mesures ainsi que des observations acquises à partir de réponses précises et spécifiques collectées aux échelles spatio-temporelles adéquates. Pour ce faire, il est intéressant de considérer les processus biologiques, du fait de leur caractère dynamique et multi-échelle, comme des systèmes complexes.

1.1.2 Objets d'étude

Un système complexe est décrit abstraitement comme un ensemble d'éléments de même nature, structuré par des interactions. Ce type de système englobe une variété d'ensembles : des réseaux de neurones en passant par les réseaux métaboliques jusqu'aux réseaux de distribution électrique (EDF).

L'étude des systèmes complexes de régulation repose sur la théorie des systèmes dynamiques [7] et son complément, la théorie des systèmes complexes [8]. Ces théories expliquent comment, à partir d'interactions connues entre les éléments d'un système évoluant au cours du temps (organes, protéines,...), apparaissent des états stables, autour de points de fonctionnement, dits «attracteurs». Il s'agit des états visibles phénotypiquement, quelles que soient les conditions initiales du système, dans la mesure où celles-ci sont situées dans un ensemble de perturbations admissibles de l'attracteur.

De plus, les états attracteurs doivent être sensibles aux réseaux d'interactions qui constituent le système. Cependant, ils doivent aussi être robustes pour résister aux perturbations de l'environnement sur l'architecture des interactions [9, 10]. Cette robustesse est une propriété critique notamment lorsque le processus biologique considéré est essentiel pour la survie, par exemple dans le cas du contrôle de la morphogenèse par des facteurs de transcription [11]. La co-existence dans un même système multi-échelle de sensibilités et de robustesses à différents types de perturbations est ainsi une des caractéristiques des systèmes complexes.

Les composants d'un système complexe sont autant de systèmes dont les dynamiques sont couplées et dont les échelles de temps sont différentes. Certaines de ces dynamiques n'atteindront pas leur point de fonctionnement stationnaire pendant le temps caractéristique du système dans son ensemble. Par ailleurs, celles qui l'atteignent ou qui pourraient l'atteindre sortent fréquemment de leur état d'équilibre ou de leur trajectoire sous l'effet du couplage avec les autres composants ou sous l'effet de perturbations exogènes. Le système global contient ainsi en permanence des sous-systèmes en phase transitoire. Un défi de taille est donc la compréhension des états transitoires des systèmes dynamiques en situation isolée comme sous-parties de systèmes multi-échelles. Le caractère multi-échelle et souvent aléatoire des systèmes complexes nécessite des approches en analyse de sensibilité adaptées.

Plus précisément, nous nous intéressons à l'étude de mécanismes impliqués dans la régulation de processus cellulaires. Ces mécanismes sont en interaction permanente avec de nombreux stimuli provenant du monde extérieur qui peut être représenté comme un ensemble de paramètres de contrôle. En outre, leurs dynamiques sont en concurrence permanente puisqu'ils sont en contact avec de

multiples autres mécanismes évoluant en parallèle. Globalement, seules les dynamiques robustes face aux perturbations peuvent être observées. Puisque la robustesse des réseaux biologiques limite leur réponse à certains stimuli, l'influence de ces derniers sur les processus cellulaires étudiés peut être «gommée», ce qui restreint le nombre de paramètres sur lesquels nous pouvons agir à des fins d'intervention, de contrôle ou de régulation. Il s'agit donc de définir des méthodologies expérimentales innovantes pour permettre la génération d'une perturbation adaptée influençant la dynamique du système de manière significative et spécifique.

1.2 Approches perturbatives

Soumettre un système d'étude à une stimulation précise afin de comprendre son fonctionnement est une démarche adoptée dans bien des domaines scientifiques. Plus précisément, l'analyse de la réponse du système à la modification d'un paramètre de contrôle permet de poser des hypothèses sur les mécanismes à l'œuvre.

1.2.1 Considérations générales

Une telle stratégie s'inscrit dans la lignée des techniques de perturbations (Fig.1.1). Selon la nature de la perturbation appliquée, l'analyse de la réponse peut se faire dans le domaine temporel ou dans le domaine fréquentiel.

Dans le domaine temporel, suite à l'application d'impulsions ou de marches, la réponse présente les variations du signal physique au sein de fenêtres de temps acquises de manière séquentielle (Fig.1.1b). Maintenant, si la source d'excitation est modulée dans le temps, la réponse peut être acquise dans le domaine fréquentiel (Fig.1.1c). La représentation de la réponse est alors donnée selon deux composantes : l'amplitude et la phase en fonction de la fréquence . En principe, ces deux techniques sont équivalentes et donnent accès au même type d'informations, ces dernières étant reliées par une transformée de Fourier. Cependant, les techniques expérimentales utilisées et les données acquises ne sont pas de même nature. En outre, l'analyse de ces données est formellement différente.

Pour illustrer notre propos, nous prendrons l'exemple de la microscopie de fluorescence résolue dans le temps (Fluorescence Life-time Imaging Microscopy FLIM) . En effet, pour cette technique d'imagerie, les mesures peuvent être effectuées dans le domaine temporel et dans le domaine fréquentiel [14, 13]. Il s'agit, suite à une excitation lumineuse, de déterminer le temps de vie de fluorescence d'un fluorophore (grandeur de l'ordre de plusieurs ns). Historiquement, c'est dans le domaine fréquentiel qu'ont été réalisées les premières mesures, l'utilisation de sources lumineuses modulées ayant été maîtrisée bien avant [12]

l'apparition des sources impulsionnelles ultrabrèves adaptées à ce type de mesure.

Une acquisition FLIM dans le domaine fréquentiel repose sur l'utilisation d'une excitation lumineuse modulée qui se traduit par des changements de l'amplitude ainsi que de la phase de l'onde émise par l'échantillon renseignant quant à son temps de vie caractéristique [42, 43]. Ces paramètres sont enregistrés en mettant en œuvre des stratégies de détection similaires à celles des amplificateurs à détection synchrone (Phase Sensitive Detection, PSD) [23, 30, 33]. De façon analogique, ceci se traduit par une augmentation du rapport signal sur bruit. Pour une acquisition dans le domaine temporel, l'excitation de l'échantillon par une impulsion lumineuse (de l'ordre de la ps voire fs) produit un déclin de fluorescence qui est enregistré notamment par la méthode de comptage de photon unique corrélé (Time-Correlated Single-Photon Counting TCSPC) [15, 16].

Par le biais de cet exemple, il semble que les techniques dans le domaine fréquentiel nécessitent un traitement des données plus lourd que dans le domaine temporel. Cependant, lorsque des verrous technologiques empêchent la génération d'un stimulus temporellement adapté sur le système considéré (cas des sources pour le FLIM), un stimulus modulé peut permettre d'appliquer une perturbation spécifique et pertinente. En outre, l'analyse de la réponse spectrale apporte une détection fine de la réponse du système (problème d'une éventuelle réponse impulsionnelle de la détection pour l'acquisition dans le domaine temporel pour le FLIM). Elle permet en effet un enregistrement des contributions les plus faibles ou des contributions les plus rapides mais aussi une interprétation de signaux de réponse non linéaires [17, 23, 30].

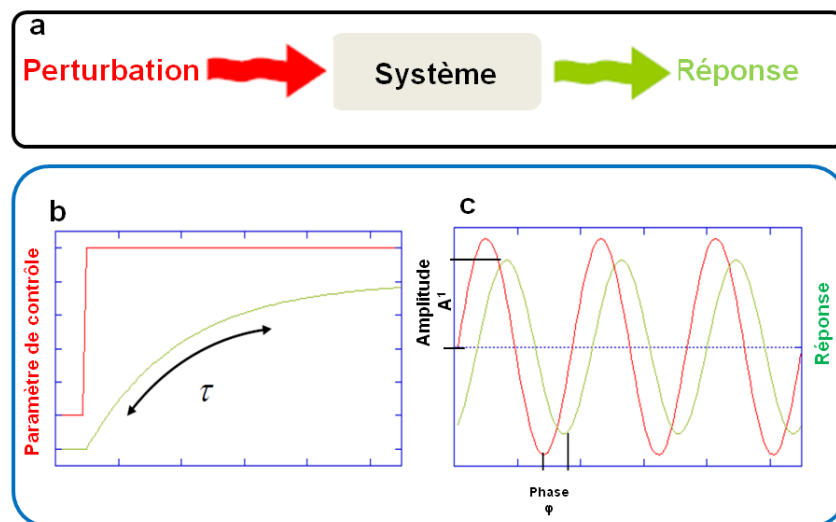


FIGURE 1.1 – Approche perturbative. (a) Représentation schématique. (b) Application dans le domaine temporel. (c) Technique implémentée dans le domaine fréquentiel.

1.2.2 Application aux systèmes à deux états

Considérons une réaction de titration mettant en jeu une espèce A_1 réagissant avec une sonde P pour donner le produit de réaction A_2 :



k_+^P et k_- sont respectivement appelées les constantes cinétiques d'association et de dissociation de la réaction. Si l'espèce P est introduite en large excès et sa concentration reste approximativement constante, le mécanisme 1.2 est un échange entre les deux états A_1 et A_2 .



$k_+ = k_+^P [P]$ est alors la nouvelle constante cinétique d'association. Les techniques de relaxation chimique permettent de révéler la dynamique d'une réaction chimique.

Mesures cinétiques et analyse de mécanismes

La relaxation chimique correspond au réajustement d'un système de réactions chimiques réversibles écarté de l'équilibre. Ces méthodes développées dans les années 1950 ont permis l'analyse de la vitesse des réactions rapides ou ultra-rapides [20]. Eigen a été le premier à mesurer le temps de dissociation de l'eau (inférieur à 10^{-6} s) et à rapporter des constantes cinétiques de transferts de protons contrôlés par la diffusion (environ $10^{11} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Les techniques expérimentales actuelles reposent généralement sur des analyses spectroscopiques comme la résonance magnétique nucléaire [21, 22], la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) [23] ou la spectrofluorométrie [21, 24].

Concernant les stimuli appliqués, ils sont de natures diverses. Des études rapportent l'utilisation de sauts de température [21, 25, 26, 27, 28], de pression [21, 25, 26, 28] ou de pH induit par un laser [29]. Ces analyses permettent de mesurer des cinétiques de réaction correspondant à des temps de relaxation inférieurs à la microseconde jusqu'à quelques jours.

De la même façon que pour ce qui a été présenté dans le cas du FLIM, le système de réaction chimique peut être maintenu dans un état hors-équilibre par une perturbation périodique qui fait varier de manière continue l'avancement de la réaction [25, 26]. La réponse chimique est alors caractérisée par le couplage entre l'excitation et le système. Elle dépend fortement de la fréquence d'excitation. L'analyse des fonctions de transfert fournit les constantes de temps

caractéristiques de la réaction étudiée [30, 43, 41] et livre alors des informations quant aux mécanismes impliqués dans la réaction [31, 32] (Fig.1.2). Par l'intermédiaire d'une modulation lumineuse, certains révèlent ainsi des phénomènes photophysiques ou photochimiques [31, 32] ou par l'intermédiaire d'une modulation thermique, d'autres mettent en évidence des interactions moléculaires [30, 33, 41].

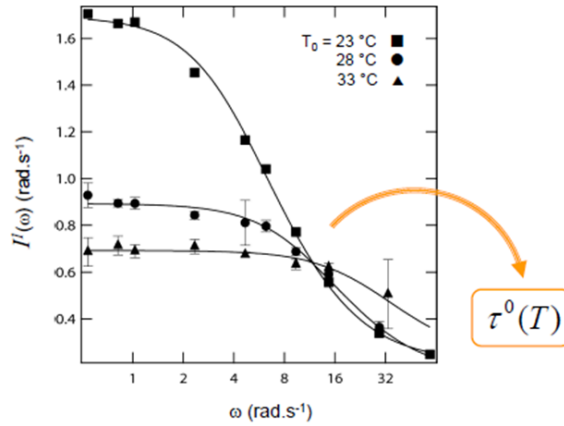


FIGURE 1.2 – Perturbation périodique d'une réaction de type $A_1 \rightleftharpoons A_2$ par une excitation thermique telle que $T = T_0 [1 + \beta \sin(\omega t)]$ (avec β très inférieur à 1). Le module I^1 , qui définit l'intensité du signal rapportant sur l'avancement de la réaction, de la fonction de transfert d'un système de réaction chimique en fonction de la pulsation est recueilli au voisinage de trois températures moyennes T_0 distinctes. $\tau^0 = 1/(k_+^0 + k_-^0)$ est le temps de relaxation de la réaction chimique. En connaissant la constante d'équilibre, K^0 à T_0 égale à k_+^0/k_-^0 , il est possible d'extraire les constantes cinétiques k_+^0 et k_-^0 associées. D'après [41].

Détection résonnante

Les techniques de relaxation trouvent des applications prometteuses en biologie et plus précisément pour la caractérisation d'échantillons. Les mélanges biologiques complexes sont constitués d'une grande variété de molécules présentes en solution dans une large gamme de concentrations. Dans ces conditions, une technique qui permet l'analyse qualitative ainsi que quantitative de ces échantillons est une gageure.

D'un côté, l'analyse spectroscopique d'espèces cibles au sein d'un mélange où toutes les molécules partagent des motifs fonctionnels similaires (comme des bio-polymères par exemple) est presque impossible, une signature spectrale commune empêchant la quantification individuelle des différentes espèces. D'un autre côté, l'identification d'analytes reposant sur l'équilibre d'une réaction de titration cible-sonde est délicate à implémenter. La spécificité doit en effet être assurée par des constantes d'affinités nettement différentes entre des espèces

interférentes et la cible. Ceci est difficilement permis au sein de mélanges de composants structurellement proches. Une identification plus spécifique de la molécule cible doit être obtenue en exploitant les propriétés cinétiques de la réaction de titration mise en jeu.

Lorsqu'un forçage périodique en utilisant la température comme paramètre de contrôle de l'avancement de la réaction est appliqué, il est possible d'optimiser la sélectivité de la réponse. Plus exactement, il s'agit d'exciter sélectivement les «fréquences moyennes» de la réaction qui sont définies par les constantes cinétiques. La dépendance des amplitudes d'oscillations en fonction des paramètres thermodynamiques et cinétiques révèle un comportement singulier du système chimique en régime harmonique : la réponse en quadrature à une modulation de température présente ainsi un maximum absolu pour un couple unique de constante thermodynamique K^0 et de temps de relaxation τ^0 (Fig.1.3). L'augmentation du nombre de paramètres chimiques de sélection (par les deux constantes cinétiques de la réaction) accroît donc la sélectivité réactionnelle. Cette technique a ainsi été appliquée avec succès à l'analyse chimique quantitative au sein de mélanges complexes [41].

De plus, selon des principes similaires, l'utilisation de champs alternatifs en électrophorèse a les mêmes effets sur la qualité de la séparation d'espèces ayant des réactivités différentes [38, 39, 40].

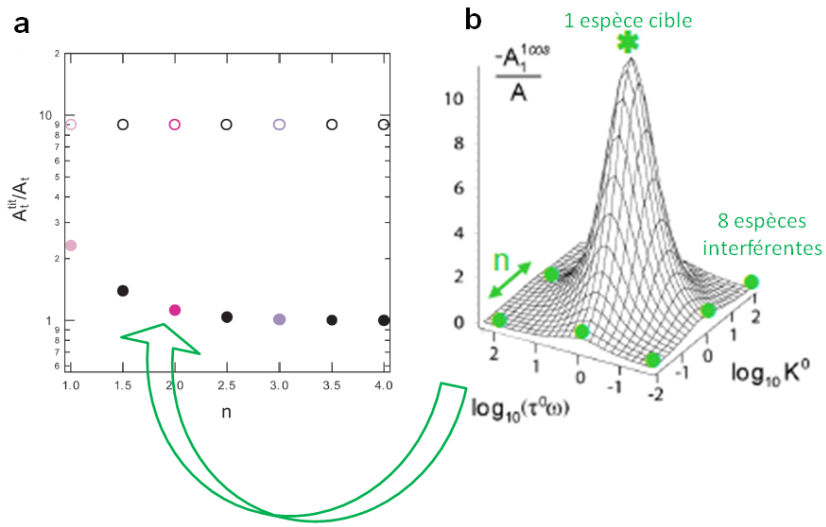


FIGURE 1.3 – Détection résonnante par excitation thermique (a) Rapport théorique de la concentration d'espèces cibles titrée A_t^{tit} sur la concentration effective d'espèces cibles A_t . La méthode de titration à l'équilibre, représentée par les cercles vides, et celle en détection résonnante par modulation thermique, figurée en cercles pleins, sont comparées pour 7 mélanges équimolaires distincts notés n . Chacun des mélanges comprend le système à deux états considéré ainsi que 8 autres couples interférents. Le paramètre n est lié à la distance séparant le couple cible des interférents. (b) Réponse théorique d'une réaction d'échange $A_1 \rightleftharpoons A_2$ soumise à une excitation thermique périodique. Les amplitudes des oscillations en quadrature pour la concentration en espèce A_1 sont représentées en fonction de la constante d'équilibre K_0 et du temps de relaxation adimensionné $\tau^0 \omega$. Réalisé d'après [41].

1.2.3 Principes et mise en œuvre en sciences de la vie

L'étude d'architectures de réseaux de réactions chimiques peut être effectuée en ayant recours aux techniques de relaxation. C'est donc cette stratégie de perturbation à des échelles spatio-temporellement adaptées à nos systèmes biologiques que nous avons choisie d'implémenter au cours de ce travail.

L'application de stimuli par une instrumentation dédiée correspond en fait à induire la variation locale d'un paramètre donné à l'échelle cellulaire voire intracellulaire. Cette perturbation place alors le système étudié en régime transitoire, ce qui permet de comprendre la manière dont il recouvre un état stationnaire. En outre, le temps de réaction du processus biologique considéré est important : la perturbation est nécessairement plus rapide que le phénomène à observer. La génération de stimuli doit être parfaitement contrôlée aussi bien dans l'espace que dans le temps.

Dans ces conditions, l'étude de la réponse du système biologique à la perturbation permet de disséquer la régulation fine, dynamique et intégrée des processus cellulaires. Plus exactement, l'analyse de la réponse à la perturbation permet d'arbitrer entre les différentes hypothèses en compétition concernant les mécanismes moléculaires impliqués.

De telles méthodes de perturbation ont déjà été implémentées en biologie des systèmes. La méthodologie originale introduite par cette discipline est définie par un aller-retour permanent entre expérimentation, modélisation théorique ainsi que computationnelle, formulation de nouvelles hypothèses et développement technologique. Plus particulièrement, la stratégie de perturbation consiste en un processus itératif [36, 37] que nous avons adapté à l'étude de processus cellulaires qui nous préoccupent dans ce travail :

- 1- Définir les composants d'un processus biologique et collecter des données globales par l'intermédiaire de recherches bibliographiques
- 2- Intégrer ces connaissances pour formuler un modèle initial du système étudié
- 3- Perturber systématiquement le processus, lors d'expériences mais aussi de simulations, et analyser les résultats
- 4- Comparer les réponses observées à celles prédites par le modèle
- 5- Affiner le modèle pour que ses prédictions se rapprochent des observations expérimentales
- 6- Concevoir et tester de nouvelles perturbations expérimentales permettant d'arbitrer entre différentes hypothèses en compétition
- 7- Répéter le processus jusqu'à la validation du modèle par accord avec les résultats expérimentaux

Ajoutons que la reproductibilité des expériences, parfois délicate à obtenir,

est ici un pré-requis indispensable. Par ses itérations répétées, cette démarche prend en compte la variabilité intrinsèque que possède le vivant.

1.2.4 Exemples de techniques existantes

Les biologistes disposent d'un arsenal de techniques «classiques» de perturbations des systèmes vivants telles que la mutagénèse, les greffes ou ablations de cellules ou de tissus, les approches pharmacologiques. Il ne s'agit pas dans ce paragraphe de décrire l'ensemble des méthodes perturbatives propres à la biologie expérimentale. Du fait de notre approche interdisciplinaire, nous allons nous concentrer sur des exemples d'applications fédérant les activités de diverses disciplines scientifiques. Par ailleurs, nous étudierons des processus cellulaires requérant le développement de méthodes adaptées à la perturbation d'un groupe de cellules, d'une cellule ou de composants à l'intérieur de la cellule.

Dans ces conditions et à ces échelles, diverses méthodes de génération de stimuli ont été développées. Comme déjà évoqué, la perturbation peut être une variation contrôlée de température [41, 44] ou encore de concentration [45, 46, 48]. Devant la variété d'approches, nous avons choisi de présenter des techniques de perturbations optiques pour les applications prometteuses qu'elles augurent, ainsi que des techniques électriques et magnétiques puisqu'elles sont implémentées au cours de ce travail. Cette présentation ne prétend en aucun cas à l'exhaustivité, ni au détail biologique le plus fin. En outre, du fait de leur transversalité, certaines techniques de perturbations seraient inclassables au sein de notre liste d'applications de techniques. Citons par exemple, les systèmes «heat shock» qui reposent sur l'utilisation de promoteurs du même nom qui vont être induits par l'intermédiaire d'un choc thermique. L'élévation de température est alors obtenue de façon ciblée à l'échelle cellulaire en focalisant un faisceau laser [34].

Nous avons choisi de classer ces méthodes suivant la nature de l'actionnement appliqué. Il s'agit de ne pas confondre le moyen d'appliquer la perturbation avec la perturbation elle-même. Par exemple, l'application d'un champ électrique peut permettre l'actionnement dirigé de fluides par électroosmose, et ce phénomène peut conduire à la pré-concentration de cellules sur une surface contrôlée [52]. L'actionnement est donc ici électrique et la perturbation est en concentration. De même, au cours de ce travail, nous avons recours à des actuateurs magnétiques ou électriques pour perturber la concentration de biomolécules.

Actionnement optique

Le recours aux lasers délivrant des impulsions ultra brèves (femtosecondes) dans le proche infrarouge (compris entre 700 et 1200 nm) a notamment donné lieu aux premières expériences de phototransfection. Le faisceau laser perce la membrane plasmique ce qui permet l'introduction d'acides nucléiques au sein de cellules uniques [59]. Par cette technique, des régions sub-cellulaires dans le cas de neurones peuvent aussi être ciblées [58]. De plus, la substitution d'une excitation en régime continu de l'échantillon par un train d'impulsions femtosecondes permet d'appliquer une intensité lumineuse élevée (pendant les impulsions) tout en limitant l'énergie reçue.

En outre, du fait de leur caractère non invasif, les techniques impliquant une perturbation lumineuse sont intéressantes. Elles fournissent aussi une résolution spatiale égale à la limite de diffraction. Dans ces conditions, des biomolécules aux propriétés optiques remarquables ont été élaborées. Nous distinguons ici deux catégories d'outils : ceux reposant sur l'ingénierie génétique de protéines photosensibles et ceux issus de la synthèse chimique. D'un côté, se trouvent donc les protéines photoactivables et les canaux photosensibles dont les activités peuvent être contrôlées localement avec de la lumière [55, 56]. Les photo-conversions sous excitation lumineuse opérées par des protéines photoactivables (par exemple *Kikume Green-Red* ou *Kaede*) exprimées par des animaux transgéniques offrent un contrôle spatio-temporel précis de la fluorescence au sein de tissus cellulaires (Fig.1.4a). Quant aux protéines-opsines (*ChannelRhodopsine 2*, *Chr2* ou *halorhodopsine*, *NpHr*), elles peuvent agir comme des canaux ioniques sensibles à la lumière dans des neurones spécifiquement ciblés (Fig. 1.4b). L'autre catégorie d'outils comprend les molécules cagées qui peuvent être activées localement mais aussi rapidement. Les composés cagés offrent en effet au système une résolution temporelle dépendant de la cinétique de la chimie de la réaction de déprotection qui peut être inférieure à la milliseconde. De telles molécules cagées ont été utilisées pour la manipulation de l'activité neuronale [60], ou encore au sein de cellules [61].

L'optogénétique combine ainsi le recours à de tels outils ainsi qu'à une lecture rapide de la réponse cellulaire face à une perturbation lumineuse localisée. Cette discipline offre alors des possibilités de photocontrôle de processus cellulaires avec une résolution spatiale et temporelle sans précédent [62].

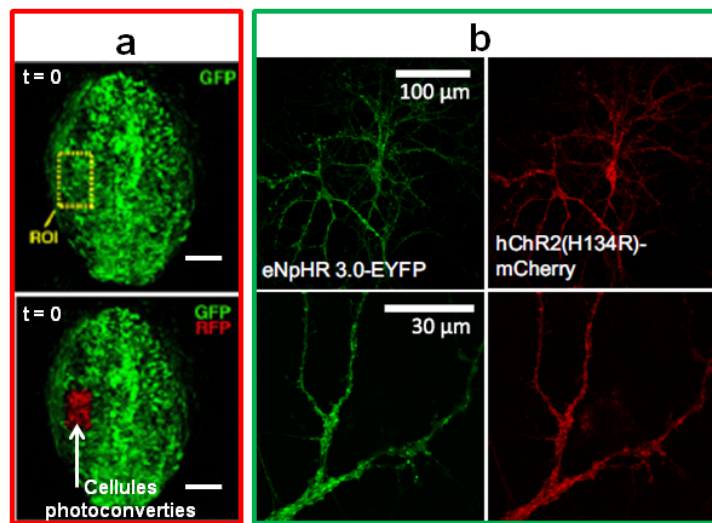


FIGURE 1.4 – Exemples d'utilisation des protéines photoactivables et photosensibles. (a) Images d'un embryon de souris transgénique à 8 jours de développement qui exprime dans ses tissus la protéine photoactivable KikGR. Cette protéine émet un signal recueilli dans les longueurs d'onde vertes. Après application d'une excitation lumineuse au niveau de la zone encadrée en orange (image du haut), les cellules de la zone sont photoconverties et émettent un signal fluorescent rouge (image du bas) [57]. Les barres d'échelle sont égales à $150\ \mu\text{m}$. (b) Images de neurones qui coexpriment les protéines photosensibles eNpHR et ChR2 [56].

Actionnement électrique

Ces méthodes sont délicates à implémenter du fait de l'importante atténuation du signal électrique généré au sein de tissus cellulaires. Elles sont toutefois utilisées de façon prépondérante en neurosciences pour manipuler l'activité neuronale.

De plus, des cellules sous l'action d'impulsions électriques contrôlées dans l'espace et dans le temps peuvent être électroporées et/ou encore, électrofusées par altération de la membrane lipidique d'un couple de cellules [347]. L'électroporation est au centre de nos travaux et nous détaillerons cette technique en partie 3.2.2.

Actionnement magnétique

Ces méthodes reposent essentiellement sur l'actuation par l'intermédiaire d'un champ magnétique de particules magnétiques. Le recours à des champs magnétiques interagissant peu avec les biomolécules tout en pénétrant efficacement au sein de tissus biologiques peut permettre une stimulation précise.

La manipulation de nanoparticules magnétiques fonctionnalisées avec une protéine d'intérêt qui est courante dans le cadre des sciences de l'imagerie ou des sciences biomédicales [67] s'est largement répandue dans divers domaines de la biologie cellulaire. Du fait de leur biocompatibilité, ces colloïdes sont devenus de véritables actuateurs induisant de manière contrôlée des signaux cellulaires avec : la génération de forces mécaniques sur une cellule [68, 69], la stimulation de récepteurs membranaires *in vitro* [66] et *in vivo* [70], la modification de la signalisation par des endosomes [71] ou encore l'activation thermique de canaux ioniques sensibles à la température [72]. De plus, une telle méthode semble convenir à la mise en place, à l'échelle intracellulaire, de gradients spatialement et temporellement maîtrisés de concentration d'une protéine d'intérêt. En effet, l'hétérogénéité spatiale dans la distribution et l'activité d'une protéine à l'échelle cellulaire joue un rôle décisif dans de nombreux processus [65]. Les particules magnétiques de taille nanométrique ont ainsi été introduites afin de créer des gradients de nanoparticules spatialement localisés et compatibles avec des applications à l'échelle cellulaire et intracellulaire [66] *in vitro* et *in vivo*.

Toutefois, la faible interaction des champs magnétiques avec les biomolécules conjuguées est contraignante. Pour contourner cet obstacle, les champs magnétiques appliqués sont généralement convertis en stimuli opérant sur les systèmes étudiés, comme des forces mécaniques [73, 74] ou des concentrations induites par agrégation de nanoparticules [75]. Selon les applications, les forces magnétiques agissant sur les nanoparticules sont de l'ordre du pN (force appliquée par des moteurs bi-moléculaires [76]) pour aller jusqu'au fN.

Chapitre 2

Ingénierie de la génération de stimuli spatio-temporels

Comme évoqué dans le chapitre précédent, appliquer des stimuli contrôlés, à l'échelle cellulaire (une dizaine de μm) avec une résolution temporelle adéquate (environ une minute), passe par une instrumentation précise et miniaturisée. Il s'agit de recourir à une technologie qui permet de contrôler de manière très précise les stimuli appliqués, ceci aussi bien dans l'espace que dans le temps. Dans ce domaine, les dispositifs microfluidiques présentent de multiples avantages.

2.1 Microsystèmes dédiés à la biologie

2.1.1 Historique

Les microsystèmes sont des systèmes miniaturisés qui combinent des capteurs, des actionneurs et un ensemble de circuits électroniques de contrôle et de traitement du signal et de l'information. Leurs dimensions sont comprises entre quelques micromètres et quelques millimètres. L'incorporation de fonctions hétérogènes aboutit à un cadre d'élaboration multidisciplinaire. Les signaux utilisés sont aussi bien électroniques, thermiques, optiques, physiques que mécaniques. Ces dispositifs sont désignés par l'acronyme MEMS (Micro Electro Mechanicals Systems).

En 1959, Richard P. Feynmann au cours de son allocution «There's plenty of room at the bottom» est le premier à souligner l'intérêt de la miniaturisation des composants pour permettre une réduction de l'encombrement et multiplier ainsi les fonctionnalités [79]. Dans les années 1980, des systèmes intégrés avec de l'électronique de traitement de l'information constituent les premiers capteurs de pression [78]. Dans les années 1990, le détournement des technologies utilisées par l'industrie microélectronique conduit au développement de nombreuses technologies MEMS standardisées. Les microsystèmes peuvent être

alors produits en série ce qui implique des réductions de coût de fabrication. De nombreuses applications industrielles en découlent : premiers accéléromètres fabriqués par Analog Device (ADXL50) pour utilisation dans les airbags ou premiers miroirs électrostatiques fabriqués par Texas Instruments pour utilisation au sein de vidéo-projecteurs. Aujourd'hui, les succès les plus convaincants des microsystèmes en termes de réalisations industrielles sont les têtes d'impression à jets d'encre et les têtes de lecture magnétique.

En parallèle, les progrès en électronique et le développement d'applications portables favorisent l'émergence des microsystèmes dans la quasi-totalité des disciplines scientifiques ou techniques : thermique, optique, aéronautique, automobile, médecine. Les développements de la microélectronique démontrent que la miniaturisation diminue non seulement les coûts de production mais aussi facilite l'intégration de différentes fonctions sur un même support. En mettant au point des «laboratoires sur puce», les chercheurs ont voulu reproduire ces mêmes caractéristiques pour la chimie et la biologie [80].

2.1.2 Spécificités

Le terme «laboratoire sur puce» (en anglais «lab on chip») est couramment employé pour décrire l'intégration et la réduction en taille sur un substrat plan de quelques centimètres carrés d'une ou plusieurs opérations d'analyses classiquement effectuées en laboratoires de chimie ou de biologie. Les «microsystèmes d'analyse totale» (aussi appelés μ TAS pour Micro Total Analysis Systems¹) sont nés.

Domaines d'applications

Le développement de microsystèmes pour la chimie et la biologie visent des applications très larges : de l'analyse chimique à la synthèse de cristaux de protéines en passant par le séquençage de génôme, la recherche de nouveaux médicaments, l'ingénierie tissulaire et la mise en place d'outils de diagnostic. Les micro-dispositifs pour les analyses biologiques ont suivi les tendances imposées par la recherche avec la mise en œuvre des puces à ADN à l'heure de la génomique, celles des puces à protéines à l'heure de la protéomique et enfin celles des puces à cellules au milieu des années 2000 [82].

Avantages immédiats de la réduction en taille

Le recours à des systèmes miniaturisés permet alors [80, 81, 82] :
-la diminution des volumes utilisés. Les réactifs rares ou coûteux, comme par

1. Il s'agit de la dénomination d'un congrès international dédié aux développements de tels microsystèmes au cours duquel les travaux décrits dans cette thèse ont été présentés deux fois.

exemple des molécules candidates médicaments, ou encore dangereux, comme des toxines, sont manipulés à l'échelle du μL voir du nL .

-la réalisation de multiples expériences en parallèle. Selon les besoins et la surface allouée, il est possible de dupliquer des milliers voire des millions de fois un protocole donné.

-l'accès rapide à des résultats par une instrumentation portable et automatisée. La limitation du nombre de manipulations conduit à la réduction du temps de diagnostic par exemple.

Comportements dominants aux petites échelles

La miniaturisation ne se restreint pas à la résolution des problèmes d'ordre technologique qui sont ceux liés à la fabrication d'outils à une échelle nécessitant une instrumentation et un savoir-faire spécifiques. La réduction en taille peut s'accompagner de réelles limitations liées aux lois d'échelles telles que l'apparition de bruit au sein du circuit électronique de détection ou l'augmentation des capacités parasites. Les forces physiques impliquées dans l'actionnement vont considérablement changer.

Lois d'échelle Les lois de réduction d'échelle modifient les rapports entre les différents types de force et changent donc le comportement de la matière [84, 85]. Au cours de ce travail, nous allons concevoir des microsystèmes magnétiques et électriques. Nous nous contenterons ici de comparer l'évolution des forces électrostatiques et magnétiques lorsque de tels actionneurs subissent une homothétie d'un facteur h suivant toutes ses dimensions. Suite à cette opération, ses performances sont comparées à celle d'un actionneur de taille initiale. Pour que cette confrontation ait un sens, nous évaluerons l'effet de la réduction en taille sur la force massique définie par $f_M = F/M$. La division d'un facteur h ($h > 1$) de toutes les dimensions d'un système se traduit par une diminution de la masse M par un facteur h^3 . Nous allons considérer les forces magnétiques et électrostatiques massiques respectivement notées : f_{Mm} et f_{Mes} .

La force magnétique varie comme $(m \cdot \nabla)B$ avec m , le moment magnétique de l'élément magnétique et B l'induction². Toutefois, le champ magnétique créé par un aimant n'est pas réduit lorsqu'on le miniaturise [84]. Le moment magnétique est lié à l'aimantation locale M_{mag} par la relation $m = M_{mag}V$, avec V le volume de l'élément. Ainsi, f_{Mm} varie comme h .

2. Il n'entre pas dans les objectifs de ce manuscrit d'expliquer au lecteur le détail de la relation entre champ magnétique et induction magnétique. Nous indiquons que pour la plupart des matériaux, les deux sont liés par une relation linéaire, ce qui justifie l'amalgame couramment pratiqué. Nous expliciterons ces deux grandeurs dans les travaux présentés en Annexe 2

Quant à la force électrostatique, elle est définie, entre deux plaques en regard de surfaces S séparées d'une distance g , comme $F_{es} = (\epsilon_0 S U^2) / (2g^2)$ avec ϵ_0 , la perméabilité du vide et U la tension appliquée aux bornes des deux plaques. Si l'on réduit toutes les dimensions d'un facteur h , la force électrostatique F_{es} reste donc inchangée. En revanche, f_{Mes} varie en h^3 .

Ceci indique que les forces d'origine électrostatique et magnétique évoluent de façon différente avec la miniaturisation ce qui est à prendre en compte pour la conception des microsystemes des deux études proposées.

Effets surfaciques Du fait de la miniaturisation, le rapport de la surface sur le volume augmentent. Les effets surfaciques deviennent prépondérants. Des forces qui jusque là étaient négligeables, telles que les forces capillaires ou les forces de proximité comme les forces de van der Waals, interviennent. La conception des microsystemes doit prendre en considération ces phénomènes afin d'anticiper leurs effets.

Procédés de fabrication

L'élaboration d'un microsysteme spécifique à une étude biologique constitue un véritable défi, ce dispositif devant tout au moins répondre aux mêmes critères que les systèmes «macroscopiques» traditionnels. Des revues ainsi que des ouvrages spécialisés (notamment [85]) proposent la description détaillée de protocoles de fabrication de tels microsystemes pour des lecteurs intéressés par ces aspects. Si la fabrication des éléments principaux de micro-dispositifs exploitait au préalable le silicium ainsi que les procédés de microfabrication issus de la microélectronique, l'introduction de matériaux dédiés et de technologies biocompatibles s'est développée en contact avec les sciences de la vie. Citons, à ce propos, les innovations permises par les polymères biocompatibles comme le PDMS (Poly-(Di-Méthyl)-Siloxane), les résines et les colles photoréticulables telles que la SU-8 ou la NOA81 [86], ou par la chimie de surface permettant le greffage localement contrôlé de molécules par photolithographie ou par électrochimie [83].

2.2 Démarche guidant conception et validation

Afin de pallier aux difficultés exposées précédemment, la démarche proposée dans cette thèse repose sur une méthodologie de conception continuellement améliorée grâce aux données produites expérimentalement par les microsystemes et aux prédictions issues de simulations par éléments finis. Les nombreuses itérations nécessaires entre la réalisation technique, l'expérimentation et la simulation garantissent la génération d'un outil optimisé et adapté (Fig.2.1).

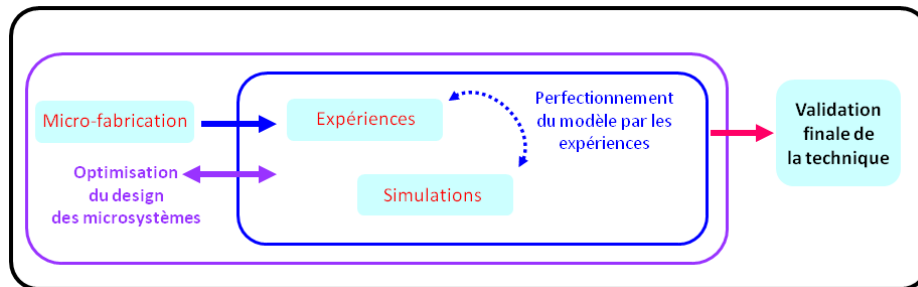


FIGURE 2.1 – Représentation de la démarche adoptée.

2.3 Enjeux collaboratifs

Des outils tant technologiques que conceptuels doivent nous permettre d'établir des protocoles d'étude reproductibles et quantitatifs. Dans ces conditions, la conception de microsystèmes fait appel à de multiples compétences. En tant que physiciens spécialistes de méthodes de microfabrication, nous allons recourir aux technologies de fabrication telles que le design de masques, la photolithographie, le micro usinage en volume et le micro usinage en surface. Mais surtout, nous allons être amenés à travailler en interaction avec des chercheurs spécialisés dans des domaines balayant des disciplines aussi variées que la biologie du développement ou la synthèse chimique de nanoparticules (Fig.2.2).

Plus exactement, au cours de ces deux études, notre ambition est de démocratiser l'utilisation de microsystèmes en biologie. Pour ce faire, nous voulons souligner que, par le biais de projets collaboratifs, des méthodologies génériques et innovantes peuvent émerger, permettant la résolution de questions biologiques. Par cette approche, nous voulons montrer que les biologistes peuvent avoir accès à des outils qui ne se limitent plus aux équipements classiques disponibles sur étagère. Ils sont en mesure d'utiliser des instruments issus des hautes technologies pour découvrir les principes de base et les comportements qui gouvernent les mécanismes du vivant aux niveaux de la molécule, de la cellule et de l'organisme.

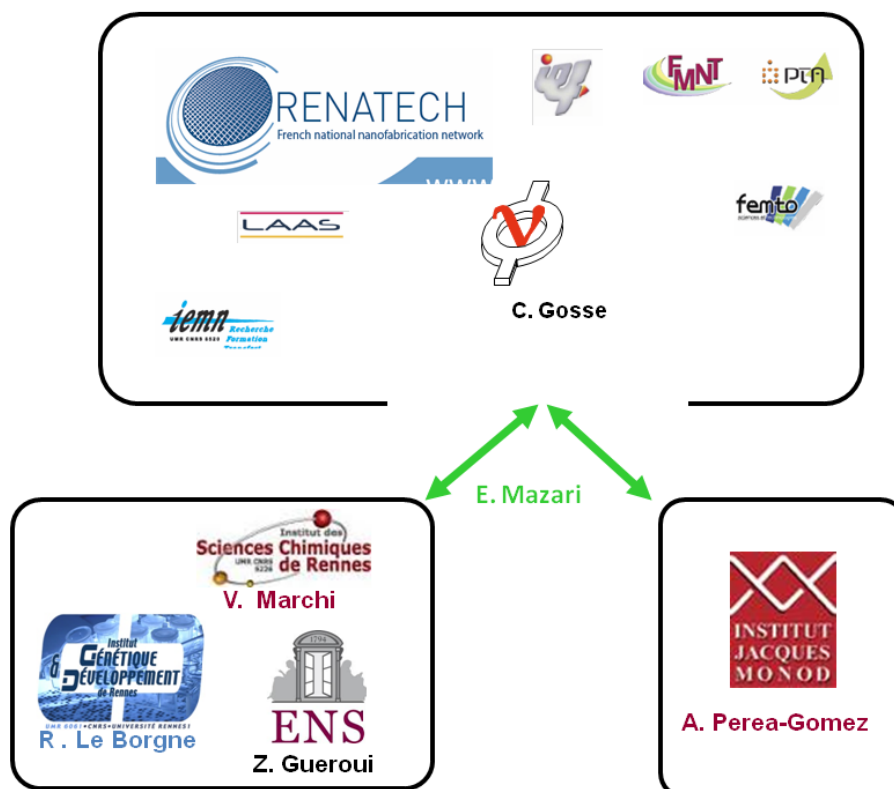


FIGURE 2.2 – Les collaborations impliquées au cours de ce travail.

2.4 Enjeux de formation

En tant qu'étudiante, de telles études multidisciplinaires sont un formidable tremplin quant à l'acquisition de connaissances et de techniques s'échelonnant de la biologie moléculaire en passant par la biologie cellulaire et jusqu'à la synthèse chimique.

Bien plus, il s'agit de traduire et d'adapter des concepts ainsi que des méthodes d'analyses «classiques» pour des ingénieurs physiciens répondant de manière pertinente aux problèmes spécifiques à la biologie. De ce point de vue, l'étude de processus biologiques peut produire une nouvelle source de recherche théorique en physique.

Enfin, la forte corrélation entre les progrès respectifs de nos partenaires et les nôtres constitue un apprentissage enrichissant quant à la mise en place d'une organisation rigoureuse de mon travail. De plus, ces études ont fait naître l'intérêt pour l'établissement d'une communication efficace entre collaborateurs issus de domaines pluridisciplinaires.

Deuxième partie

Microsystèmes magnétiques pour la modification spatiotemporelle du réseau de signalisation Ran

Le fuseau mitotique est une machine moléculaire complexe qui, lors la division cellulaire, procède à l'exacte et fidèle répartition du matériel génétique entre deux cellules filles. La ségrégation erronée des chromosomes lors de ce processus conduit à des malformations fatales si elle intervient au cours de la méiose et favorise le développement ainsi que la progression de cancer si elle survient au cours de la division de cellules somatiques. Les nombreuses études attribuées à cette machine ont révélé qu'elle opère de manière hautement reproductible tout en étant capable de remarquablement s'adapter à son environnement.

Dans ce contexte, comprendre les mécanismes moléculaires fondamentaux induisant l'assemblage et la régulation du fuseau mitotique s'avère essentiel. Pour ce faire, nous avons développé une approche perturbative, au sein d'extraits d'œufs de xénope, un système acellulaire utilisé de manière privilégiée pour l'étude de l'assemblage des microtubules qui constituent le fuseau mitotique. Cette stratégie de perturbation repose sur la génération de gradients spatio-temporellement contrôlés de protéines présumées régulatrices de la figure mitotique. Plus exactement, nous contrôlons des nanoparticules magnétiques conjuguées à des protéines stimulant ou inhibant l'assemblage des microtubules et appartenant au réseau de signalisation Ran. L'observation de la réponse du système à une telle perturbation permet d'identifier les effets induits sur la nucléation et la croissance des microtubules. Par là même, cette réponse spécifique met en évidence certains traits caractérisant les cascades moléculaires sous-jacentes [87][88].

Nos travaux nous a permis de confirmer que les phénomènes de réaction-diffusion sont à la base du contrôle de l'auto-organisation des microtubules. Enfin et surtout, nous avons introduit ici une stratégie innovante et générique d'ingénierie pour l'étude de systèmes biologiques à l'échelle subcellulaire, permettant l'émergence dirigée de structures auto-organisées grâce à la concentration magnétique localisée d'une biomolécule impliquée dans la signalisation.

Chapitre 1

Contexte scientifique

1.1 Le fuseau mitotique

1.1.1 Aspects structuraux

Le fuseau mitotique est composé de chromosomes et de nanotubes polymériques appelés microtubules. Ces tubes sont un élément majeur du cytosquelette des cellules eucaryotes, responsables du maintien de leur forme. Ils constituent de véritables «voies de circulation» cellulaires sur lesquelles transitent divers organites intracellulaires et notamment, au moment de la mitose, les chromosomes.

Structuralement, les microtubules sont des cylindres creux de 25 nm de large et formés de 13 proto-filaments en moyenne [89]. Chaque proto-filament est constitué d'hétérodimères de tubuline α et de tubuline β assemblés parallèlement et dans une même direction, ceci confère donc un caractère polaire à l'architecture (Fig.1.1a). La polarité structurale des microtubules a deux conséquences fonctionnelles. L'une concerne leur dynamique, et l'autre leur fonction dans le transport intracellulaire.

Plus exactement, la tubuline β est apparentée à une extrémité dite «plus» qui participe très activement à la dynamique spatiale du microtubule tandis que la tubuline α est apparentée au pôle «moins» peu dynamique, ancré au niveau d'un centre nucléateur et organisateur des microtubules nommé centrosome.

Outre cette fonction dynamique, la polarité structurale des microtubules permet le transport des vésicules cytoplasmiques en interphase et des chromosomes le long du fuseau mitotique en mitose [91]. Ce transport est effectué par des moteurs moléculaires, ou protéines motrices, qui utilisent l'énergie d'hydrolyse de l'ATP. Il existe deux grandes familles de moteurs : les kinésines, qui se déplacent en général vers l'extrémité «plus», et les dynéines qui se déplacent principalement dans l'autre sens.

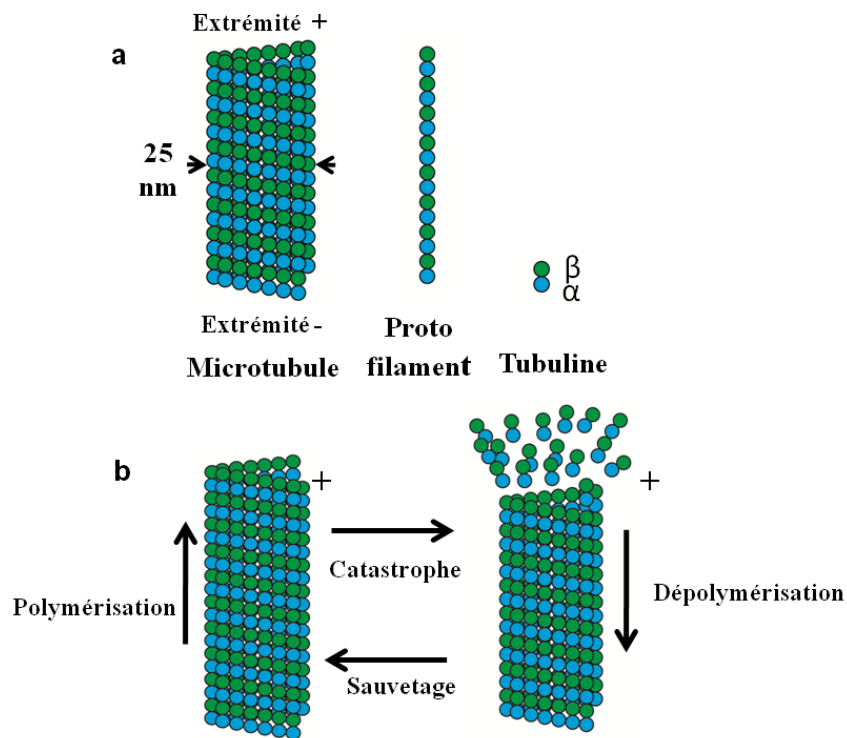


FIGURE 1.1 – Dynamique des microtubules. (a) Polarité et structure des microtubules. Des dimères de tubuline sont organisés en protofilaments dans la paroi d'un microtubule. Treize protofilaments parallèles à l'axe du tube composent les microtubules. L'assemblage des dimères de tubuline α et β confère aux microtubules une polarité avec une extrémité «plus» dynamique (coté tubuline β) et une extrémité «moins» (coté tubuline α). (b) Instabilité dynamique des microtubules. La transition de polymérisation à dépolymérisation est appelée une «catastrophe», la transition inverse est un «sauvetage». L'instabilité dynamique intervenant à l'extrémité «plus» est une propriété intrinsèque de cette dernière. Elle est caractérisée par quatre paramètres : la vitesse de polymérisation, la vitesse de dépolymérisation, la fréquence de catastrophe et la fréquence de sauvetage. Réalisé d'après [90].

La polarité des microtubules est essentielle quant à l'émergence et au maintien d'un fuseau bipolaire. Toutefois, elle ne suffit pas à comprendre leur comportement hautement dynamique. Ces nanotubes protéiques sont longs et stables au début de la division cellulaire, pour devenir brusquement par la suite courts et dynamiques. En fait, la cinétique de polymérisation hors-équilibre des microtubules est régie par le processus d'instabilité dynamique [92] (Fig.1.1b). La transition entre polymérisation et dépolymérisation est appelée «catastrophe». La transition inverse constitue le «sauvetage». L'instabilité dynamique module l'organisation spatiale des microtubules dans la cellule en les faisant osciller constamment entre cycle de polymérisation/dépolymérisation, et ce durant divers processus cellulaires fondamentaux tels que croissance, polarisation et division. Il a ainsi été calculé qu'en interphase les microtubules ont une demi-vie d'environ 15 minutes alors qu'en mitose leur demi-vie atteint seulement 30-90 secondes [87]. Cette instabilité des microtubules en mitose provient essentiellement d'une augmentation, de 5 à 10 fois, de la fréquence de catastrophe. Cela explique le passage d'un réseau de microtubules longs et stables à un réseau de microtubules courts et dynamiques [93, 94] (Fig.1.2).

De plus, ces observations suggèrent l'existence de facteurs qui contrôlent spatio-temporellement la dynamique des microtubules. En fait, ces facteurs ont vu leur existence démontrée et ils permettent des variations de stabilité très rapides. Ils sont de deux types. D'une part, il y a les protéines associées aux microtubules (Microtubule Associated Proteins, MAPs) telles NuMa (pour Nuclear protein of the Mitotic Apparatus) ou TPX2. Elles modulent les propriétés de croissance des microtubules en les stabilisant et/ou en stimulant leur vitesse de polymérisation. D'autre part, il y a les facteurs de catastrophe ou facteurs déstabilisants tels XKCM1 ou la stathmine. Ils s'opposent à l'activité stabilisatrice des MAPs [87]. Au cours du cycle cellulaire, c'est l'équilibre entre les activités de ces deux types de protéines qui détermine la dynamique des microtubules.

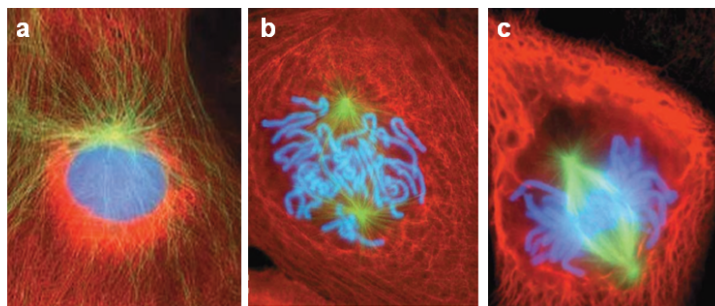


FIGURE 1.2 – Microtubules au cours de différentes phases du cycle cellulaire observées par immunofluorescence dans des cellules HeLa. L'ADN est en bleu, les microtubules en vert et l'actine en rouge. (a) Durant l'interphase, les microtubules sont longs et peu dynamiques. (b) Durant la prométaphase, la membrane nucléaire se désagrége. Le fuseau mitotique s'organise dans tout le volume de la cellule. Les microtubules constituant le fuseau capturent les chromosomes au niveau de leurs centromères par l'intermédiaire d'une structure protéique appelée le kinétochore. (c) Durant la métaphase, la condensation des chromosomes est maximale. Les microtubules convoient à un pôle opposé du fuseau mitotique une des chromatides de chaque paire de chromosomes. D'après [http ://www.lifesci.utexas.edu/faculty/sjasper/images/12.5\(a à f\).png](http://www.lifesci.utexas.edu/faculty/sjasper/images/12.5(a%20%C3%A0%20f).png)

1.1.2 Mécanismes d'assemblage

Différents modèles d'assemblage du fuseau sont décrits dans la littérature.

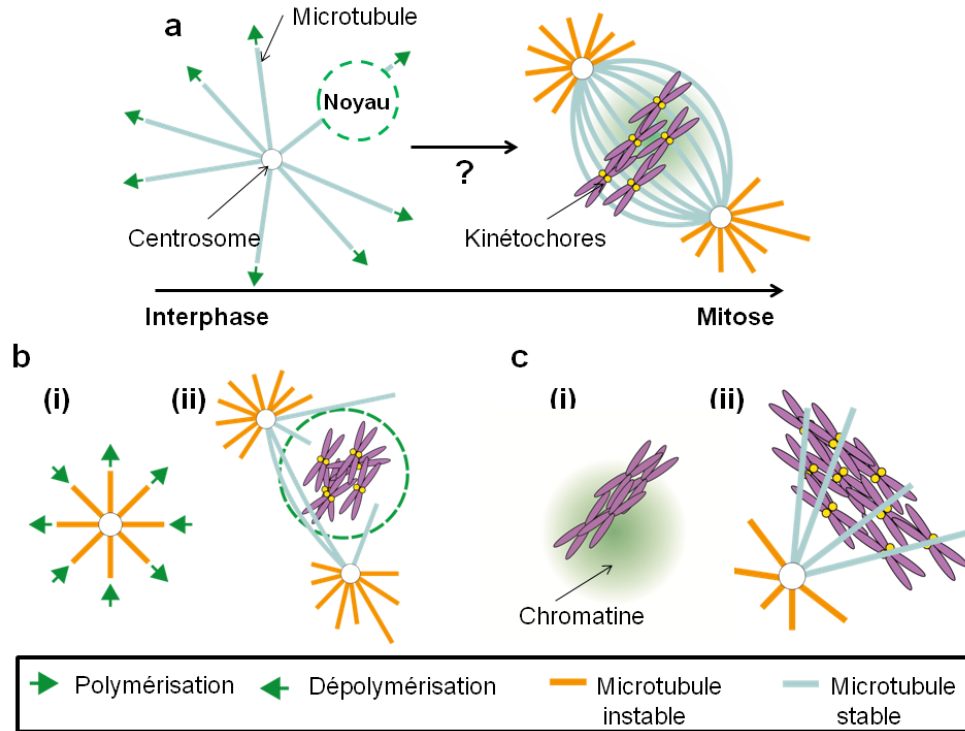


FIGURE 1.3 – Mécanismes d'assemblage du fuseau mitotique. (a) Distribution des microtubules lors de l'assemblage du fuseau mitotique. Un premier modèle dit (b) «search and capture» propose une description des mécanismes d'assemblage des microtubules. (b(i)) Les microtubules polymérisent dans toutes les directions de l'espace depuis le centrosome. (b(ii)) Lorsque les nanotubes polymériques «capturent» un chromosome, ils se stabilisent en se liant au niveau des kinétochores. Un autre modèle dit (c) «effet chromatine» adapté du modèle «search and capture» propose (c(i)) l'existence de mécanismes de stabilisation locale des microtubules. (c(ii)) Les chromosomes sont alors les principaux acteurs de cette stabilisation. Ils s'opposent localement à la dépolymérisation grâce à la chromatine qui permet une polymérisation persistante de microtubules autour des chromosomes, et ils stabilisent certains microtubules provenant des pôles opposés du fuseau en permettant leur attachement aux kinétochores.

Recherche et capture des kinétochores

Avec la découverte de l'instabilité dynamique des microtubules, un premier modèle appelé «search and capture» propose une description convaincante de l'assemblage des microtubules en fuseau mitotique (Fig. 1.3b). Dans ce modèle, les microtubules nucléent au niveau du centrosome et forment des asters. Durant une première phase dite d'exploration, les microtubules polymérisent et dépolymérisent de manière aléatoire et dans toutes les directions de l'espace. Ensuite,

au contact des chromosomes, au niveau des kinétochores, l'activité des microtubules est réduite : ils entrent dans une phase où leur longueur se stabilise ce qui, de fait, résulte en capture [95] (Fig.1.2b). Dans ce modèle, les centrosomes sont les seuls centres organisateurs. L'orientation préférentielle des microtubules vers les chromosomes pourrait être simplement due à leur capture suivie de stabilisation par les kinétochores [95, 96]. Cependant, les kinétochores ne semblent pas être essentiels pour l'assemblage du fuseau [97]. Le modèle «search and capture» ne fournit donc pas d'explication satisfaisante quant aux mécanismes impliqués au cours de la stabilisation locale des microtubules.

Importance de la chromatine

Diverses observations ont en fait mis en évidence le rôle actif de la chromatine dans le processus de contrôle de la dynamique de polymérisation/dépolymérisation des microtubules [117, 101, 102, 103]. Au sein d'extraits d'œufs de xénope naturellement dépourvus de centrosomes, l'injection de billes enrobées de chromatine conduit à la formation d'un fuseau bipolaire [108] (Fig.1.4).

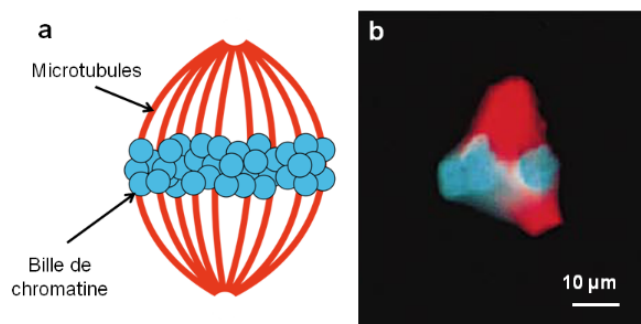


FIGURE 1.4 – «Effet chromatine» en l'absence de centrosome. (a) Représentation schématique. (b) Image en fluorescence de l'assemblage de microtubules généré au sein d'extraits d'ovocytes de xénope complémentés avec des billes couvertes de chromatine (marquées en bleu) et de tubuline (marquée en rouge). D'après [109].

Stabilisation locale à proximité de la chromatine

Un second modèle baptisé «stabilisation locale» ou «effet chromatine» complète alors le modèle «search and capture». Il propose que la chromatine modifie localement la nature du cytoplasme et induit la stabilisation de l'extrémité «plus» des microtubules [104]. Plus précisément, les chromosomes s'opposent localement à la dépolymérisation grâce à la chromatine, ce qui permet une polymérisation persistante de microtubules dans leur voisinage. Parallèlement à cela, ils stabilisent les microtubules provenant des pôles opposés du fuseau en

permettant leur attachement aux kinétochores (Fig. 1.3c). Des expériences *in vitro* ont montré que le taux de sauvetage des microtubules augmente à proximité de la chromatine alors que le taux de catastrophe est corrélé à la longueur des microtubules en provenance des centrosomes [105]. Enfin, ce mécanisme d'assemblage n'est pas limité aux cellules dépourvues de centrosomes. Dans des cellules somatiques de vertébrés, le fuseau mitotique s'assemble correctement après ablation des centrosomes par impulsion laser ou par microchirurgie [106, 107]. Il est vraisemblable que les mécanismes «search and capture» et «effet chromatine» coexistent au sein des cellules.

Auto-assemblage du fuseau mitotique sous l'«effet chromatine»

Au cours d'expériences *in vitro*, un nombre minimal de billes de chromatine est nécessaire à l'assemblage d'un fuseau [122], montrant que l'existence de cet effet «chromatine» requiert une concentration-seuil de chromatine. A l'échelle moléculaire, la chromatine est une structure complexe. Dans son voisinage, ont été identifiés des facteurs qui contrôlent précisément, dans l'espace et dans le temps, la dynamique ainsi que la structure des microtubules. Ainsi, la présence des protéines MAPs, NuMA et TPX2 a été mise en évidence. Ces protéines favorisent la nucléation des microtubules et aident à la formation des pôles [98, 99]. En outre, des protéines motrices, telles que les kinésines Eg5 et Klp1, permettent l'organisation et la capture des petits microtubules formés au niveau de la chromatine tandis que la dynéine va permettre une focalisation de ces microtubules au niveau des pôles [100, 111]. Ces observations montrent l'implication des protéines MAPs, des facteurs déstabilisants ainsi que des moteurs moléculaires dans les processus de capture des chromosomes par les microtubules, d'assemblage tridimensionnel du fuseau, d'établissement de la bipolarité et de déplacement/positionnement des chromosomes sur le fuseau [110]. L'auto-organisation des microtubules en un fuseau bipolaire semble donc reposer en partie seulement sur les propriétés intrinsèques des microtubules, c'est-à-dire, leur polarité et leur instabilité dynamique. L'action de protéines régulatrices telles que les MAPs ou les moteurs moléculaires sont nécessaires à la formation et au développement d'une structure bipolaire. Plus précisément, la polarité des microtubules déterminée par des protéines motrices assure le tri et l'organisation spatiale de ces tubes polymériques alors que l'instabilité dynamique de ces filaments leur offre une plasticité modulable ainsi qu'un contrôle spatial et temporel. A l'échelle moléculaire, une avancée considérable dans la compréhension de l'«effet chromatine» repose sur la mise en évidence d'un rôle régulateur de la protéine Ran.

1.1.3 Processus de régulation

Ran est une GTP-ase nucléaire de 25 kDa. Ces dernières sont de petites enzymes qui régulent de nombreux processus cellulaires fondamentaux tels que la croissance, la motilité cellulaire et le transport nucléaire [118]. Les GTP-ases existent dans un état actif lié au nucléotide GTP ou dans un état inactif lié au nucléotide GDP. Leur état est modulé en interagissant avec deux types de protéines. D'une part, les GTP-ases ayant intrinsèquement une faible capacité d'hydrolyse du GTP, elles atteignent leur niveau physiologique d'hydrolyse en interagissant avec des protéines d'activation de leur activité appelées GAP (GTPase-activating proteins). D'autre part, l'interaction avec des facteurs d'échange des guanosines (guanine-nucleotide exchange factors, GEF) permet l'association des GTP-ases au nucléotide GTP. En outre, la GAP (appelée RanGAP chez l'homme) et le GEF (RCC1 chez l'homme) sont réparties de façon très différente au sein de la cellule [120, 119] : RanGAP est principalement cytoplasmique alors que RanGEF est une protéine nucléaire aussi associée à la chromatine en mitose. RanGDP est donc la forme prédominante dans le cytoplasme et RanGTP dans le noyau (Fig.1.6a).

Par ailleurs, durant l'interphase, cette distribution asymétrique des différentes formes de Ran est essentielle pour l'organisation du transport nucléocytoplasmique. Les karyophérines sont des récepteurs nucléaires qui se lient à des protéines cargos et permettent leur transport du cytoplasme vers le noyau (importines) ou du noyau vers le cytoplasme (exportines). La protéine Ran peut interagir avec des karyophérines de la famille des importines β [120, 119]. Plus précisément, dans le cas des importines, l'association de RanGTP provoque la libération des cargos dans le noyau tandis que dans le cas des exportines, il faut que RanGTP se lie au préalable aux cargos pour que leur convoyage hors du noyau soit effectué [121].

La première découverte d'un rôle pour Ran dans l'auto-organisation d'ensemble de microtubules repose sur une observation considérable : RanGTP promeut l'assemblage de fuseaux dans des extraits d'œufs de xénope en l'absence de centrosomes, de kinétochores et même de chromatine [125, 124, 122, 123] (Fig.1.5). Molécule plurivalente, RanGTP est capable d'induire non seulement la polymérisation de microtubules mais aussi leur organisation en structures fusiformes (Fig.1.5b). Ce phénomène est corroboré par la formation d'un fuseau bipolaire auto-organisé autour de la chromatine en l'absence de centrosomes comme observé dans les cellules végétales, dans certaines cellules animales en méiose et même dans les extraits acellulaires [108]. En outre, il a été démontré que la capacité de la chromatine à induire l'assemblage de microtubules et la formation d'un fuseau dans les extraits d'œufs dépend de la capacité de RCC1

(très concentré au niveau de la chromatine) d'engendrer exclusivement autour des chromosomes la forme RanGTP, et d'enclencher ainsi l'assemblage de microtubules. En quelque sorte, RRC1 contrecarre alors l'activité GAP dominante de l'environnement [122]. Ran étant lui-même libre de diffuser, la chromatine pourrait donc créer autour d'elle-même un gradient de la forme active de Ran. A ce propos, l'utilisation de biosondes FRET¹ (Förster resonance energy transfer) a permis l'observation du gradient de RanGTP induit au voisinage des chromosomes en cours de mitose au sein d'extraits acellulaires [129] (Fig.1.5c-e). L'«effet chromatine» semble de ce fait être relayé à l'échelle moléculaire par la protéine Ran sous sa forme active. Lorsqu'elle atteint une certaine concentration seuil, RanGTP se comporte comme un régulateur, spécifiant où former les microtubules.

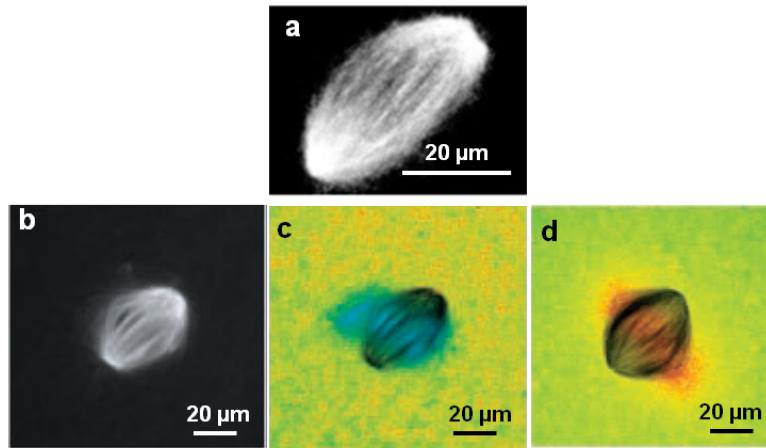


FIGURE 1.5 – La protéine Ran permet la formation de réseaux de microtubules. Au sein d'extraits d'œufs de xénope, la nucléation et la croissance de microtubules incorporant de la tubuline marquée GFP est obtenue en concentrant des particules magnétiques conjuguées à la protéine RanQ69L-GTP (un mutant Ran sous sa forme GTP). Au dessus d'une concentration seuil de RanGTP, les microtubules s'assemblent en fuseau en l'absence de centrosomes, de kinétochores et de chromosomes (a) Fuseau induit par Ran-GTP en l'absence de kinétochores, chromosomes et de centrosomes [128]. En cours de mitose, Kalab et al ont observé (b) la formation d'un fuseau bipolaire constitué de microtubules incorporant de tubuline marquée à la rhodamine. A proximité des chromosomes, ils ont pu visualiser en utilisant des biosenseurs FRET (c) le gradient de RanGTP généré ainsi que (d) le gradient de cargos libres liés à l'importin β [129].

En fait, Ran semble élégamment reproduire pendant la mitose le mode opératoire adopté à l'interphase lors du transport nucléocytoplasmique. Un des rôles de RanGTP dans les cellules en interphase est de provoquer la libération de protéines lorsqu'elles se trouvent à l'intérieur du noyau, en les dissociant de «complexes d'import» [120, 119]. C'est ce même mode d'action indirect que

1. Pour plus de détails quant à l'utilisation de biosenseurs FRET cf. Section 1.2.4.

Ran semble développer au sein d'un environnement mitotique (Fig. 1.6a-c). Plus exactement, la complexation de RanGTP aux complexes d'importine α/β entraîne la libération de nombreux composants impliqués dans la croissance et la stabilisation du fuseau mitotique [126, 109] (Fig.1.6d). Au début de la mitose, la dissociation de l'enveloppe nucléaire autorise la diffusion de RanGTP et donc l'établissement d'un gradient de RanGTP autour des chromosomes condensés. L'importante concentration de RanGTP [122] autour des chromosomes, produite par la protéine RRC1, favorise la formation de complexes RanGTP-importines, ces derniers induisant alors la libération de protéines essentielles à l'organisation du fuseau de microtubules [122, 212]. A titre d'exemple, l'une de ces protéines qui est une protéine nucléaire nommée TPX2 a clairement été identifiée comme étant un effecteur en aval de Ran ainsi qu'une MAP responsable de la nucléation des microtubules autour des billes de chromatine [126].

De par ces diverses études, il est avéré que la position des chromosomes est signalée par la molécule RanGTP [64]. Toutefois, des mécanismes fondamentaux restent méconnus : ce gradient de RanGTP est-il nécessaire et suffisant pour la formation d'un fuseau de microtubules stable ? Sans chromosome, une forte concentration de RanQ69L-GTP (un mutant Ran bloqué en phase active) permet bien la nucléation de fuseaux réduits mais aucune régulation spatiale ne semble opérer sur la croissance et la stabilisation des microtubules [122]. Les facteurs coordonnant la dynamique des microtubules demeurent donc inconnus. Il est cependant clair que ces facteurs sont adjoints à la molécule RanGTP. La concentration seuil requise en RanGTP génère un gradient de facteurs de croissance et de stabilisation des microtubules jusqu'alors piégés. Quelle est la nature de ces facteurs, quelles sont leurs fonctions, à quelle distance opèrent-ils ? Le réseau de signalisation Ran/RCC1 pourrait donc bien inclure d'autres informations précieuses quant à l'organisation du fuseau lui-même et quant à la dynamique des microtubules. C'est pourquoi, nous avons développé au cours de ce projet une stratégie de perturbation spatio-temporelle précise permettant de mettre en exergue certaines caractéristiques dynamiques de ce réseau de signalisation.

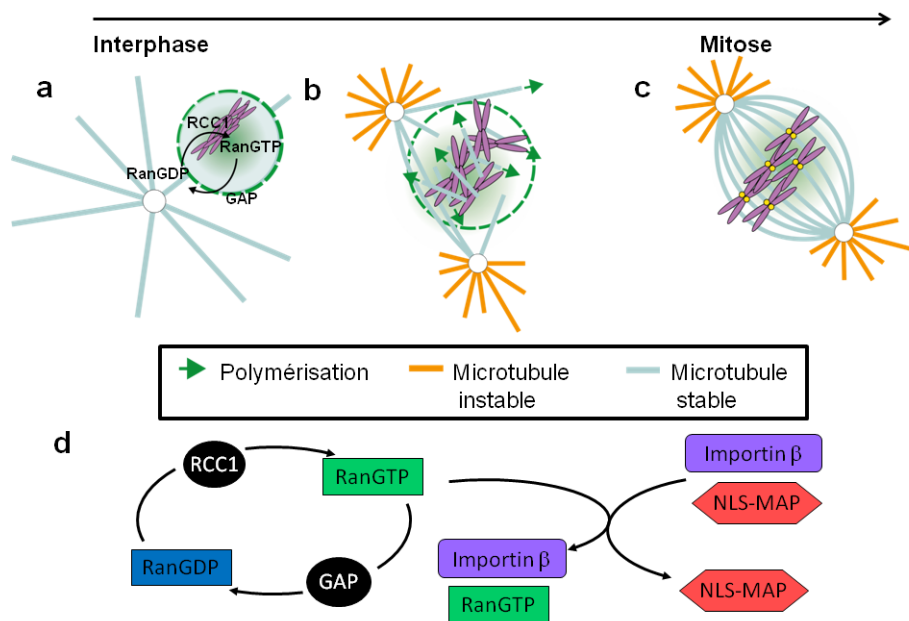


FIGURE 1.6 – Ran induit la régulation des microtubules en cours de mitose. (a-c) Rôle de Ran dans l'assemblage du fuseau avec centrosomes. Lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire, RanGTP serait libérée dans le voisinage des centrosomes et induirait une augmentation de la quantité et de la longueur des microtubules centrosomiques. (d) Représentation simplifiée du réseau de signalisation Ran/RCC1. Réalisée d'après [128].

1.2 Structure et objectifs du projet

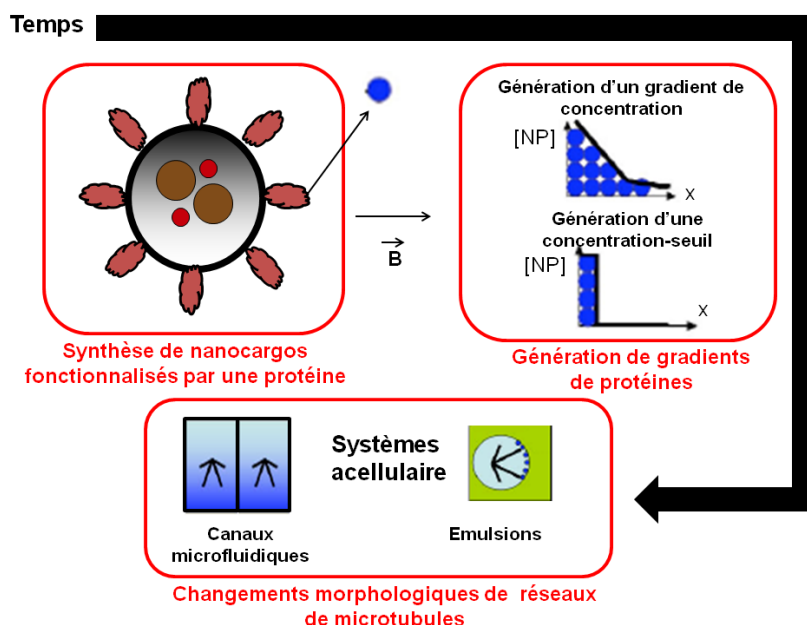


FIGURE 1.7 – Les différentes tâches planifiées au cours du projet BioModulator.

Nous voulons développer des expériences adaptées à l'étude des mécanismes moléculaires mis en œuvre par une des voies de signalisation régulant l'organisation du fuseau mitotique : la voie Ran/RCC1. Pour ce faire, notre stratégie se concentre sur la manipulation, au niveau intracellulaire, de nanocargos composés de nanoparticules magnétiques et fluorescentes et cette dernière fonctionnalisation permettant leur observation. Ces cargos seront biofonctionnalisés par les protéines d'intérêt RanQ69L ou RCC1. Plus précisément, ces recherches sont effectuées dans le cadre d'un programme d'étude baptisé BioModulator (ANR-08-NANO-P144-36). Le partenariat comprend V. Marchi et F. Grasset de l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes (UMR 6226, CNRS, Rennes 1), Z. Gueroui du laboratoire PASTEUR (UMR8640 ENS-CNRS-Paris 6) et R. Le Borgne de l'Institut de Génétique et Développement de Rennes (UMR 6061, CNRS, Rennes 1). Ce projet fédère ainsi les activités de quatre laboratoires souhaitant travailler à l'interface physique-chimie-biologie et possédant des savoir-faire transversaux et complémentaires. La Figure 1.7 représente les diverses étapes envisagées au cours de ce travail.

1.2.1 Nanocargos magnétiques et fluorescents pour l'étude de mécanismes cellulaires

L'approche repose avant tout sur l'élaboration de nanocargos de tailles nanométriques, magnétiques et fluorescents, qui seront bio-fonctionnalisés par des protéines d'intérêt. Grâce à leurs propriétés magnétiques, nous pourrions contrôler la position de ces nanocargos et par là même moduler la concentration en protéines greffées à leur surface. La fluorescence de ces cargos hybrides permettra un suivi dans l'espace et dans le temps de leur évolution.

L'élaboration de tels colloïdes est une gageure compte tenu des multiples propriétés qu'ils doivent intégrer. Premièrement, leur taille doit être suffisamment réduite pour des applications intracellulaires. Des particules micrométriques sont par exemple inadaptées, les cellules ayant généralement un rayon d'environ 10 à 20 μm . De plus, les forces qui seraient exercées sur des microparticules magnétiques varient de la centaine de femto-newtons jusqu'à quelques nano-newtons. Lors de l'application du champ magnétique, de telles forces conduisent à des effets mécaniques non désirables et délétères.

Ensuite, le dopage magnétique des nanocargos doit être nécessairement important pour que ces derniers soient sensibles à l'action des gradients de champ magnétique accessibles expérimentalement. A ce niveau, les principaux paramètres limitants sont les valeurs maximales de champ magnétique disponibles expérimentalement ainsi que les propriétés magnétiques intrinsèques des particules, qui dépendent de leur composition et de leur volume.

Enfin, la structure chimique en surface des nanocargos doit être optimisée afin de contrôler leur bio-activation c'est-à-dire le couplage à une protéine d'intérêt. Cette dernière opération doit être en effet réalisée sans altérer la fonction de la protéine et ce, tout en maîtrisant la stœchiométrie du complexe biomolécule/nanoparticule.

L'étape de synthèse et d'encapsulation sera réalisée par l'équipe de V. Marchi et de F. Grasset. Plus précisément, la fluorescence de nos nanocargos est assurée par des quantum dots. En effet, ces nano-cristaux semi-conducteurs possèdent une forte résistance au photo-blanchiment et un important rendement quantique. De plus, la longueur d'onde d'émission de ces cristaux est ajustable en variant leur composition chimique ainsi que de leur diamètre [194, 195]. Alors qu'ils présentent une large bande d'absorption, leurs spectres d'émission sont particulièrement fins avec une largeur de raie d'émission à mi-hauteur de l'ordre de 30 nm.

Par ailleurs, le caractère magnétique des nanocargos sera garanti par des grains superparamagnétiques d'oxyde de fer $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$. Ces nanoparticules mesurent une dizaine de nanomètres de diamètre et possèdent un moment magné-

tique permanent dont la valeur est estimée à environ 10^{-19} A.m². Le superparamagnétisme est un comportement des matériaux ferromagnétiques ou ferrimagnétiques qui apparaît lorsqu'ils sont sous la forme de petits grains ou nanoparticules. Lorsque la taille de ces derniers est suffisamment petite, l'aimantation change spontanément de direction sous l'influence de la température, résultant en une valeur nulle après moyennage temporel [196]. Ces nanoparticules sont alors assimilables à des mono-domaines magnétiques qui s'aimantent spontanément, lors de l'application d'un champ magnétique, engendrant un supermoment magnétique.

En outre, après leur synthèse, ces nano-cristaux, que ce soient les quantum dots ou les grains d'oxyde de fer, seront recouverts d'une couche de ligands hydrophobes assurant la stabilité colloïdale des particules. Une étape de solubilisation pour assembler ces différentes nanoparticules sera donc indispensable. Elle s'opèrera principalement par deux méthodes. D'une part, la réalisation de billes de silice au sein de microémulsions permettra la co-encapsulation des quantum dots ainsi que des grains magnétiques, produisant des particules de 25 à 250 nm de diamètre. D'autre part, la solubilisation simultanée de quantum dots et de nanoparticules d'oxyde de fer par des ligands amphiphiles gallate PEGylés façonnera des micelles atteignant 20 à 30 nm de diamètre [197].

Ultimement, l'équipe de R. Le Borgne procèdera à la biofonctionnalisation des nanocargos par des protéines d'intérêt modifiées pour interagir à leur surface. Plus précisément, il s'agira d'ajouter ainsi que de contrôler le nombre de fonctions en surface de nos nanocargos. Ces fonctions terminales (e.g. COOH, SH, Tris NTA) permettent de coupler de manière très stable la particule fonctionnalisée à une protéine.

1.2.2 Systèmes acellulaires

Un crapaud africain *Xenopus laevis* produit des œufs naturellement bloqués en phase M. A partir de ces œufs non fécondés, on récupère, après centrifugation, un extrait cytoplasmique mitotique riche en protéines cytoplasmiques, qui est appelé extrait CSF (Cytostatic-factor-arrested). Cette fraction contient alors toutes les protéines nécessaires à la formation du fuseau de microtubules [114, 115].

L'assemblage de fuseaux, en dehors de tout contexte cellulaire, est provoqué en complétant ces extraits avec divers facteurs. On peut par exemple les fertiliser artificiellement par ajout de spermatozoïdes débarrassés de leur membrane (purifiés à partir des testicules du crapaud mâle) [116]. On peut, de façon alternative, les compléter par des billes recouvertes de chromatine [108, 117]. Diverses expériences d'enrichissement ont ainsi été développées afin d'éclaircir

la fonction de protéines spécifiques impliquées dans le mécanisme d'assemblage du fuseau.

Comme déjà évoqué, des études menées au sein de ces systèmes acellulaires ont révélé le rôle essentiel de gradients de protéines Ran/RCC1 dans l'assemblage du fuseau [205, 127]. Nous allons donc générer diverses distributions spatiales de protéines RanQ69L et/ou de RCC1 au sein de systèmes dont les dimensions seront précisément contrôlées, mimant ainsi l'environnement cellulaire. Pour ce faire, nous proposons l'utilisation d'extraits au sein de microémulsions ou de canaux microfluidiques. Plus précisément, l'équipe de Z. Gueroui a développé avec succès une technique permettant l'encapsulation d'extraits CSF dispersés au sein d'une phase huileuse [143]. La taille contrôlée (quelques dizaines de micromètres) des microémulsions ainsi obtenues leur confère alors les mêmes caractéristiques topologiques et morphologiques qu'une cellule vivante. En outre, nos compétences en microfabrication nous permettront d'élaborer des micro-canaux de polymères aux dimensions micrométriques, spécifiquement adaptés au besoin de l'expérimentateur : la hauteur et la largeur de ces structures pouvant respectivement varier de 20 à 200 μm .

1.2.3 Modulation de la concentration de nanocargos par application d'un champ magnétique

Sous l'influence d'un champ magnétique, les nanocargos se comportent comme des sondes fluorescentes bioactives : ils peuvent se concentrer, se distribuer et se localiser à gré, mimant des mécanismes biologiques activés par des gradients dynamiques de concentration. En organisant ces nanocargos bio-fonctionnalisés par l'intermédiaire de gradients de champ magnétique spatio-temporellement définis, nous serons en mesure de mettre en évidence les mécanismes induits par le réseau de signalisation Ran/RCC1. En outre, notre maîtrise des procédés de microfabrication va nous permettre de développer des micro-dispositifs magnétiques permettant la manipulation locale et finement contrôlée des nanocargos.

Méthodes expérimentales de génération de gradients de protéines proposées

A l'application d'un champ magnétique, les moments dipolaires des nanoparticules s'alignent sur celui du champ extérieur et des couplages dipolaires se mettent en place alignant ainsi les particules. Deux principales stratégies permettent d'organiser des nanoparticules magnétiques selon des gradients spatiaux localisés (Fig.1.8).

Une première approche de génération de gradients localisés de nanoparticules s'inspire de la «Magnetic Field Flow Fractionation» (MFFF). La FFF appartient à un ensemble de techniques de séparation fine de particules et/ou de polymères

[186]. L'application de cette technique permet ici non pas de «trier» les nanoparticules selon leur taille ou leur composition puisqu'elles sont toutes identiques, mais de répartir les nanoparticules selon un profil de longueur caractéristique établie à partir d'une frontière physique (cf. Annexe2.4). A l'application d'un champ magnétique, les nanoparticules portant un moment $\mathbf{m}_p$ sont poussées vers la frontière physique par une force $\mathbf{F}_m$ d'expression [173, 175, 176]

$$\mathbf{F}_m = (\mathbf{m}_p \cdot \nabla) \mathbf{B} \quad (1.1)$$

Afin de déterminer le profil de concentration de nanoparticules formé au bord de la paroi du canal, il s'agit de résoudre l'équation de la conservation de la masse [186, 187]. Pour des nanoparticules en suspension, en considérant les phénomènes d'advection et de diffusion, il vient

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \Delta C - \frac{|\mathbf{F}_m|}{\gamma} \nabla C \quad (1.2)$$

où C est la concentration de particules en mol.L⁻¹, D le coefficient de diffusion de la particule déterminé par la relation de Stokes-Einstein d'expression $D = k_B T / \gamma$, et γ est égal à $6 \pi r \eta$ le coefficient de friction de la nanoparticule avec η , la viscosité du milieu considéré et r le rayon de la particule. En régime stationnaire :

$$D \nabla^2 C - \frac{|\mathbf{F}_m|}{\gamma} \nabla C = 0 \quad (1.3)$$

La résolution de cette équation différentielle du premier degré dont la solution conduit à

$$C(x) = C(0) \exp\left(-\frac{x}{\ell}\right) \quad (1.4)$$

Où,

$$\ell = \frac{D}{v} \quad (1.5)$$

avec v , la vitesse atteinte par les particules.

Pour des particules de taille micrométrique, cette longueur varie de quelques μm jusqu'à quelques centaines de μm selon l'intensité du champ magnétique [184]. En outre, diverses géométries pour le système d'étude sont envisageables. La suspension de nanoparticules peut être contrôlée au sein de canaux microfluidiques (Fig.1.8a), de gouttes d'émulsions ou encore de vésicules de phospholipidiques (Fig.1.8b). Cette technique repose sur la génération d'un champ magnétique inhomogène en ayant recours par exemple à de simples aimants. La portée de tels gradients de champs est réduite : de quelques dizaines à quelques centaines de μm , selon la forme des aimants utilisés. En résumé, à l'équilibre les nanoparticules s'organisent donc selon un profil de longueur ℓ qui reste exponentiel car l'agitation brownienne contrebalance en permanence les forces magnétiques.

Une autre technique consiste en revanche à produire de forts champs magnétique inhomogènes à partir d'un champ magnétique uniforme. Il s'agit de «canaliser» les lignes de champ magnétique par l'intermédiaire d'électro-aimants spécialement conçus ou de surfaces micro-structurées par des matériaux magnétiquement actifs. A l'extinction du champ magnétique extérieur, les nanoparticules se dispersent sous l'effet de l'agitation thermique. Ainsi, à l'approche d'un cône électro-poli d'une centaine de nanomètres de révolution formant la pièce polaire d'un électro-aimant (Fig.1.8c), les forces magnétiques exercées sur des nanoparticules atteignent de quelques centaines de femto-newton jusqu'à 1 nano-newton. Certains utilisent ce dispositif afin de déplacer et de positionner précisément dans l'espace des nanoparticules de 250 nm de diamètre [175]. D'autres ont réalisé des expériences de magnéto-fection, c'est-à-dire induire la perméation de cellules dans lesquelles sont introduites des nanoparticules magnétiques fonctionnalisées avec de l'ADN ou de l'ARN [198]. Bien plus, il est aussi possible de déposer un réseau de métal ferromagnétique (Ni, Co...) par des techniques de microfabrication sous la surface d'un microcanal (Fig.1.8d). Sous l'influence d'un champ magnétique extérieur chaque élément de ferromagnétique s'aimante créant un champ magnétique local non-uniforme qui va attirer les nanoparticules. Ainsi, l'organisation et la taille du réseau de nanoparticules sont fixées. Cette méthode a notamment été implémentée pour concevoir des «gels artificiels» d'électrophorèse pour l'ADN [199], ou pour réaliser des «pièges magnétiques» afin de séparer divers types de biomolécules ou de cellules [168, 203, 176], ou encore, pour contrôler du flux au niveau des canaux ioniques de la cellule en obstruant les canaux grâce à des nanoparticules. A l'application d'un champ, ces dernières se déplacent et le flux ionique est rétabli [200]. Cependant, l'énergie magnétique engagée étant alors bien supérieure à l'énergie brownienne s'exerçant sur les nanoparticules, si le champ magnétique extérieur est appliqué de manière continue, nous allons former des agrégats de nano-billes. Le recours à cette technique implique donc, pour obtenir des gradients de nanoparticules, une application/extinction alternée du champ magnétique.

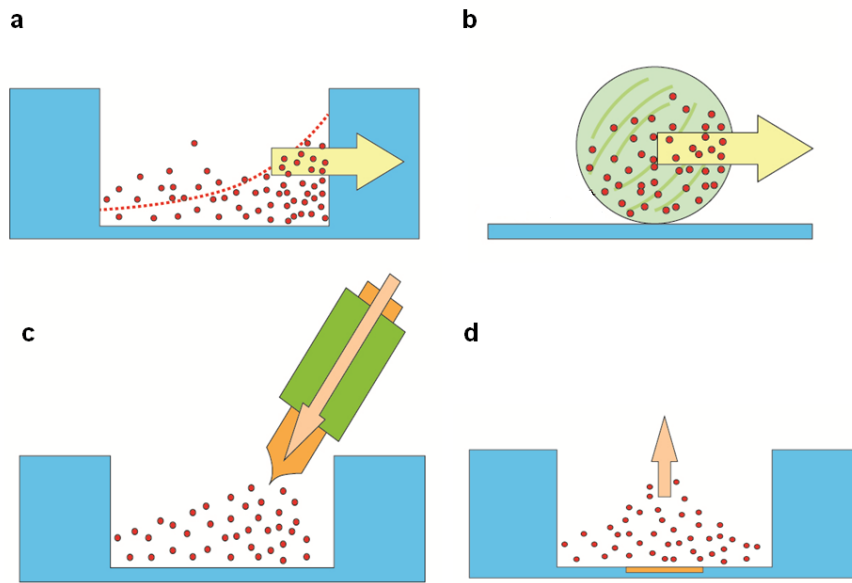


FIGURE 1.8 – Les différentes méthodes de génération de gradients de nanoparticules magnétiques localisées applicables à notre projet. Génération d'un gradient de champ magnétique non uniforme (a) par l'intermédiaire d'un électro-aimant ou (b) grâce à des micro-structures de matériaux magnétiquement actifs. Adaptation de la technique de la MFFF organisant les nanoparticules magnétiques selon un gradient de concentration exponentiel à proximité d'un obstacle physique tel (c) la paroi d'un canal ou (d) le bord d'une goutte.

1.2.4 Observation de la réponse biologique

Les nanocargos étant supposés être marqués en fluorescence, nous devrions pouvoir suivre en temps réel leur déplacement lors de l'application du champ magnétique. Ceci nous permettra donc d'imager le champ de concentration des protéines RanGTP et/ou RCC1 accrochées à la surface des nanocargos, ceci tout au long des expériences.

En revanche, afin de visualiser la nucléation ainsi que la croissance des microtubules, nous allons compléter les extraits d'ovocytes de xénope avec de la tubuline fluorescente (marquée par de la rhodamine X). Cette tubuline incorporée aux nanotubes polymériques en formation permettra donc d'évaluer le taux de nucléation induit par la concentration magnétique de nanocargos.

Précisons ici que les études d'interactions moléculaires peuvent aussi reposer sur l'utilisation de biosenseurs fluorescents qui constituent des outils de choix pour la détection de biomolécules, notamment au sein de cellules vivantes. Les biosenseurs fluorescents comportent un élément de nature biologique capable de détecter une cible prédéfinie et un module de transduction qui convertit cette reconnaissance en un signal lumineux détectable et mesurable. Plus exactement, lors de la reconnaissance, un changement conformationnel intervient qui implique un changement des propriétés photophysiques du biosenseur comme par exemple un rapprochement donneur/accepteur dans le cas de constructions basées sur le FRET ce qui change le rendement quantique du transfert d'énergie. De tels biosenseurs FRET ont déjà permis de localiser et de suivre la concentration en cours de mitose de RanGTP, de complexes RanGTP –importin β , de complexes tubuline-stathmine et de cargos liés à l'importin β [129, 130, 134].

Nous pourrions utiliser ces outils afin de contrôler par exemple la fonctionnalité des protéines greffées à la surface de nos nanocargos. Ainsi, la délicate opération de biofonctionnalisation doit être réalisée sans altérer la fonction des protéines RanQ69L ou RCC1. L'utilisation d'un biosenseur appelé Rango (Ran-regulated importin β cargo) est dédiée à l'observation de la libération de protéines MAPs permise par la complexation de RanGTP aux importines.

1.2.5 Modèle de réseaux de réactions chimiques

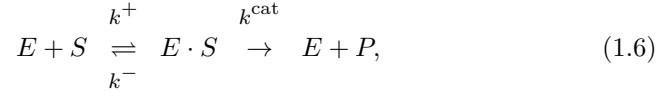
Nous voulons décrire l'évolution dans le temps et dans l'espace des concentrations des différentes espèces composant les systèmes expérimentaux, c'est-à-dire RanGTP, les importines ainsi que les protéines MAPs. Pour ce faire, nous avons reproduit les conditions expérimentales au sein d'un modèle théorique reposant sur un système d'équations de réaction-diffusion. La confrontation de ces résultats révèle alors à l'échelle moléculaire comment le réseau de signalisation génère la nucléation et la croissance des microtubules. En outre, nous nous sommes lar-

gement inspirés des travaux [132, 133, 134] pour lesquels une interprétation de la théorie de la formation des gradients de Ran ainsi que des espèces moléculaires présentes au sein d'extraits acellulaires avait été entreprise.

Les équations de réaction-diffusion

Deux propriétés d'une biomolécule influent sur la variation de sa concentration dans l'espace et dans le temps :

- (i) le transport moléculaire subi par la biomolécule, c'est-à-dire sa capacité à diffuser, caractérisée par son coefficient de diffusion D
- (ii) ses propriétés cinétiques, c'est-à-dire sa capacité à réagir avec les divers espèces en présence, décrites par les différentes constantes cinétiques k . Par exemple, selon l'équation de Michaelis-Menten, la cinétique de transformation d'un substrat S en un produit P par une enzyme E est donnée par



Où, k^+ est la constante cinétique d'association, k^- celle de dissociation et k^{cat} la constante cinétique de catalyse de Michaelis-Menten.

Les espèces mises en présence dans les extraits cytoplasmiques sont alors répertoriées. Les réactions chimiques entre ces espèces sont décrites en écrivant les équations différentielles partielles (Partial Differential Equation, PDE) qui donnent l'évolution de leurs concentrations respectives dans le temps et dans l'espace. Considérons une espèce A du système formant le complexe $A \cdot B$ avec une autre espèce B , produite à partir du substrat S par une enzyme E et qui est impliquée dans la réaction $A + D \xrightarrow{k^{\text{exc}}} F + G$. L'équation différentielle décrivant l'évolution de la concentration de A qu'il faut résoudre est alors

$$\frac{\partial[A]}{\partial t} = D_A \Delta[A] - k^+[A][B] + k^-[A \cdot B] + k^{\text{cat}}[E \cdot S] - k^{\text{exc}}[A][D]. \quad (1.7)$$

Selon la géométrie de l'expérience envisagée, un système d'équations transcrit les interactions protéines-protéines mises en jeu dans le système ainsi que l'évolution de leur concentration respective dans l'espace et dans le temps. Ceci renseigne quant au champ d'opération et à la forme des gradients régulateurs de protéines qui sont générés.

Les valeurs utilisées au sein du modèle

Toutefois, modéliser ces phénomènes au sein de milieux biologiques est une tâche complexe et délicate.

Concernant les propriétés diffusives des molécules impliquées, aucune donnée expérimentale n'est disponible au sein d'extraits cellulaires d'ovocytes de xénope. Pourtant, la diffusion des protéines peut être drastiquement limitée [138] du fait de l'adsorption non spécifique ou d'adhésions spécifiques. Diverses techniques telles que la spectroscopie de corrélation de fluorescence (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) ou le retour de fluorescence après photoblanchiment (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP) permettent l'évaluation en conditions expérimentales des coefficients de diffusion de biomolécules. La FCS enregistre les fluctuations d'intensité de fluorescence produites par l'entrée ou la sortie par diffusion d'un fluorophore au sein d'un volume d'excitation confiné à une dizaine de molécules, soit un volume inférieur à 1 nm^3 environ. Enfin, le FRAP permet la mesure des coefficients de diffusion d'une espèce présente au sein d'extraits acellulaires. Un profil de concentrations non-stationnaire est ainsi généré au sein d'un échantillon fluorescent grâce à la photo-destruction spatialement contrôlée *via* un laser [201]. Initialement, l'échantillon présente une fluorescence homogène. Une impulsion engendrée par deux lasers focalisés au même point de l'échantillon crée une figure d'interférence avec des zones de forte intensité lumineuse et des zones d'obscurité d'une largeur de 1 à $50 \text{ }\mu\text{m}$ [202]. L'intensité de cette impulsion est réglée pour détruire le fluorophore cible dans les zones éclairées en un temps d'environ 1 s. Ensuite, le faisceau destructeur est éteint et l'évolution du profil de fluorescence est enregistrée en fonction du temps avec un seul laser d'intensité beaucoup plus faible. Le fluorophore diffuse alors vers les zones de destruction.

Malheureusement, nous ne disposons pas de l'instrumentation requise pour ce type d'expériences. Nous avons donc choisi d'estimer les valeurs respectives des coefficients de diffusion des molécules intégrées dans notre modèle par le calcul grâce à l'équation de Stokes-Einstein [134]. Plus précisément, la viscosité de tels extraits a été évaluée à 20.10^{-3} Pa.s [204]. Cette valeur importante obtenue s'explique par la présence, à haute concentration de vésicules, ainsi que de protéines et particulièrement de protéines globulaires. Toutefois, diverses méthodes de préparation d'extraits CSF existent impliquant notamment différentes valeurs de vitesse de centrifugation. Une telle disparité de protocoles induit nécessairement une variabilité quant à la concentration finale de protéines présentes au sein de ces extraits. C'est pour cette raison que nous avons choisi une viscosité d'extraits cytoplasmiques comme étant 4 fois supérieure à celle de l'eau [134].

Quant aux propriétés réactionnelles des molécules intervenant dans les mécanismes à l'œuvre, de nombreux travaux ont permis la mesure des différentes constantes cinétiques [132, 134, 133, 139] que nous avons introduites dans notre modèle. Cependant, la principale limitation réside ici en la modélisation des effets encore mal compris de l'encombrement moléculaire [132]. Des protéines

confinées dans un environnement très dense comme les extraits cellulaires voient leurs propriétés réactionnelles changées [132]. En effet, l'encombrement moléculaire peut accroître ou ralentir le taux de réaction entre deux biomolécules [136, 137]. Aucune valeur de constante cinétique au sein d'extraits cellulaires n'étant publiée, les valeurs de constantes cinétiques indexées dans notre modèle sont issues de mesures effectuées par des biochimistes au sein de milieux dilués. Il est clair que les estimations utilisées nécessiteraient un facteur correctif pour rendre réellement compte des mécanismes au sein de milieux denses.

Enfin, signalons que des acteurs moléculaires encore inconnus impliqués dans des voies de signalisation parallèles peuvent notablement modifier le comportement dynamique du système [135].

Validité du modèle

Un nombre important de simplifications est opéré pour construire ce type de modèle. En regard du haut niveau de complexité des systèmes étudiés, ce type de simulations ne constitue en aucun cas une description complète et suffisante d'un système de réactions chimiques et ce, notamment *in vivo*. Dans ce cas, les résultats produits par ces modèles sont uniquement indicatifs, la pertinence de modèles plus quantitatifs étant largement douteuse. Ceux-ci sont en effet issus de simplifications des équations de la cinétique chimique.

Cependant, de telles hypothèses pour des systèmes *in vitro* limitent certes la précision des équations mais sont assez réalistes, et largement employées [134]. Un délicat travail d'expérimentation permet de valider, avec une bonne précision, ces équations. Ce type de simulations vient alors en renfort de l'approche empirique développée au cours de ce travail et permettent de souligner finement des mécanismes moléculaires observés en conditions expérimentales.

Chapitre 2

Résultats

2.1 Préparation des nanocargos biofonctionnalisés

L'étude menée au cours de ce travail comporte un très fort aspect collaboratif et multidisciplinaire. Les avancées de nos travaux sont intrinsèquement liées à la progression de nos partenaires chimistes et biologistes. Avant tout, notre stratégie repose sur la synthèse, par nos collaborateurs chimistes de Rennes, de colloïdes à la taille suffisamment réduite pour un usage intracellulaire, mais aussi, au dopage magnétique suffisamment important pour atteindre une sensibilité acceptable à l'action des gradients de champ magnétique accessibles expérimentalement.

2.1.1 Les nanocargos

Synthèse

La fluorescence des colloïdes est assurée par des quantum dots (QD) de structure cœur/coquille CdSe/ZnS et de diamètre moyen égal à 5 nm dont le spectre d'émission est compris entre 590 et 620 nm. Leur caractère magnétique est garanti par des «magnetic dots» (MD), c'est-à-dire des grains superparamagnétiques d'oxyde de fer $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ d'une dizaine de nanomètre de diamètre. L'étape de solubilisation consiste à co-encapsuler les quantum dots ainsi que les grains d'oxyde ferrique au sein de billes de silice de 30 nm à 40 nm de diamètre ce qui conduit à la synthèse des nanocargos (Fig. 2.1).

Caractérisation structurale par microscopie électronique à transmission

Nous utilisons un microscope électronique à transmission Jeol 2200FS. Nous effectuons principalement des images STEM (scanning transmission electronic

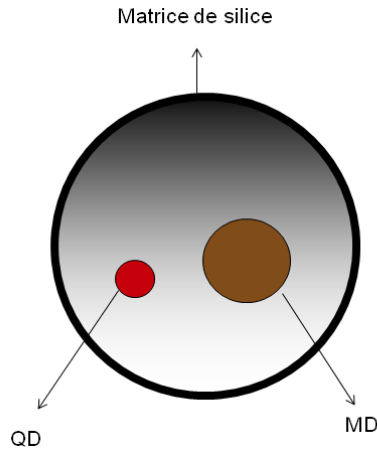


FIGURE 2.1 — Représentation schématique de nanocargos produits par l'équipe de V. Marchi. Ils sont constitués d'un ou plusieurs MD de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ de 10 nm de diamètre ainsi que d'un ou plusieurs QD de 5 nm de diamètre. Cet ensemble est encapsulé dans une matrice de silice formant ainsi un nanocargo d'une taille critique variant de 30 à 40 nm de diamètre.

microscopy), ce mode d'observation se distinguant du TEM classique par le fait que le faisceau électronique est focalisé en un point précis et que ce dernier est balayé de manière récurrente. Plus particulièrement, ceci permet aussi, d'une part, la cartographie par spectroscopie EDX (Energy Dispersive X-ray) et, d'autre part, l'utilisation d'un détecteur aux grands angles. Avec ce dernier, des images à résolution atomique sont réalisées pour lesquelles le contraste est directement lié au numéro atomique des matériaux. De plus, cette technique diffère de la microscopie TEM conventionnelle à haute résolution électronique, car elle ne repose sur aucun contraste de phase nécessitant une interprétation plus longue et plus complexe des résultats. Enfin, ce microscope STEM est équipé d'un correcteur 3D d'aberrations sphériques (jeu de 24 lentilles) sur la sonde STEM et d'une lentille objectif de type ultra-haute résolution. L'association d'un spectromètre d'électrons placé dans la colonne du microscope avec un correcteur d'aberration sphérique est unique en France. Ceci donne à la sonde du STEM une résolution sub-ångströmique rendant possible la visualisation de colonnes atomiques et même d'atomes uniques.

Nous avons pris soin de concentrer les nanocargos à l'aide d'un aimant NdFeB afin de s'assurer qu'un nombre conséquent de ceux-ci soit présent sur la grille porte-échantillon du microscope. Après 24 heures de concentration dans un tube contenant approximativement 20 μL de solution, nous extrayons le surnageant (soit 15 μL) et nous prélevons 1 μL de culot de nanocargos que nous déposons à l'aide d'une micropipette sur une grille en carbone/formvar (Tedpella, Altadena, CA). Nous laissons sécher le tout pendant quelques minutes et l'échantillon est

prêt à être analysé.

Les images STEM sont représentées sur la Figure 2.2. A l'intérieur des billes silicées, nous arrivons à distinguer non seulement les MD mais aussi les QD.

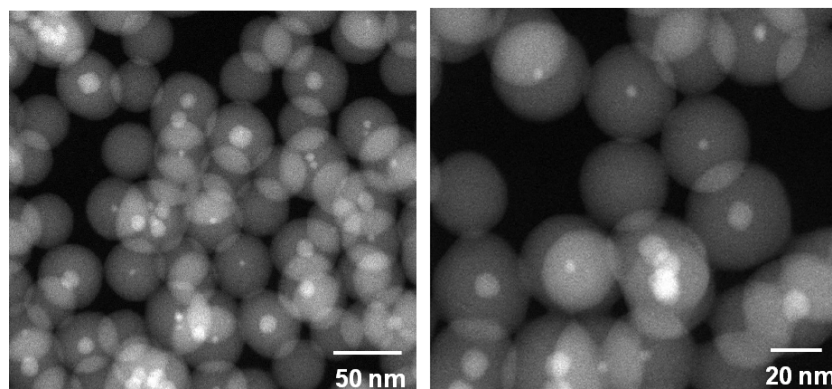


FIGURE 2.2 – Images STEM en champ sombre de nanocargos obtenus sous différents grossissements.

L'analyse STEM nous informe quant à la structure des MD ainsi qu'à leur nature chimique. Le diamètre moyen relevé pour les MD est bien égal à 10 nm.

De plus, puisque la matrice de silice est amorphe et que les performances du microscope nous le permettent, nous pouvons imager le réseau cristalllographique des MD (Fig.2.3). L'analyse par transformée de Fourier nous révèle que une structure cristalline est cubique (symétrie entre les plans imagés égales à 90°). Le paramètre de maille est compris entre 0,37 nm et 0,39 nm. Ces deux constatations confirment que les MD sont bien de la maghémite, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. En outre, l'analyse chimique avec un capteur EDX décèle la présence de fer.

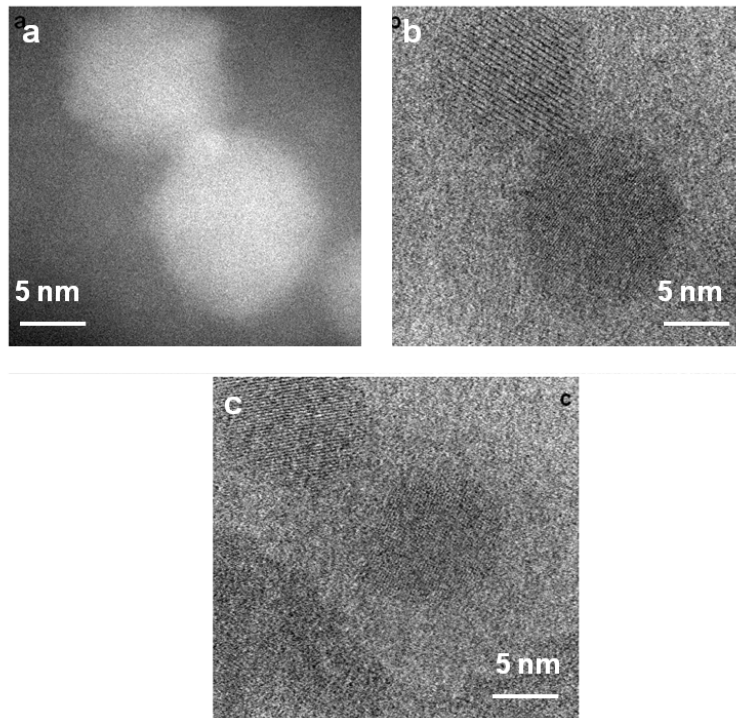


FIGURE 2.3 – Images STEM de MD. (a) champ sombre et (b, c) champ clair. (a, b) Photos du réseau cristallin de deux MD, (c) images des colonnes atomiques formées par un MD. (Barre d'échelle égale à 5 nm).

En revanche, les QD représentent 1/10 voire 1/15 de la taille totale d'un nanocargo, soit environ 5 nm de diamètre en moyenne. Leur taille restreinte est problématique pour l'analyse EDX. En effet, le rayonnement restitué par les QD au sein des nanocargos est difficilement différentiable de celui émis par la matrice de silice pour que l'on puisse récupérer un signal substantiel permettant de déterminer leur nature chimique. En outre, l'obtention de la structure cristalline des QD ne constitue pas non plus une opération facile. Il s'agit d'imager

un système complexe coeur/coquille CdSe/ZnS. Malgré de nombreuses tentatives d'orientations, nous ne disposons pas d'image de réseaux formés par ces structures.

Aucun des objets imagés ne présente plus d'une sous-particule (MD ou QD) encapsulée dans une matrice de silice. En revanche, il y a très peu de nanocargos vides. Toutefois, cette observation peut-être biaisée par la concentration magnétique effectuée préalablement à l'analyse STEM.

Réponse à l'application d'un gradient de champ magnétique

Des tests préliminaires ont été réalisés avec ces nanocargos en utilisant des aimants permanents générant des inductions de l'ordre de 0,5 T. Le mouvement des nanocargos avec un aimant permanent n'est possible que sur des solutions très concentrées (de l'ordre de 1 μ M). Ceci nous indique que le moment porté par les nanocargos est limité. En effet, la force magnétique exercée sur la suspension de nanocargos dépend du moment global porté par les nanocargos de la solution qui est lui même lié à la fraction volumique en particules (cf. Equations 2.37 et 2.38 Annexe 2.D). Par ailleurs, les tests sur des surfaces micro-structurées par des plots de nickel ont montré que ces structures rendues magnétiquement actives par l'application d'un champ magnétique ne permettaient pas la formation de colonnes de nanocargos.

Au vu de ces résultats, le principal facteur empêchant l'utilisation des nanocargos est leur trop faible dopage magnétique. La présence d'un seul MD par nanocargo ainsi que leur réponse uniquement en solution concentrée laissent sceptique quant à leur intérêt pour la perturbation de réseaux de réactions.

Pour lever ces limitations, il faut enrichir les nanocargos en nanoparticules magnétiques puisque l'intensité maximale de champ magnétique disponible en laboratoire est fixée. Toutefois, une telle solution est difficilement applicable. Il s'agit d'intégralement reconsidérer la stratégie de co-solubilisation des deux types de nanobilles composant nos nano-systèmes ce qui représente un fastidieux travail de synthèse et d'optimisation. En outre, une incorporation plus importante de grains magnétiques implique aussi une augmentation du volume final des nanocargos. Une taille supérieure à 200 nm de diamètre semble difficilement compatible avec une étude de processus intracellulaires.

2.1.2 Les nanobilles superparamagnétiques

Il nous a donc semblé plus pertinent d'utiliser pour nos expériences des nanobilles superparamagnétiques commerciales de 120 nm de diamètre (Ademtech). De la même manière que pour les nanocargos, nous avons donc procédé à la caractérisation de la structure ainsi que des propriétés magnétiques de ces

nanobilles.

Caractérisation structurale par microscopie électronique à transmission

L'échantillon analysé consiste en une solution aqueuse d'un microlitre de nanobilles superparamagnétiques de concentration égale à 25 nM, délicatement déposée et séchée sur une grille en carbone/formvar (Fig.2.4).

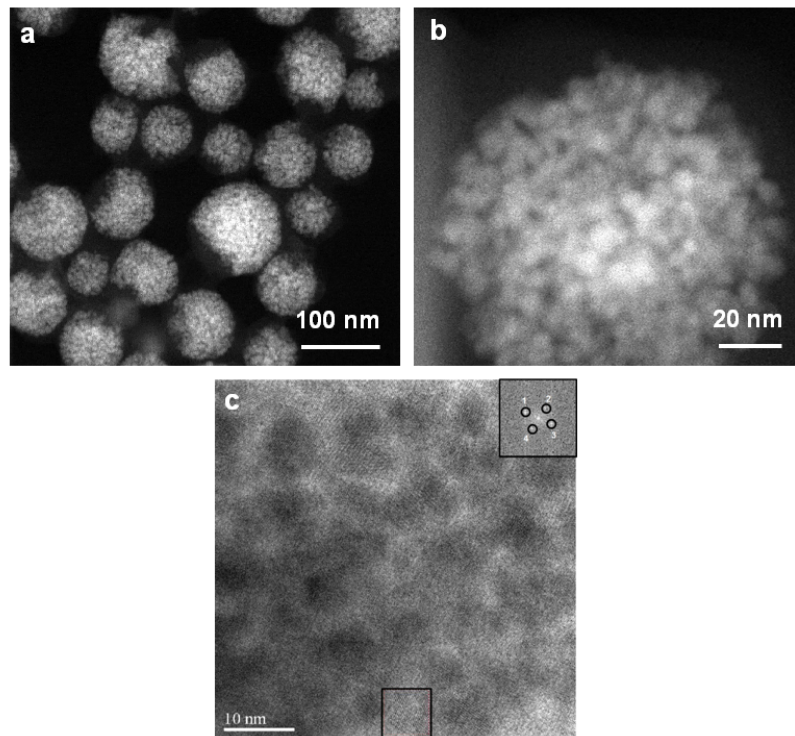


FIGURE 2.4 – Images STEM de nanobilles superparamagnétiques de 120 nm de diamètre. (a-b) en champ sombre sous divers grossissements et (c) en champ clair. La transformée de Fourier de la zone sélectionnée en bas de l'image est insérée en haut à droite de l'image. Les cercles noirs signalent les points qui correspondent aux plans du réseau cristallin formés par les grains d'oxyde ferrique.

L'analyse des nanobilles superparamagnétiques commerciales montre bien qu'elles sont composées d'un coeur dur coalescent de grains d'oxyde ferrique dont le diamètre moyen atteint 10 nm.

Plus exactement, nous imageons un réseau cristallin puis nous effectuons la transformée de Fourier de la structure formée par les colonnes atomiques constituant les grains d'oxyde ferrique. Chacun des points obtenus sur l'image de la transformée de Fourier correspond à une succession de plans cristallins. L'orientation entre les plans est obtenue en évaluant les valeurs des angles for-

més par les plans détectés (Fig.2.4c). Les angles du réseau relevés ne signalent pas de symétrie à 90° . Quant aux valeurs des distances entre plans réticulaires, nous obtenons trois valeurs distinctes égales à 3, 2,6 et 2,2 Å. En outre, nous utilisons la méthode de Debye-Scherrer pour estimer la nature ainsi que la structure cristalline de notre échantillon (cf Annexe2.1). Les paramètres cristallins déterminés par cette méthode sont relatifs à l'hématite dont la structure est rhomboédrique. Toutefois, il est très important de noter que cet examen vaut pour la position spatiale pour laquelle ce type d'analyse est effectuée. Il est tout à fait possible que, pour un autre emplacement sur l'échantillon, un oxyde ferrique différent tel que la maghémite soit détecté vu que l'oxyde de fer se stabilise sous diverses formes. L'hématite détectée représente alors peut-être des produits de cette réaction d'oxydation.

Réponse à l'application d'un gradient de champ magnétique

A partir de considérations expérimentales (cf. Annexe2.2 et cf. Annexe2.3), théoriques (cf. Annexe2.4) et calculatoires (cf. Annexe2.5), nous avons élaboré en parallèle un modèle robuste permettant de prédire les profils de concentration de nanobilles obtenus à l'approche d'un aimant près d'une suspension statique de particules magnétiques. Afin d'examiner la validité et la fiabilité de notre modèle, de premiers prototypes de micro-dispositifs magnétiques ont été conçus (Fig. 2.5). Ces premières expérimentations effectuées à l'aide des nanobilles superparamagnétiques ont révélé des pistes intéressantes pour la génération de gradients de nanobilles satisfaisants pour l'application qu'en ont nos partenaires biologiques (Fig. 2.5a-b et Fig. 2.5d-e).

Ces tests nous montrent que les nanobilles superparamagnétiques répondent aux divers gradients de champ magnétique générés par les diverses stratégies envisagées. Par ailleurs, des plots de matériaux ferromagnétiques de 1 à 3 μm espacés de quelques μm s'avèrent plus adaptés pour la manipulation contrôlée de nanobilles par rapport à des structures de taille millimétrique (Fig. 2.5c et f)

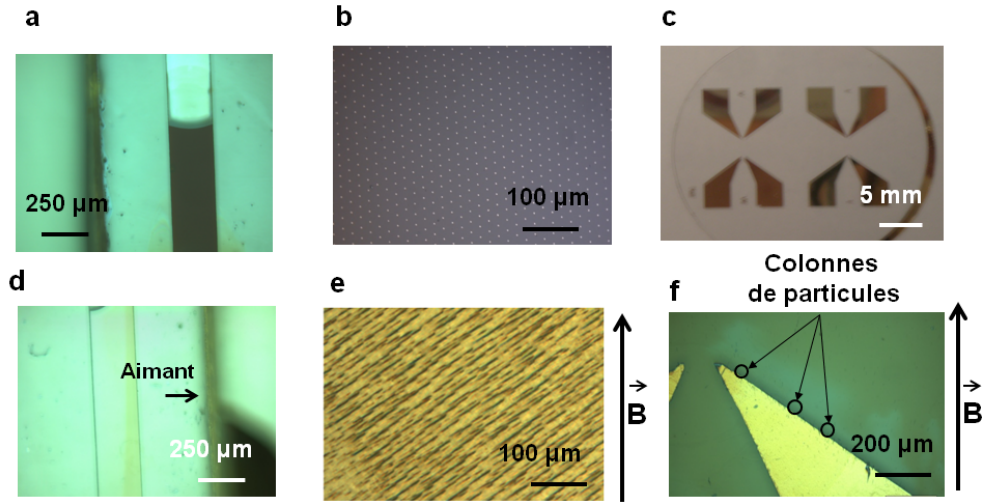


FIGURE 2.5 – Les divers prototypes magnétiques réalisés. Un gradient contrôlé de nanobilles superparamagnétiques en suspension peut être obtenu (a) en injectant la solution de particules dans un canal microfluidique et (d) en approchant près d’une paroi du canal un aimant permanent, les nanobilles s’accumulent en formant un profil de forme exponentielle. Une autre méthode consiste (b-c) à déposer des micro-structures de matériaux magnétiquement actifs, (e-f) à l’application d’un champ magnétique uniforme, les nanobilles s’alignent.

2.1.3 La fonctionnalisation des nanobilles par les protéines Ran et RCC1

La réponse magnétique des nanobilles superparamagnétiques étant garantie, nos collaborateurs chimistes et biologistes ont élaboré un protocole de greffage adapté aux protéines intervenant dans le réseau régulant la formation du fuseau mitotique. Pour ce faire, les protéines RanQ69L et RCC1 avec à leur extrémité une étiquette moléculaire 6–histidines ont été obtenues grâce à l’utilisation des technologies d’ADN recombinants et des méthodes biochimiques de purification [75]. Les nanobilles magnétiques encapsulées dans une coquille de polymère hydrophile sont achetées avec à leur surface une fonction carboxylique. Les nanobilles ainsi fonctionnalisées et les protéines régulatrices des microtubules à greffer sont mises en présence avec un cation divalent type nickel ou cobalt. Le groupement 6–histidines porté respectivement par les protéines Ran–6His et RCC1–6His favorise l’affinité de ces protéines avec les ions divalents présents autour des nanobilles magnétiques.

La bio-activation des nanobilles par les protéines Ran-6His ou RCC1-6His est ensuite vérifiée au sein d’extraits d’œufs de xénope, où la nucléation et l’assemblage des microtubules peuvent être observés.

Toutefois, cette expérience a révélé une limitation majeure. Une fois les nanobilles agrégées sous l’influence d’un champ magnétique, du fait du couplage

à la protéine d'intérêt, une adhésion irréversible voit le jour. Les nanobilles ne peuvent redevenir browniennes. Dans ces conditions, quelque soit la technique envisagée (type MFFF ou génération de forts gradients de champ magnétiques grâce à des matériaux magnétiquement actifs), à l'application d'un gradient de champ magnétique, les particules vont s'assembler sous forme d'agrégats. Ce phénomène nous a amené à reconsidérer nos choix de stratégies pour la génération de gradients de champ magnétiques localisés.

2.1.4 Les stratégies mises en œuvre

Les nanobilles bio-activées ne se redispersant pas après application du champ magnétique, deux solutions s'imposent. Il est possible de développer une stratégie limitant leur attachement irréversible en introduisant par exemple des «impuretés» dans les extraits, c'est-à-dire une concentration contrôlée de nanobilles magnétiques capable de s'intercaler entre deux nanoparticules bio-activées empêchant ainsi leur collage irréversible. Ou alors, il s'agit de concevoir des systèmes spécialement étudiés pour que le profil adopté par les nanoparticules à l'application du champ soit spatialement et temporellement compatible avec les conditions de notre étude. Du fait de notre habilité à contrôler précisément les gradients de champ magnétique, nous avons privilégié cette deuxième solution. Le design des microsystemes va donc être adapté et optimisé pour obtenir, dès la première et unique application du gradient de champ magnétique, l'assemblage désiré par l'expérimentateur.

Une première expérience repose sur l'encapsulation des extraits acellulaires contenant les nanobilles superparamagnétiques fonctionnalisées par les protéines RanQ69L/RCC1 dans des microémulsions formant des gouttes de 40 à 80 μm de rayon (Fig.2.6a). A l'approche d'un aimant permanent, les nanobilles contenues dans l'extrait s'agrègent au bord de la goutte en 2 à 3 minutes sur une zone 10 μm . En outre, cette opération n'implique pas de perte de milieu par évaporation, la présence d'huile autour des gouttes formées empêchant les échanges avec le milieu extérieur en cours d'expérience (Fig.2.6b).

Ce type de manipulation nous permet d'analyser les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'auto-organisation de microtubules et ce, pour diverses concentrations en protéines Ran ou RRC1 (Fig.2.6c) (cf.2.2) .

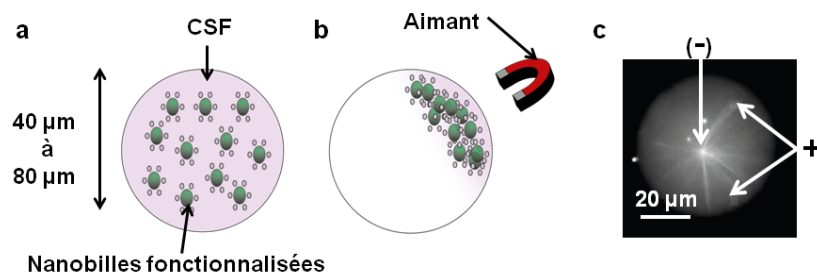


FIGURE 2.6 – Concentration magnétique de nanobilles bioactives au sein de micro-émulsions. (a) Les nanobilles fonctionnalisées par des protéines essentielles à la nucléation de microtubules sont encapsulées au sein de micro-émulsions d'extraits d'œufs de xénope d'un diamètre compris entre 40 et 80 μm . (b) Un aimant permanent permet l'agrégation des nanobilles conjuguées aux protéines régulatrices des microtubules. (c) L'agrégat de nanobilles permet la nucléation de microtubules et la croissance au sein de la goutte d'extraits.

Une autre technique repose sur la formation d'un réseau micro-structuré de plots de matériau ferromagnétique (cf.2.3). Soumis à une excitation magnétique, chaque élément de ferromagnétique s'aimante créant un champ magnétique local non-uniforme. Ainsi, si la suspension de nanobilles fonctionnalisées immergées dans un canal microfluidique déposé sur un tel réseau (Fig.2.7a) est soumise à un champ magnétique extérieur uniforme, il se forme des colonnes dont le diamètre peut, selon les conditions, varier entre la taille d'une particule et plusieurs microns (Fig.2.7b). Les paramètres critiques qui contrôlent l'organisation et la taille du réseau de colonnes sont : la concentration en nanobilles, la hauteur ainsi que la largeur du microcanal et le pas des plots ferromagnétiques.

Par ailleurs, des colonnes de nanoparticules se forment aussi lorsque les nanoparticules sont immergées dans un canal microfluidique soumis à un champ magnétique extérieur, et ce sans dépôt préalable d'un réseau de plots de nickel. C'est grâce à ce type d'expérimentations que nous avons suivi le comportement des microtubules au sein d'un environnement compétitif de taille contrôlée (Fig.2.7c) (cf.2.3).

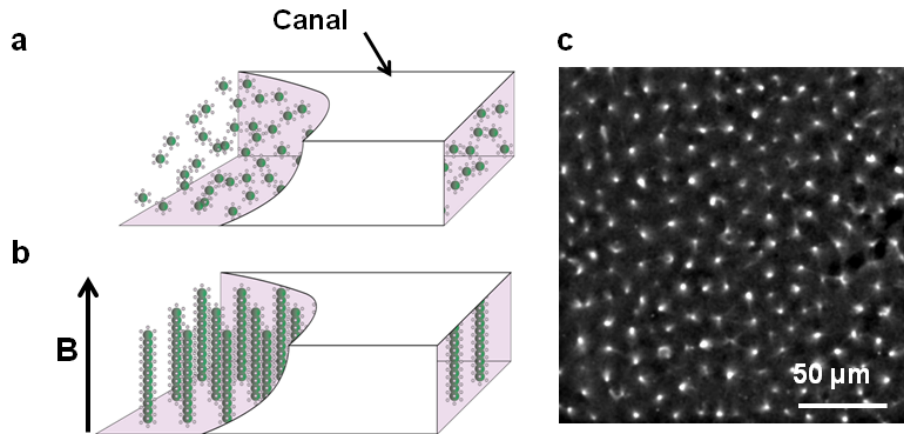


FIGURE 2.7 – Génération de colonnes de protéines bioactives au sein de canaux microfluidiques. (a) Les nanobilles biofonctionnalisées sont immergées au sein d'un micro-canal de polymère (b) à l'application d'un champ magnétique homogène, des colonnes de nanobilles bioactives s'établissent en quelques minutes formant un réseau dont la taille est contrôlée par l'expérimentateur. (c) L'image en fluorescence du canal microfluidique montre qu'au dessus d'une certaine concentration seuil de protéines régulatrices, les colonnes de nanobilles fonctionnalisées par RanGTPQ69L deviennent autant de «centres nucléateurs» de microtubules réparties au sein d'un réseau de pas hexagonal et de taille comprise entre 10 μm et 20 μm .

2.2 Spatiotemporal control of microtubule nucleation and assembly using magnetic nanoparticles

Résumé de la méthodologie implémentée

Dans cet article, des nanobilles superparamagnétiques fonctionnalisées par la protéine RanGTPQ69L ou la protéine RCC1 sont encapsulées au sein d'extraits acellulaires sous forme de microémulsions de 40 à 80 nm de rayon. A l'approche d'un aimant permanent, ces nanobilles contenues dans l'extrait s'agrègent au bord de la goutte en 2 à 3 minutes sur une zone 10 µm et génèrent des asters de microtubules en 15 à 20 minutes.

Ce type de manipulation nous permet d'analyser les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'auto-organisation de microtubules et ce, pour diverses concentrations en protéines Ran ou RCC1 et plus exactement, d'examiner à quelle distance des chromosomes les facteurs responsables de la nucléation et de la croissance des microtubules peuvent-ils agir ?

Ma contribution aux résultats présentés dans cet article

Au cours de ce travail, je me suis concentrée dans un premier temps sur la sélection des aimants permanents afin que les nanobilles fonctionnalisées s'agrègent de manière satisfaisante spatio-temporellement, c'est-à-dire, sur quelques micromètres en quelques minutes. Pour ce faire, j'ai choisi des aimants Néodyme-Bore-Fer qui atteignent des valeurs de champ rémanent comprises entre 1 T et 1,5 T. En outre, la géométrie des aimants influant sur les champs magnétiques produits par ces derniers, j'ai sélectionné des aimants dont le rapport hauteur sur longueur est le plus petit possible (aimants de forme rectangulaires par exemple) car ils créent, lorsqu'ils sont placés au plus près de la zone cible un champ magnétique dont l'intensité ainsi que l'homogénéité est maximale.

J'ai aussi élaboré un modèle reposant sur un système d'équations de réaction-diffusion décrivant l'évolution dans le temps et dans l'espace des concentrations des différentes espèces composant nos microémulsions expérimentales, c'est-à-dire RCC1, RanGTP, les importines ainsi que les protéines MAPs. La confrontation de ces résultats révèle alors à l'échelle moléculaire comment le réseau de signalisation Ran/RCC1 génère la nucléation et la croissance des microtubules.

Spatiotemporal control of microtubule nucleation and assembly using magnetic nanoparticles

Céline Hoffmann¹, Elsa Mazari², Sylvie Lallet³, Roland Le Borgne^{3,4}, Valérie Marchi⁵, Charlie Gosse² and Zoher Gueroui^{1*}

Decisions on the fate of cells and their functions are dictated by the spatiotemporal dynamics of molecular signalling networks. However, techniques to examine the dynamics of these intracellular processes remain limited. Here, we show that magnetic nanoparticles conjugated with key regulatory proteins can artificially control, in time and space, the Ran/RCC1 signalling pathway that regulates the cell cytoskeleton. In the presence of a magnetic field, RanGTP proteins conjugated to superparamagnetic nanoparticles can induce microtubule fibres to assemble into asymmetric arrays of polarized fibres in *Xenopus laevis* egg extracts. The orientation of the fibres is dictated by the direction of the magnetic force. When we locally concentrated nanoparticles conjugated with the upstream guanine nucleotide exchange factor RCC1, the assembly of microtubule fibres could be induced over a greater range of distances than RanGTP particles. The method shows how bioactive nanoparticles can be used to engineer signalling networks and spatial self-organization inside a cell environment.

Q1 One of the major challenges in the post-genomic era is to decipher the spatiotemporal dynamics of signalling pathways involved in cell fate decisions. In particular, signalling proteins are not randomly distributed in cells, but are locally concentrated either on cellular membranes, in intracellular organelles or in the cytoplasm. This creates spatial heterogeneity in compound concentration and gradients in enzymatic activity¹ that may control signalling pathways and information transfer², thereby dictating cellular behaviour³. Therefore, the ability to quantitatively control the spatiotemporal and dynamic properties of cellular information processing is essential for understanding biological systems.

Q2 One effective method for dissecting cellular functions relies on perturbing the spatial and temporal organization of specific molecular components. Perturbations using small chemicals⁴ or light-sensitive molecules^{5,6} are now exploited to understand biological functions⁷. For instance, gating activity by light-switchable interactions (allostery, scaffolding) using optogenetic tools has become a promising approach for localizing signalling pathways^{8,9}. In addition, engineering essential functional units such as switches, oscillators and logic gates¹⁰ offers the possibility to design specific cellular tasks and create novel functionalities^{11,12}. Synthetic biologists have successfully focused on engineering genetic circuits, and have now started to rewire cellular signalling circuits¹³. In this context, magnetic actuation of nanoparticles provides a novel strategy for controlling cells that is complementary to genetic, chemical and optogenetic tools¹⁴. For instance, recent key experiments have demonstrated the magnetic actuation of signalling pathways using nanoparticles conjugated to antibodies by inducing the clustering of extracellular receptors^{15,16} or through endocytic internalization¹⁷. In these studies, nanoparticles are no longer passive reporters of biomolecules, but upon interaction with a magnetic field actuate a biological response.

Q3 Here, we present an original strategy using magnetic nanoparticles directly conjugated to key regulatory proteins to modulate

intracellular signalling pathways in space and time (Fig. 1a). As a first step towards *in vivo* manipulations, we used a functional cytoplasm reconstituted from *Xenopus* eggs. Such cell extracts have provided a powerful system for dissecting mitotic spindle morphogenesis; they permit biochemical manipulations and cell cycle control, while offering very good optical properties when compared to the difficulties inherent to the imaging of large embryonic cells^{18,19}. Moreover, this membrane-free system allows the direct delivery of nanoparticles in the cytoplasm, without relying on endocytosis or requiring microinjection.

Q4 We focus on the spatial manipulation of signalling pathways controlling the morphogenetic properties of cells. Such pathways use small G-proteins that act as molecular switches²⁰, and their conversion from inactive (GDP) to active (GTP) conformations promotes interaction with downstream effectors. Interestingly, the reaction cycles of these proteins are tightly coupled to their diffusion, contributing to generate intracellular symmetry breaking²¹. More specifically, we investigate the Ran/RCC1 signalling network, which regulates microtubule self-assembly during mitosis^{22–26}. To spatially control microtubule assembly, we first conjugate superparamagnetic nanoparticles to RanGTP (Ran-NPs) and RCC1 (RCC1-NPs) proteins and demonstrate the efficiency of the magnetic modulation of signalling pathways in cell extracts. We show that RanGTP proteins conserve their signalling functions when fixed with magnetic nanoparticles. Furthermore, these bioactive nanoparticles can be manipulated using magnetic forces, in a viscous cell cytoplasm, on a timescale from a second to a minute. Given the ultrasensitive response of microtubule assembly to Ran-NP concentration input, we designed a spatiotemporal bio-inspired switch that is triggered by a magnetic field. Magnetically induced microtubules assemble into an asymmetric array of polarized fibres, the orientation of which is dictated by the direction of magnetic forces. We then use the guanine exchange factor RCC1 to trigger microtubule assembly. In contrast to experiments performed with Ran-NPs, we

¹Département de Chimie, Ecole Normale Supérieure, UMR 8640 CNRS-ENS-UPMC Pasteur, 24, rue Lhomond, 75005 Paris, France, ²Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, LPN-CNRS, route de Nozay, 91460 Marcoussis, France, ³CNRS, UMR 6290, Institut de Génétique et Développement de Rennes, F-35043 Rennes, France, ⁴Université Rennes 1, UEB, IFR 140, Faculté de Médecine, F-35043 Rennes, France, ⁵CNRS UMR 6226, Université Rennes 1, Sciences Chimiques de Rennes, Campus de Beaulieu, F-35042 Rennes, France. *e-mail: zoher.gueroui@ens.fr

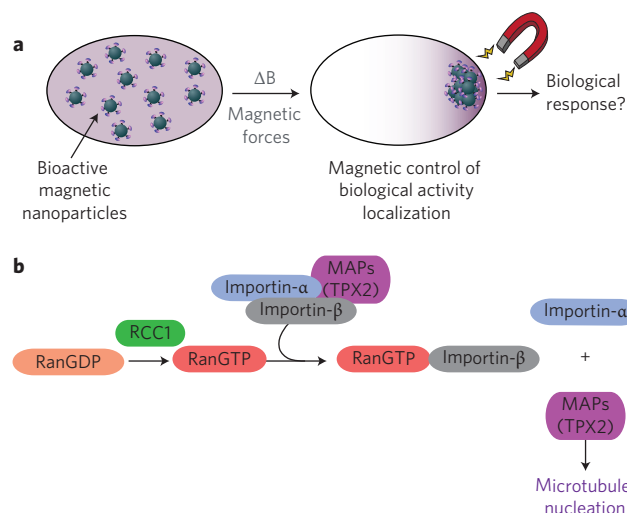


Figure 1 | Magnetic nanoparticles bioconjugated to signalling proteins controlling microtubule assembly. **a**, Bioconjugated magnetic nanoparticles are guided throughout the cell cytoplasm with magnetic fields to localize the signalling pathways in space and time. **b**, Simplified schematic of the RCC1/Ran signalling network involved in microtubule nucleation and regulation during mitosis. RCC1 promotes conversion from the GDP (inactive) to GTP (active) conformations of Ran. Interactions between RanGTP and importin- β induce the release of MAPs such as TPX2, which consequently trigger microtubule nucleation and regulation.

when assembled with uncoupled Ran (Fig. 2b, inset). Aster assembly was also observed above a sharp threshold around $4\text{ }\mu\text{M}$, similar to the results obtained with uncoupled Ran proteins (Fig. 2b). The efficiency of aster formation as a function of RanGTP concentration, for both free RanGTP and Ran-NPs, followed a sigmoidal curve characteristic of highly cooperative and ultrasensitive responses (with a threshold of 4.1 and $4.2\text{ }\mu\text{M}$ respectively, Fig. 2a,b)²⁸. These results indicate that Ran has conserved its regulatory function after conjugation to the nanoparticles.

This signalling pathway requires specific interactions between RanGTP and importin proteins to release and activate the microtubule associated proteins (MAPs) involved in microtubule assembly (Fig. 1b). To test the ability of Ran-NPs to interact with importins, we used the fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensor Rango (Ran-regulated importin- β cargo) (Fig. 2c,d)²⁹. This FRET sensor has two conformations. When Rango interacts with importins, energy transfer between cyan fluorescent protein (CFP) and yellow fluorescent protein (YFP) is partially prevented, whereas upon interaction of importins with RanGTP, energy transfer between fluorescent proteins should increase (FRET signal, Fig. 2c). Using a spectrofluorimeter, we measured changes in the FRET ratio, determined as $I_{\text{YFP}}/I_{\text{CFP}}$, with increasing concentrations of Ran-NPs added to the extract (Fig. 2e, see Supplementary Information). We found an increase in the FRET ratio of 25%, in agreement with controlled experiments performed with uncoupled RanGTP (Fig. 2d, Supplementary Fig. S2). Therefore, even when attached to the surface of nanoparticles, RanGTP is able to recruit importin proteins. This step is essential for signal transduction, leading to the release in the cytoplasm of the MAPs that enhance microtubule nucleation and stabilization²⁶ (Fig. 1b).

Magnetic bio-inspired switch triggering microtubule assembly

We used the ultrasensitive response to varying concentrations of Ran to design a spatiotemporal biochemical switch allowing microtubule nucleation under magnetic control (Fig. 3a). Starting from a RanGTP concentration under the threshold for microtubule nucleation, the application of a magnetic field gradient will spatially concentrate Ran-NPs and trigger microtubule assembly by locally exceeding the concentration threshold.

First, to reproduce the physical confinement conditions existing in cells, we encapsulated *Xenopus* extracts within spherical droplets with typical diameters ranging from 40 to $80\text{ }\mu\text{m}$ by forming an emulsion of the extract within oil (see Methods)^{30,31}. In these confined extracts, when Ran-NPs were at a concentration above the microtubule nucleation threshold ($\sim 6\text{ }\mu\text{M}$ for instance), we observed microtubule asters after 30 min of incubation. In these conditions, asters were generally positioned so that their poles were located next to the geometrical centre of the extract droplet (Fig. 3b). This assay therefore provides a means to examine the enhancement of microtubule self-organization by Ran-NP signalling in a confined geometry.

Second, to manipulate biologically active magnetic nanoparticles throughout the cytoplasm, we used a permanent NdFeB magnet (see Methods). Using Hall probe measurements, we worked out that the sample was submitted to a 0.15 T magnetic field, generating a gradient of $\sim 50\text{ T m}^{-1}$ on the nanoparticles. Figure 3c demonstrates a typical example of Ran-NP accumulation, at a final nanoparticle concentration of 2 nM in the cell extract, induced by a magnetic field. When the magnetic field had been applied for 10 s , Ran-NPs had moved throughout the cytoplasm, and within 90 s they had migrated several micrometres to reach the boundary of the extract droplet ($\sim 0.5\text{ }\mu\text{m s}^{-1}$) (Fig. 3c, Supplementary Movie S1). After 120 s , a strong accumulation of Ran-NPs was observed in the direction of the magnet, in the vicinity of the droplet boundary. Electron microscopy observations of such clusters

1 found that microtubule assembly is induced by RCC1-NPs over
2 greater distances within the cytoplasm. Our ability to control
3 protein positioning in space allowed us to perform a computational
4 analysis based on reaction-diffusion processes to explain how sig-
5 nalling cascades generated by nanoparticles can carry signalling
6 pathways over several micrometres within cells, and therefore con-
7 tribute to the generation of spatial patterns at the cellular scale.

Magnetic nanoparticles controlling microtubule assembly

8 As a first step towards the spatial manipulation of the Ran/RCC1
9 network, we evaluated the bioconjugation of active RanGTP to
10 magnetic nanoparticles (Ran-NPs), the biofunctionality of the
11 Ran-NPs, and their ability to induce microtubule nucleation. We
12 focused on RanQ69L-GTP, a Ran mutant locked in its GTP-
13 bound active state that stimulates microtubule polymerization²³
14 (Fig. 1b). We obtained Ran-NPs by conjugating purified recombi-
15 nant proteins to 120 nm iron oxide nanoparticles coated with
16 carboxylic-functionalized polymer in the presence of chelating
17 nickel ions (see Methods). We characterized both the stoichiometry
18 and the stability of the bioconjugated complexes. After several
19 hours, we observed that almost 70% of the protein initially bound
20 to nanoparticles remained conjugated (Supplementary Fig. S1).

21 *Xenopus* extracts are an excellent system with which to examine
22 the functionality of Ran-NPs, because they permit a quantitative
23 determination of microtubule assembly efficiency. Microtubule
24 nucleation events were quantified by fluorescence microscopy for
25 increasing concentrations of purified RanQ69L-GTP added to
26 *Xenopus* egg extracts ($1\text{--}6\text{ }\mu\text{M}$). Microtubule fibres were detected
27 by supplementing the extracts with 100 nM of fluorescently labelled
28 tubulin (Supplementary Methods). We found that microtubules
29 nucleated above a specific concentration of RanGTP ($\sim 4\text{ }\mu\text{M}$)
30 and self-organized within 30 min into very stereotyped radial
31 arrays called asters (Fig. 2a, inset). Below this concentration
32 threshold, nucleation events were almost non-existent, in agreement
33 with results obtained previously²⁷. Next, using Ran-NPs, we found
34 that the complexes triggered microtubule nucleation and aster self-
35 organization with a morphology and a timescale similar to those

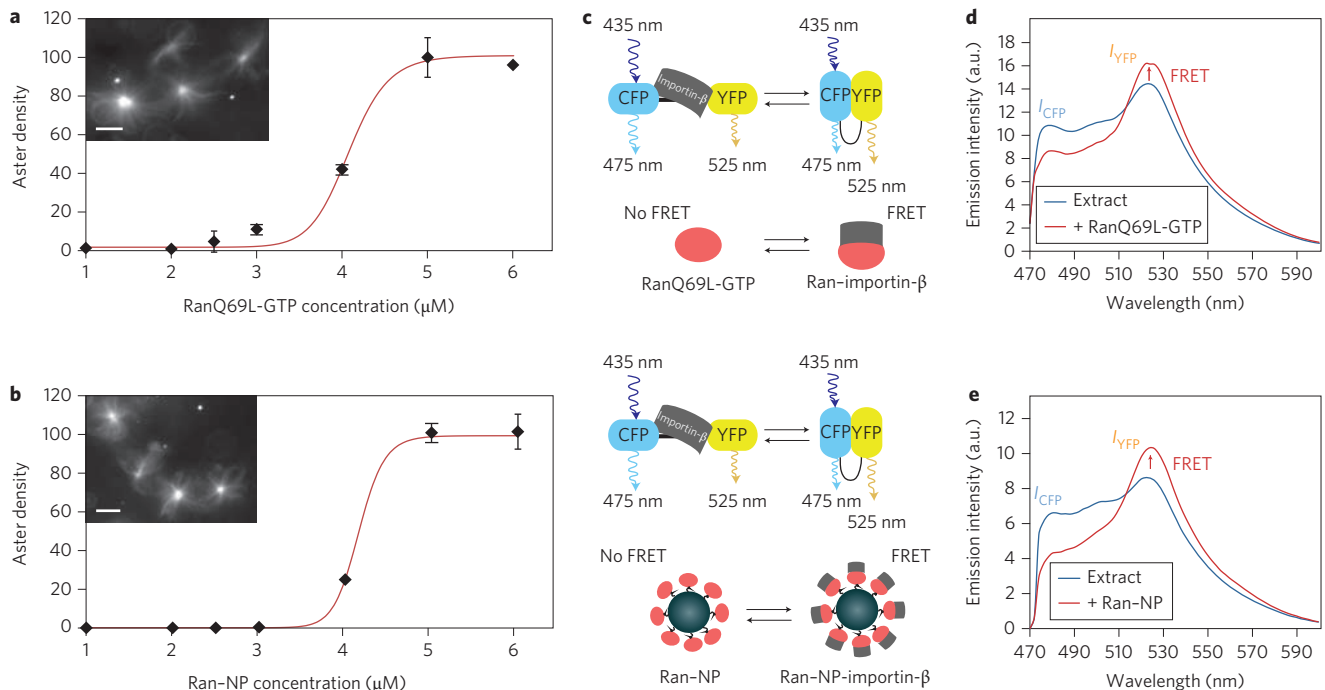


Figure 2 | Microtubule assembly induced by bioconjugated magnetic signalling proteins. **a, b**, Microtubule nucleation and aster assembly are ultrasensitive to the concentration of RanQ69L-GTP (**a**) or Ran-NPs (**b**). Aster density was determined by fluorescence microscopy and normalized to reach 100% for the plateau at the highest RanGTP concentration. Insets (**a, b**): examples of observation (by fluorescent microscopy) of microtubule asters after addition of 6 μM of RanQ69L-GTP or Ran-NPs. Scale bars, 10 μm . **c–e**, Detection of Ran-NPs–importins interactions using FRET biosensors: schematic (**c**) of FRET biosensor conformation changes as a function of the interactions between Ran–importins and Ran–NPs–Importins; fluorescence spectra (**d, e**) of energy transfer of the biosensor (2 μM) excited at 435 nm after 10 min incubation in the cell extract (blue line) and 20 min after the addition of 6 μM RanQ69L-GTP (**d**, red line) or 6 μM Ran-NPs (**e**, red line).

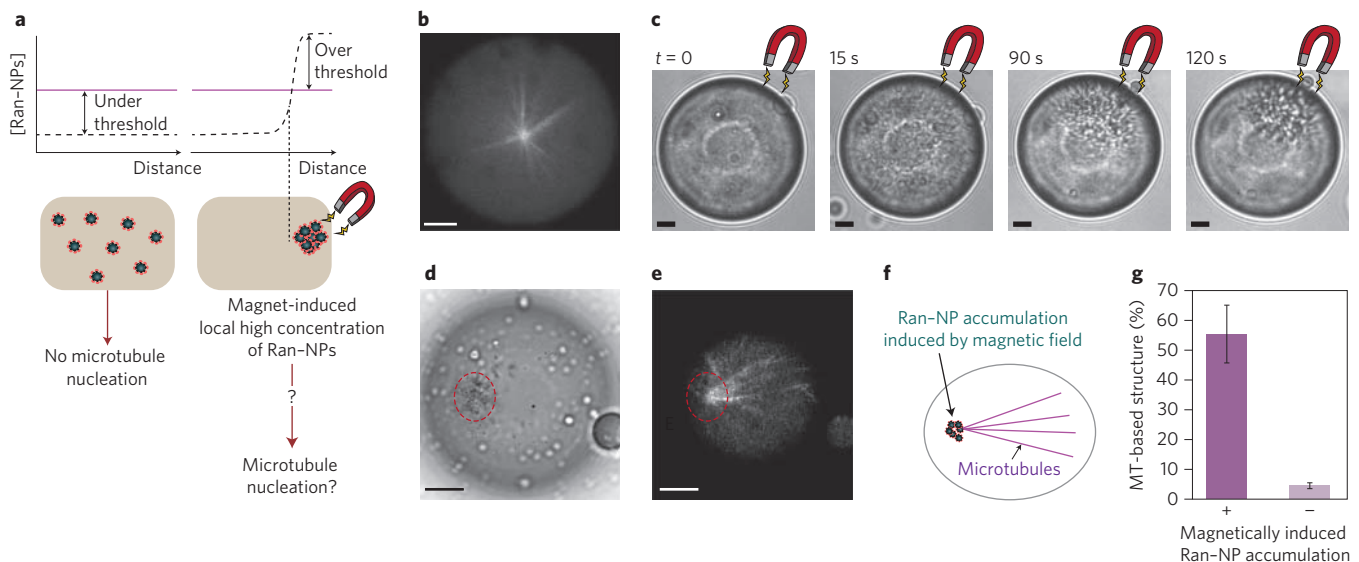


Figure 3 | Magnetic control of microtubule nucleation and assembly. **a**, Principle of the spatial biochemical switch triggering microtubule nucleation. A gradient of the magnetic field is used to direct and concentrate the nanoparticles to a restricted localization, and on surpassing the RanGTP concentration threshold will trigger the signalling cascade leading to microtubule assembly. **b**, Fluorescent observation of a microtubule aster induced with 6 μM Ran-NPs within a cell extract droplet. **c**, Dynamic of Ran-NP ([NPs] = 2 nM final) accumulation under a magnetic field within a 60 μm extract droplet using bright-field illumination. **d, e**, Microtubule nucleation induced by accumulation of Ran-NPs under a magnetic field: visualization of Ran-NP accumulation under bright-field illumination (**d**) and microtubule observation using fluorescence microscopy (**e**). The initial concentration of Ran-NPs is 2 nM (1.5 μM Ran). **f**, Schematic representation of co-localized microtubule array with Ran-NP accumulation. **g**, Quantification of microtubule structures co-localizing with Ran-NP accumulation (+) or assembled with no Ran-NP accumulation (nine independent experiments, $n = 548$ extract droplets). Ran-NP accumulation is indicated by a red dotted circle in **d** and **e**. Scale bars, 10 μm .

revealed that they were organized in a close-packed fashion (Supplementary Fig. S3). We estimated the forces applied on the nanoparticles to be ~ 10 fN per individual nanoparticle, which corresponds to ~ 100 – 200 pN when nanoparticles are organized into clusters (see Supplementary Information for details). The magnetic forces are therefore sufficient to overcome the dissipative friction from the viscosity of the cytoplasm (20 mPa s), and the Ran–NPs can be directed and clustered on a second to minute timescale.

Next, to validate the concept of a spatial biochemical switch, we used Ran–NPs dispersed homogeneously in the cytoplasm at a concentration below the microtubule nucleation threshold (for example, 1.5 μ M). The magnetic field was then applied to guide Ran–NP accumulation to a specific position within the droplet space (Fig. 3d, Supplementary Fig. S3). Remarkably, after the magnetic field had been applied for 20–30 min, we observed fluorescent microtubule bundles. In addition, the timescale of microtubule assembly was similar to that observed with uncoupled RanQ69L-GTP proteins and is consistent with the microtubule fibre polymerization rate in extracts, which is ~ 0.5 – 2 μ m min^{-1} . In those droplets, microtubules organized predominantly in asymmetric fibre arrays, with their extremities forming a pole that co-localized with Ran–NP accumulation in the vicinity of the droplet boundary (Fig. 3d–f, Supplementary Fig. S4). We found that aster assembly, following magnetic accumulation, was robustly triggered for a large range of protein-to-nanoparticle ratios, but that a minimum of 0.4 μ M Ran was necessary to enhance microtubule nucleation (Supplementary Fig. S4b and Methods). Moreover, the magnetic accumulation of incompetent Ran conjugated to nanoparticles within extracts failed to trigger aster assembly, ruling out the possibility to non-specifically concentrate microtubule nucleation factors from the extract (Supplementary Fig. S4c). We then quantified the effect of magnetic accumulation of Ran–NPs on microtubule nucleation. We found that in the presence of a magnetically induced accumulation of Ran–NPs, 55% of the droplets demonstrated microtubule bundles, with the majority organized as asymmetric asters (Fig. 3g, nine independent experiments, $n = 548$ extract droplets). Without accumulation of Ran–NPs, we observed microtubule nucleation in 4% of the droplets. Thus, magnetic accumulation of Ran–NPs induces a robust local biochemical switch leading to microtubule nucleation and assembly.

Microtubules are polarized by motors and magnetic forces
A clue to understanding the spatial organization of microtubules into asymmetric arrays came from experiments examining the polarity of microtubule fibres and the role of molecular motors. We used short fluorescent stabilized microtubule seeds, which allowed us to distinguish the minus end of microtubule fibres from the plus end, given that assembly is faster at the growing microtubule plus end (Supplementary Methods). As shown in Fig. 4a, fluorescent seeds were mainly localized at the pole of the microtubule array, indicating its minus-end nature. Next, to investigate whether dynein motor activity is required in the microtubule-organizing process, we added an inhibitor of dynein ATPase activity (Na-orthovanadate) to the extract-in-oil droplets (Supplementary Methods). In these experimental conditions, microtubules were generally organized in randomly oriented bundles rather than in asymmetric asters (Fig. 4b), showing the essential role of dynein in assembly. Taken together, our results suggest that the orientation of the polarity of microtubules is determined by cytoplasmic dynein motors and that their minus-end extremities form a pole that co-localizes with Ran–NPs (Fig. 4). This polarity orientation is similar to microtubule arrays generated by centrosomes in animal cells³².

We next investigated the possibility of spatially redirecting Ran–NP complexes within the extract after completion of the assembly of asymmetric microtubule arrays. We used a rotating magnetic field, allowing us to dynamically change the orientation of magnetic forces applied to the extract droplets (Supplementary Fig. S5). In Fig. 4c, we present an example of the dynamics of Ran–NP repositioning within the cytoplasmic space (Supplementary Movie S2). In response to the change in orientation of the magnetic field gradient, Ran–NPs and microtubule asters moved jointly within the cytoplasm, suggesting that Ran–NPs are linked to minus-end microtubule extremities. During magnetic displacement, some microtubule fibres might bend, but the overall structure seems stable, even in the presence of the viscous drag forces exerted by the cytoplasm. Interestingly, microtubule asters could also be induced within extracts supporting more complex cytoskeleton structures, such as a bipolar spindle generated by *Xenopus* chromosomes or a meshwork of actin filaments (Supplementary Fig. S6).

A second step towards the magnetic control of signalling pathways was achieved through the spatial manipulation of Ran's guanine exchange factor, RCC1 (Fig. 1a). Recombinant RCC1 proteins were conjugated to magnetic nanoparticles (RCC1–NPs) using the same methodology as for RanQ69L-GTP (Supplementary Fig. S7 and Methods). We found that microtubule aster self-organization was characterized by an ultrasensitive response to varying concentration inputs of RCC1–NPs (threshold of 8 μ M). RCC1–NPs

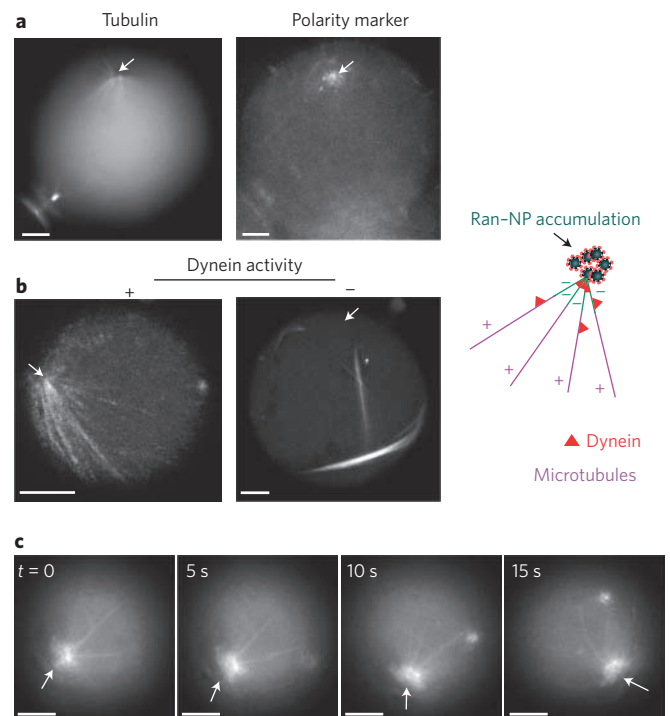


Figure 4 | Magnetically induced microtubule arrays are polarized, organized by dynein motors and can be manipulated by magnetic forces.

a, Polarity of the microtubule arrays. Fluorescent polarity marker (seeds, left panel) are co-localized mainly at the pole of the microtubule-based structure, indicating the minus-end nature of the fibres. **b**, Inhibition of ATPase activity of dynein motors by ortho-vanadate. In the presence of ortho-vanadate (100 μ M final) microtubule fibres are predominantly organized randomly, whereas in the absence of ortho-vanadate, asymmetric aster is co-localized with Ran–NPs. **c**, Magnetic manipulation of the microtubule-based structure within cytoplasmic space in response to a rotating magnetic field ([NPs] = 2 nM initial). Microtubule array polarity rotates with the direction of the magnetic forces. Ran–NP accumulation is indicated by arrows. Scale bars, 10 μ m.

allowing us to dynamically change the orientation of magnetic forces applied to the extract droplets (Supplementary Fig. S5). In Fig. 4c, we present an example of the dynamics of Ran–NP repositioning within the cytoplasmic space (Supplementary Movie S2). In response to the change in orientation of the magnetic field gradient, Ran–NPs and microtubule asters moved jointly within the cytoplasm, suggesting that Ran–NPs are linked to minus-end microtubule extremities. During magnetic displacement, some microtubule fibres might bend, but the overall structure seems stable, even in the presence of the viscous drag forces exerted by the cytoplasm. Interestingly, microtubule asters could also be induced within extracts supporting more complex cytoskeleton structures, such as a bipolar spindle generated by *Xenopus* chromosomes or a meshwork of actin filaments (Supplementary Fig. S6).

Reaction-diffusion cascades influence microtubule assembly

A second step towards the magnetic control of signalling pathways was achieved through the spatial manipulation of Ran's guanine exchange factor, RCC1 (Fig. 1a). Recombinant RCC1 proteins were conjugated to magnetic nanoparticles (RCC1–NPs) using the same methodology as for RanQ69L-GTP (Supplementary Fig. S7 and Methods). We found that microtubule aster self-organization was characterized by an ultrasensitive response to varying concentration inputs of RCC1–NPs (threshold of 8 μ M). RCC1–NPs

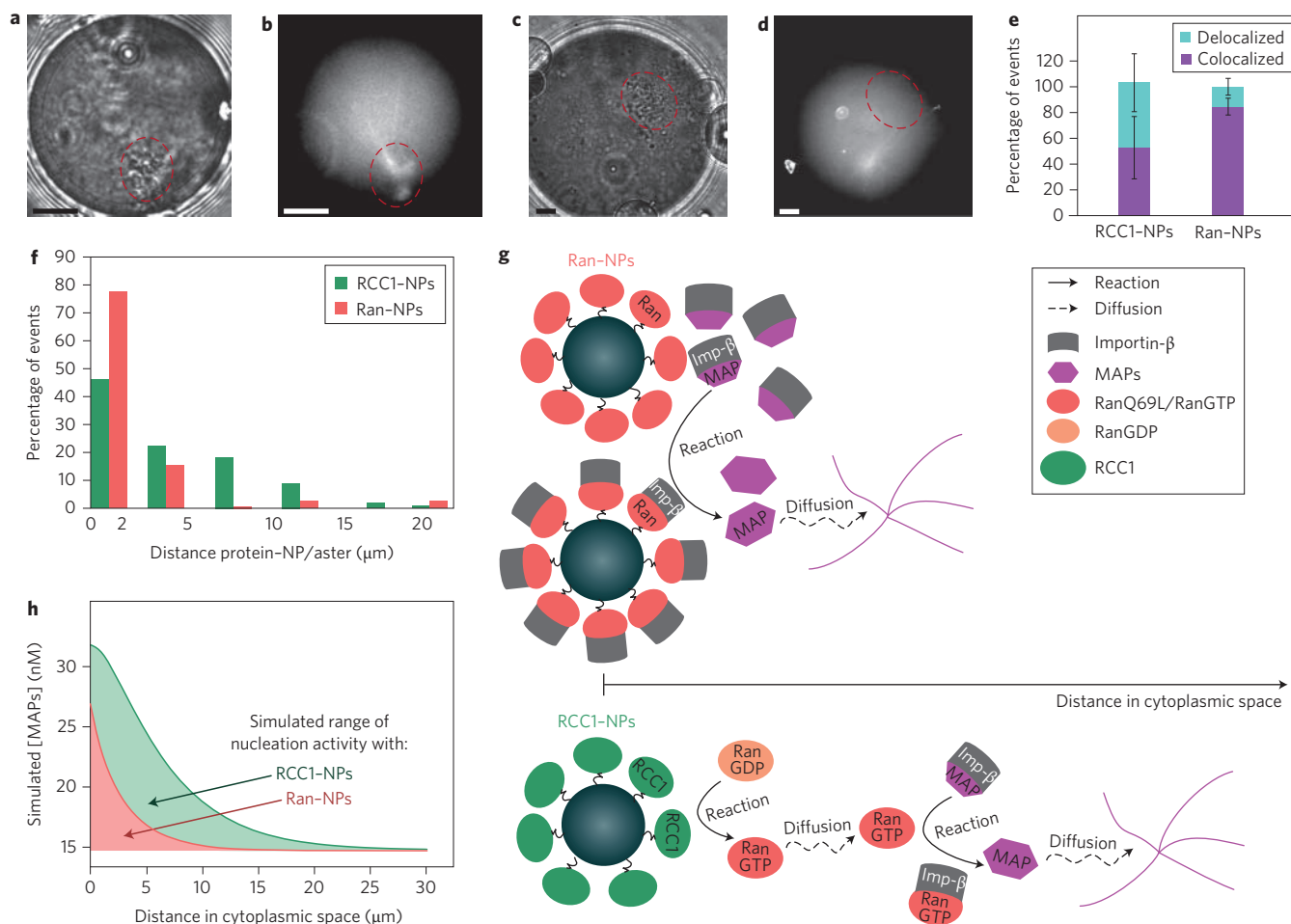


Figure 5 | Microtubule assembly triggered by guanine exchange factor RCC1. a–d, Examples of microtubule organization co-localizing (**a,b**) or not (**c,d**) with RCC1-NP accumulation. The initial concentration of RCC1-NPs is 2 nM (1.5 μM , RCC1). RCC1-NP accumulation is indicated by a red dotted circle. Scale bars, 10 μm . **e**, Quantification of aster pole localization relative to RCC1-NP and Ran-NP (five independent experiments, N droplets = 97 and 104 for RCC1-NPs and Ran-NPs, respectively). **f**, Distribution of microtubule-based structure position relative to Ran-NP (orange) or RCC1-NP position (green). **g**, Schematic representation of microtubule nucleation localization induced by Ran-NPs or RCC1-NPs. **h**, *In silico* determination of the concentration of MAPs within cytoplasmic space.

1 were subsequently guided by a magnetic field, as for Ran-NPs.
 2 Starting with levels below the concentration threshold (1.5 μM)
 3 we found that, 20–30 min after application of the magnetic field,
 4 microtubule assembly could be achieved, triggered by the local
 5 accumulation of RCC1-NPs (Fig. 5a,b). These results demonstrate
 6 that guanine exchange factors can also be harnessed for building a
 7 biochemical switch. Interestingly, microtubule-based structures
 8 were not systematically co-localized with RCC1-NP accumulation
 9 (Fig. 5c,d). Although they were also assembled into asymmetric
 10 asters, their minus-end poles were either oriented towards RCC1-
 11 NPs, similar to the situation for Ran-NPs, or pointing in the oppo-
 12 site direction. About 50% of the structures were delocalized
 13 throughout the cytoplasm, contrasting with the Ran-NP pathways,
 14 where 85% of microtubule asters were co-localized to Ran-NPs
 15 (Fig. 5e). We further investigated this difference by measuring the
 16 distance between spatially organized microtubule structures and
 17 protein-NPs. Our results indicate that the probability of finding
 18 microtubule structures is high in the vicinity of RCC1-NPs (50%
 19 below 2 μm , Fig. 5f) and decays rapidly until reaching 30% above
 20 5 μm and 15% above 10 μm . Interestingly, increasing the local con-
 21 centration of RCC1 (from 1.5 to 6 μM) enhanced the probability of
 22 finding microtubule asters at longer distances from nanoparticle
 23 accumulations (50% above 5 μm ; Supplementary Fig. S8).

24 One hypothesis that may explain the differences in the spatial
 25 distribution of the microtubule patterns for RCC1-NPs and Ran-
 26 NPs concerns the intrinsic biochemical properties of the signalling
 27 cascade upstream of microtubule nucleation (Fig. 1b)^{24,26}. The
 28 RCC1-NP signalling pathway involves the cycling of RanGTP by
 29 RCC1-NPs, and therefore contains an additional biochemical step
 30 in which Ran reactivity is tightly coupled to its diffusion within
 31 the cytoplasm (Fig. 5g). A steady-state spatial gradient of RanGTP
 32 concentration is generated by RCC1-NPs. Along this gradient,
 33 RanGTP–importin complexes are assembled, promoting the
 34 release of diffusing MAP proteins within the cytoplasm. This
 35 creates a spatial range of nucleation of activity, which eventually
 36 triggers microtubule nucleation (Fig. 5g).

37 To test this hypothesis, we adapted a reaction–diffusion model
 38 originally used to describe how RanGTP gradients, stimulated by
 39 RCC1 bound to chromatin, may influence meiotic spindle forma-
 40 tion²⁷. The model consists of computing the concentration in
 41 space of different biochemical species, including RanGTP, impor-
 42 tins and MAPs, using the kinetic properties of the signalling path-
 43 ways and the protein diffusion characteristics (see Supplementary
 44 Information). For both Ran-NPs and RCC1-NPs we performed
 45 simulations to determine the steady-state distribution of microtu-
 46 ble nucleation factors as a function of distance within the

Q8

cytoplasm (Fig. 5h). We found that the spatial gradient of MAP concentration generated by RCC1-NPs spans over a larger distance than that generated by Ran-NPs. The characteristic decay distances of MAP concentration—10 μm for RCC1-NPs and 5 μm for Ran-NPs—are consistent with the distances separating spatially organized microtubules from protein-NPs (Fig. 5f). Our results demonstrate how the cycling of RanGTP by RCC1-NPs extends the spatial range of the concentration gradient of MAPs and therefore the range of nucleating activity within the cytoplasm. This also emphasizes how reaction–diffusion processes could carry signalling pathways over several micrometres within cells.

Interestingly, this long-range distance observed experimentally for RCC1-NPs and simulated using reaction–diffusion processes scales with the size of meiotic spindles assembled in egg extracts^{23,33}. Indeed 30% of the asymmetric asters have a distance relative to nanoparticles ranging from 10 to 15 μm , which is close to the chromatin-to-pole size of microtubule spindles ($15 \pm 3 \mu\text{m}$)³⁴.

Conclusions

Our results demonstrate a first step towards the magnetic control of intracellular signalling pathways involved in regulating cytoskeleton morphogenesis. By directly targeting the collective behaviour of the Ran/RCC1 signalling network, we have designed a bio-inspired switch that triggers microtubule self-assembly in space and time. This opens the way to new strategies for engineering spatial self-organization and shows how fine-tuning of local protein concentration provides positional information for the emergence of spatial patterns. It further highlights a strategy for boundary-free compartmentalization of biological activity.

Remarkable studies have enabled the discovery of intracellular gradients of RanGTP, stimulated by RCC1 and emanating from chromosomes, which can be described as a reaction–diffusion process that supports the spindle machinery in cell division^{27,29,35–37}. Interestingly, by manipulating RanQ69L-GTP and RCC1 signalling grafted to magnetic nanoparticles, we have demonstrated experimentally how cascading reaction–diffusion signals may directly influence the position of asymmetric microtubule arrays. This signal propagation generates positional information for microtubule fibre organization and carries the signal over several micrometres within cells.

Several interesting perspectives have been raised by these experiments. First, we have demonstrated the magnetic control of cellular polarization *in vivo* using nanoparticles³⁸. Second, the approach is generic and could be extended to other signalling proteins, such as kinases, that exhibit non-trivial behaviours when they work collectively or are recruited by scaffolding proteins³⁹. Finally, from a synthetic biology perspective, there is mounting interest regarding the engineering of essential functions such as switches and oscillators^{13,40,41}. Our approach provides a bottom-up strategy using the magnetic actuation of ultrasensitive responses of GTPase proteins, which act as molecular switches. Such designs are believed to be important for regulatory systems because they convert a graded input into a digital output⁴².

Methods

Expression and purification of recombinant proteins. The expression of plasmids and purification of recombinant proteins were realized as described previously^{29,43,44}. The plasmids for *Escherichia coli* expression of RanQ69L-GTP (pQE32-Ran, 6His Tag) and RCC1 (pQE60-Rcc1, 6His Tag) were provided by I. Mattaj (EMBL). The plasmid of Rango (pKW1648), constructed in pRSET A (with 6His tag), was provided by K. Weis. The plasmid of Ran(T24N) was provided by N. Morin.

Microscopic quantification of microtubule nucleation. Cytostatic-factor-arrested (CSF) *Xenopus laevis* egg extract, which corresponds to the 'active' cytoplasm of oocytes arrested in metaphase II of meiosis, was prepared as described previously^{45–47}. Microtubules structures were assembled using metaphase extracts in the presence of rhodamin-X-labelled tubulin and Ran-NPs or RCC1-NPs, as indicated. For nucleation quantification experiments, *Xenopus* egg extracts, containing rhodamin-X-labelled tubulin (100 nM final) and an ATP regenerating system (1 mM ATP, 10 mM creatine phosphate, 100 $\mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$ creatine

phosphokinase, final concentrations), were incubated in the presence of proteins at the final concentration indicated. Microtubule assembly was monitored after 30 or 45 min incubation at 18 °C. The average number of asters formed for a given RanGTP concentration (ranging from 1 to 6 μM) was quantified using fluorescence microscopy (Fig. 2). Aster density was normalized to reach 100% for the plateau at the highest RanGTP concentration.

Imaging and data analysis. Fluorescence imaging of microtubules asters was performed using an IX81 (Olympus) with either a x60 (PlanApo, NA = 1.42) or x40 (UPlanFLN, NA = 1.30) objective, and an EM-CCD (C9100-02, Hamamatsu, Corporation). Microscope settings and functions were controlled using Simple PCI software (Hamamatsu). Image analysis was performed using Image J (NIH) and Simple PCI software. Bright-field illumination was used to monitor droplet shape and nanoparticle accumulation. Confocal microscopy was performed with a Zeiss LSM 710 laser scanning confocal microscope using a x63 (PlanApoChromatic, NA = 1.4) objective. Image analysis was performed using LSM Software Zen 2009.

Conjugation of protein to magnetic nanoparticles. Superparamagnetic nanoparticles (120 nm diameter, Carboxyl Ademabeads 0211, Adematech) with a Fe_3O_4 magnetic core encapsulated by a highly crosslinked hydrophilic polymer shell (transmission electron microscopy allowed us to estimate the magnetic core diameter to be 100 nm; Supplementary Fig. S3) were used. The surface was activated with carboxylic acid functionality. The initial concentration of nanoparticles was 78 nM. For conjugation to RanQ69L-GTP or RCC1, 90×10^{-15} moles of magnetic nanoparticles were placed in XB1 buffer (10 mM Hepes, 1 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, 50 mM sucrose, pH 7.7) for three successive rinses under a magnetic field. NiCl_2 (2 mM final) and proteins were then added at a concentration corresponding to the different initial molar ratios of protein/nanoparticles (500–3,000). After 30 min reaction at 4 °C, unconjugated proteins were eluted by three rinses in XB1 under a magnetic field. After purification, we set the concentration of protein–nanoparticle complexes to ~60 nM. Conjugation stoichiometry and stability were determined by a semi-quantitative assay using SDS-PAGE electrophoresis (see Supplementary Information).

Extract-in-oil droplet formations. The cellular extract was encapsulated in droplets using a water-in-oil emulsion process. The mineral oil contained a biocompatible block copolymer to stabilize the emulsion and facilitate observations. This method has been described previously and allows the formation of microtubule asters in droplets^{30,31}. Arlacel P135 block copolymer was first dissolved in mineral oil (0.05 mg ml^{-1}). The *Xenopus* egg extracts containing fluorescently labelled tubulin were added to the mixture of mineral oil and block copolymer (2%; vol CSF/vol oil) at room temperature. The mixture was gently sheared by pipetting the solution up and down for a few seconds to generate extract-in-oil droplets. The mechanical dispersion of the biphasic solution formed micrometre-sized extract-in-oil droplets within a few seconds. Immediately after this process, the emulsion droplet could be used at room temperature.

Accumulation of protein–nanoparticle complexes under a magnetic field. The accumulation of Ran-NPs or RCC1-NPs under a magnetic field was performed as follows. Cell extract, X-rhodamine tubulin, ATP regenerating system, DTT and Ran-NPs or RCC1-NPs ([Ran or RCC1] = 1.5 μM and [NPs] = 1.8 nM final) were mixed at 4 °C before encapsulation in droplets. Emulsion droplets were placed at a distance ranging from 1 to 2 mm from a permanent NdFeB magnet (Q-20-20-10-N, Supermagnete) for 10 min. The magnetic accumulation of nanoparticles was performed either in a batch or in a home-made observation chamber, allowing microscopic observations and rotation of the magnetic field direction (see Supplementary Information).

For statistical analysis of microtubule nucleation efficiency induced under a magnetic field, we acquired images of every droplet in the emulsion. Results were expressed as a percentage of droplets having a microtubule-based structure co-localizing or not with Ran-NPs clusters. Measurements of distances from the aster pole to Ran-NP or RCC1-NP accumulation were realized using ImageJ Software.

Received 1 August 2012; accepted 3 December 2012;
published online XX XX 2012

References

- Kholodenko, B. N., Hancock, J. F. & Kolch, W. Signalling ballet in space and time. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **11**, 414–426 (2010).
- Kinkhabwala, A. & Bastiaens, P. I. Spatial aspects of intracellular information processing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **20**, 31–40 (2010).
- Karsenti, E. Self-organization in cell biology: a brief history. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**, 255–262 (2008).
- Chiang, K. P. & Muir, T. W. Systems- and molecular-level elucidation of signaling processes through chemistry. *Sci. Signal* **1**, pe45 (2008).
- Ellis-Davies, G. C. Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nature Methods* **4**, 619–628 (2007).
- Grunwald, C. *et al.* *In situ* assembly of macromolecular complexes triggered by light. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 6146–6151 (2010).

Q17

- 1 7. Toettcher, J. E., Voigt, C. A., Weiner, O. D. & Lim, W. A. The promise of
2 optogenetics in cell biology: interrogating molecular circuits in space and time.
3 *Nature Methods* **8**, 35–38 (2011).
- 4 8. Wu, Y. I. *et al.* A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility
5 of living cells. *Nature* **461**, 104–108 (2009).
- 6 9. Levskaya, A., Weiner, O. D., Lim, W. A. & Voigt, C. A. Spatiotemporal control
7 of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature* **461**,
8 997–1001 (2009).
- 9 10. Lim, W. A. Designing customized cell signalling circuits. *Nature Rev. Mol. Cell*
10 *Biol.* **11**, 393–403 (2010).
- 11 11. Doktycz, M. J. & Simpson, M. L. Nano-enabled synthetic biology. *Mol. Syst. Biol.*
12 **3**, 125 (2007).
- 13 12. Wilner, O. I. *et al.* Enzyme cascades activated on topologically programmed
14 DNA scaffolds. *Nature Nanotech.* **4**, 249–254 (2009).
- 15 13. Kiel, C., Yus, E. & Serrano, L. Engineering signal transduction pathways. *Cell*
16 **140**, 33–47 (2010).
- 17 14. Chen, C. S. Biotechnology: remote control of living cells. *Nature Nanotech.* **3**,
18 13–14 (2008).
- 19 15. Mannix, R. J. *et al.* Nanomagnetic actuation of receptor-mediated signal
20 transduction. *Nature Nanotech.* **3**, 36–40 (2008).
- 21 16. Lee, J.-H. *et al.* Artificial control of cell signaling and growth by magnetic
22 nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 5698–5702 (2010).
- 23 17. Steketee, M. B. *et al.* Nanoparticle-mediated signaling endosome localization
24 regulates growth cone motility and neurite growth. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*
25 **108**, 19042–19047 (2011).
- 26 18. Desai, A., Murray, A., Mitchison, T. J. & Walczak, C. E. The use of *Xenopus* egg
27 extracts to study mitotic spindle assembly and function *in vitro*. *Methods Cell*
28 *Biol.* **61**, 385–412 (1999).
- 29 19. Hannak, E. & Heald, R. Investigating mitotic spindle assembly and function *in*
30 *vitro* using *Xenopus laevis* egg extracts. *Nature Protoc.* **1**, 2305–2314 (2006).
- 31 20. Vetter, I. R. & Wittinghofer, A. The guanine nucleotide-binding switch in three
32 dimensions. *Science* **294**, 1299–1304 (2001).
- 33 21. Vartak, N. & Bastiaens, P. Spatial cycles in G-protein crowd control. *EMBO J.* **29**,
34 2689–2699 (2010).
- 35 22. Kalab, P. & Heald, R. The RanGTP gradient—a GPS for the mitotic spindle.
36 *J. Cell Sci.* **121**, 1577–1586 (2008).
- 37 23. Carazo-Salas, R. E. *et al.* Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for
38 chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature* **400**, 178–181 (1999).
- 39 24. Karsenti, E. & Vernos, I. The mitotic spindle: a self-made machine. *Science* **294**,
40 543–547 (2001).
- 41 25. Wittmann, T., Hyman, A. & Desai, A. The spindle: a dynamic assembly of
42 microtubules and motors. *Nature Cell Biol.* **3**, E28–E34 (2001).
- 43 26. Clarke, P. R. & Zhang, C. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran
44 GTPase. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 464–477 (2008).
- 45 27. Caudron, M., Bunt, G., Bastiaens, P. & Karsenti, E. Spatial coordination of
46 spindle assembly by chromosome-mediated signaling gradients. *Science* **309**,
47 1373–1376 (2005).
- 48 28. Toyoshima, Y., Kakuda, H., Fujita, K. A., Uda, S. & Kuroda, S. Sensitivity control
49 through attenuation of signal transfer efficiency by negative regulation of cellular
50 signalling. *Nature Commun.* **3**, 743 (2012).
- 51 29. Kaláb, P., Pralle, A., Isacoff, E. Y., Heald, R. & Weis, K. Analysis of a RanGTP-
52 regulated gradient in mitotic somatic cells. *Nature* **440**, 697–701 (2006).
- 53 30. Jimenez, A. M. *et al.* Towards high throughput production of artificial egg
54 oocytes using microfluidics. *Lab. Chip* **11**, 429–434 (2011).
- 55 31. Pinot, M. *et al.* Effects of confinement on the self-organization of microtubules
56 and motors. *Curr. Biol.* **19**, 954–960 (2009).
- 57 32. Li, R. & Gundersen, G. G. Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds
58 a polarized cell. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 860–873 (2008).
- 59 33. Halpin, D., Kalab, P., Wang, J., Weis, K. & Heald, R. Mitotic spindle
60 assembly around RCC1-coated beads in *Xenopus* egg extracts. *PLoS Biol.* **9**,
e1001225 (2011).
34. Gaetz, J., Gueroui, Z., Libchaber, A. & Kapoor, T. M. Examining how the spatial
62 organization of chromatin signals influences metaphase spindle assembly.
63 *Nature Cell Biol.* **8**, 924–932 (2006).
- 64 35. Bastiaens, P., Caudron, M., Niethammer, P. & Karsenti, E. Gradients in the self-
65 organization of the mitotic spindle. *Trends Cell Biol.* **16**, 125–134 (2006).
- 66 36. Athale, C. A. *et al.* Regulation of microtubule dynamics by reaction cascades
67 around chromosomes. *Science* **322**, 1243–1247 (2008).
- 68 37. Soh, S., Byrská, M., Kandere-Grzybowska, K. & Grzybowski, B. A. Reaction-
69 diffusion systems in intracellular molecular transport and control. *Angew. Chem.*
70 *Int. Ed.* **49**, 4170–4198 (2010).
- 71 38. Bryant, D. M. & Mostov, K. E. From cells to organs: building polarized tissue.
72 *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 887–901 (2008).
- 73 39. Good, M. C., Zalatan, J. G. & Lim, W. A. Scaffold proteins: hubs for controlling
74 the flow of cellular information. *Science* **332**, 680–686 (2011).
- 75 40. Bashor, C. J., Horwitz, A. A., Peisajovich, S. G. & Lim, W. A. Rewiring cells:
76 synthetic biology as a tool to interrogate the organizational principles of living
77 systems. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 515–537 (2010).
- 78 41. Grunberg, R. & Serrano, L. Strategies for protein synthetic biology. *Nucleic Acids*
79 *Res.* **38**, 2663–2675 (2010).
- 80 42. Osterfield, M., Kirschner, M. W. & Flanagan, J. G. Graded positional
81 information: interpretation for both fate and guidance. *Cell* **113**, 425–428 (2003).
- 82 43. Izaurralde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I. W. & Görlich, D. The
83 asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for
84 transport into and out of the nucleus. *EMBO J.* **16**, 6535–6547 (1997).
- 85 44. Kutay, U., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Mattaj, I. W. & Görlich, D. Dominant-
86 negative mutants of importin- β block multiple pathways of import and export
87 through the nuclear pore complex. *EMBO J.* **16**, 1153–1163 (1997).
- 88 45. Desai, A., Murray, A., Mitchison, T. J. & Walczak, C. E. The use of *Xenopus* egg
89 extracts to study mitotic spindle assembly and function *in vitro*. *Methods Cell*
90 *Biol.* **61**, 385–412 (1999).
- 91 46. Hannak, E. & Heald, R. Investigating mitotic spindle assembly and function *in*
92 *vitro* using *Xenopus laevis* egg extracts. *Nature Protoc.* **1**, 2305–2314 (2006).
- 93 47. Pinot, M. *et al.* Confinement induces actin flow in a meiotic cytoplasm. *Proc.*
94 *Natl Acad. Sci. USA* **109**, 11705–11710 (2012).

Acknowledgements

The authors thank I. Mattaj and B. Koch for the RanQ69L and RCC1 expression plasmids, K. Weis for the Rango expression plasmid and N. Morin for the Ran(T24N) expression plasmid. The authors also thank F. Guyot, J.M. Guignier and L. Largeau for electron microscopy observations. Thanks also go to F. Grasset, A. Gautier, L. Jullien, T. Le Saux, A. Libchaber, N. Nerambourg, C. Tribet, J. Wu and the members of the Biophysical Chemistry Center of ENS for fruitful discussions. This work was supported by the CNRS, the Association pour la Recherche sur le Cancer (SFI20101201426), the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC, 2009) and Ville de Paris 'Emergence' (to Z.G.), the Agence Nationale de la Recherche (ANR, ANR-08-PNANO-050 to R.L.B., V.M.A., C.G. and Z.G.), FRM, Triangle de la Physique (to E.M.) and ATIP CNRS (to R.L.B.).

Author contributions

C.H. and Z.G. conceived and designed the experiments. C.H., S.L. and Z.G. performed the experiments. E.M. and C.G. performed the simulations. All authors analysed the data. C.G., R.L.B. and V.M.A. contributed materials/analysis tools. C.H. and Z.G. wrote the manuscript and all authors commented on it.

Additional information

Supplementary information is available in the online version of the paper. Reprints and permission information is available online at <http://www.nature.com/reprints>. Correspondence and requests for materials should be addressed to Z.G.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Publisher: Nature

Journal: Nature Nanotechnology

Article number: nnano.2012.246

Author (s): Hoffmann *et al.*

Title of paper: Spatiotemporal control of microtubule nucleation and assembly using magnetic nanoparticles

Query no.	Query	Response
1	Sentence beginning “This creates” OK as amended?	
2	Sentence beginning “In addition” OK as amended?	
3	Sentence beginning “Such cell” OK as amended?	
4	I am not sure it is clear what is “contributing” here – please clarify	
5	Sentence beginning “Furthermore” OK as amended?	
6	Sentence beginning “In contrast” OK as amended?	
7	Sentence beginning “As a first step” OK as amended?	
8	Can we be more specific about where you mean in the Supplementary Information?	
9	For Journal style, please shorten the heading level to fit in single line.	
10	“localized” changed to “located” – OK?	
11	Sentence beginning “When the” OK as amended?	
12	I am not sure it is clear what you mean by “in those droplets” – please check.	
13	Sentence beginning “We found” OK as amended?	
14	Please expand EM-CCD	
15	Changed to “transmission electron microscopy” – OK?	
16	Please expand SDS-PAGE	
17	Please confirm that ref 11 is a single-page ref, or provide end page	
18	Please check that Figure 1a caption is OK as amended	
19	Figure 3 caption, last sentence – I have added “in d and e ” regarding the red dashed circuits. Please confirm.	
20	Sentence beginning “Microtubule array” OK as amended?	

Spatiotemporal control of microtubule nucleation and assembly using magnetic nanoparticles

Céline Hoffmann, Elsa Mazari, Sylvie Lallet, Roland Le Borgne, Valérie Marchi, Charlie Gosse and Zoher Gueroui

Index of SUPPLEMENTARY INFORMATION:

8 Figures, 3 Tables, 2 Supplementary movies

Supplementary Discussion and Experimental Procedures:

1. Supplementary Methods

2. Supplementary Figures

3. Supplementary Experimental Procedures:

Characterisation of protein conjugation to nanoparticles

FRET experiments

Protein-nanoparticle accumulation under magnetic field

4. Legends for Supplementary movies

5. Numerical Simulations

1 Supplementary Methods

Reagents

Cytostatic-factor-arrested (CSF) *Xenopus laevis* egg extracts, which corresponds to “active” cytoplasm of oocytes arrested in metaphase II of meiosis, were prepared as previously described¹. ATP, DTT, creatine phosphate, cytochalasin D, creatine phosphokinase, mineral oil (M5904), orthovanadate were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Poly(12-hydroxystearic acid) (PHS) and poly(ethylene oxide) (PEO-30) are commercially available (Arlacel P135) and were purchased from UNIQEMA. Tubulins, labelled with X-Rhodamin or with FITC, were ordered from Cytoskeleton Inc. (Denver, CO). Alexa-488 Phalloidin was purchased from Invitrogen (Carlsbad, California). The preparation of actin extracts follows CSF extract preparation with one modification: the protocol was performed in absence of cytochalasin D and in a cold room. All the experiments were done in metaphase extracts.

Characterisation of Ran-NP and RCC1-NP Complexes

Conjugation stoichiometry was determined by a semi-quantitative assay using SDS-PAGE electrophoresis (Supplementary Figures S1 and S7). Samples were solubilised in 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) with 0.3 M β -mercaptoethanol. Electrophoresis was carried out with a current of 100 mA for 30 minutes in a 4-12% polyacrylamide gel (Life technologies). Protein detection was revealed by Coomassie Blue staining and molecular weight standards proteins were 200, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa (Biorad #161-0363). Protein density on nanoparticles was determined beside a BSA range using Image J. Integrated colorimetric intensity of each band is expressed as a function of protein quantity. The quantity of protein is reported to the known quantity of nanoparticles in the samples, allowing us to determining the final Protein/NP ratio (Supplementary Figures S1a,b and S7a). In order to determine the stability of the complexes as a function of time (30 min, 90 min, 3h, and 6h), the solution was rinsed in XB1 buffer to remove unbound proteins. The quantification of residual proteins grafted to nanoparticles was performed by SDS-PAGE as previously described. The quantity of proteins grafted to nanoparticles at each time point is expressed as a percentage of the protein bound to nanoparticles at t=0 (Supplementary Figures S.1c and S.7b).

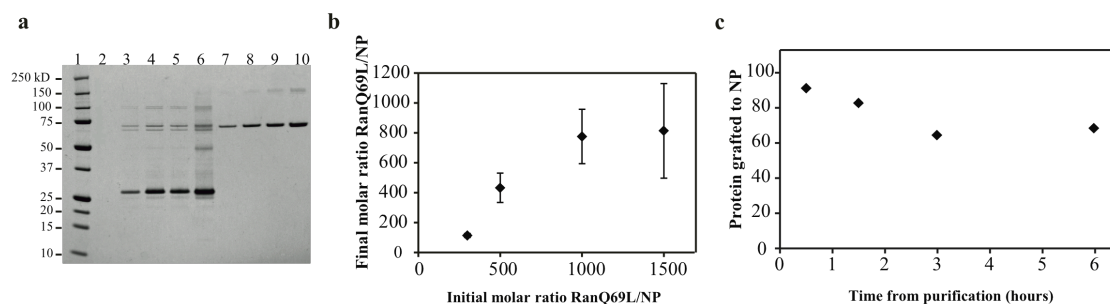
Polarity of microtubules and dynein inhibition

In order to determine microtubule polarity, we added microtubule labelled-seeds to our cell extracts. Microtubule seeds were prepared as previously described^{2,3}. More precisely, 30 μ M of tubulin were polymerised in BRB80 buffer in the presence of 1 mM GMPCPP, 1 mM DTT, 30 % glycerol and 6 μ M X-rhodamine-conjugated tubulin for 20 min at 35°C. 10 μ M taxol (paclitaxel, Sigma) was added stepwise and the reaction was incubated for an additional 15 min to stabilise microtubules. The

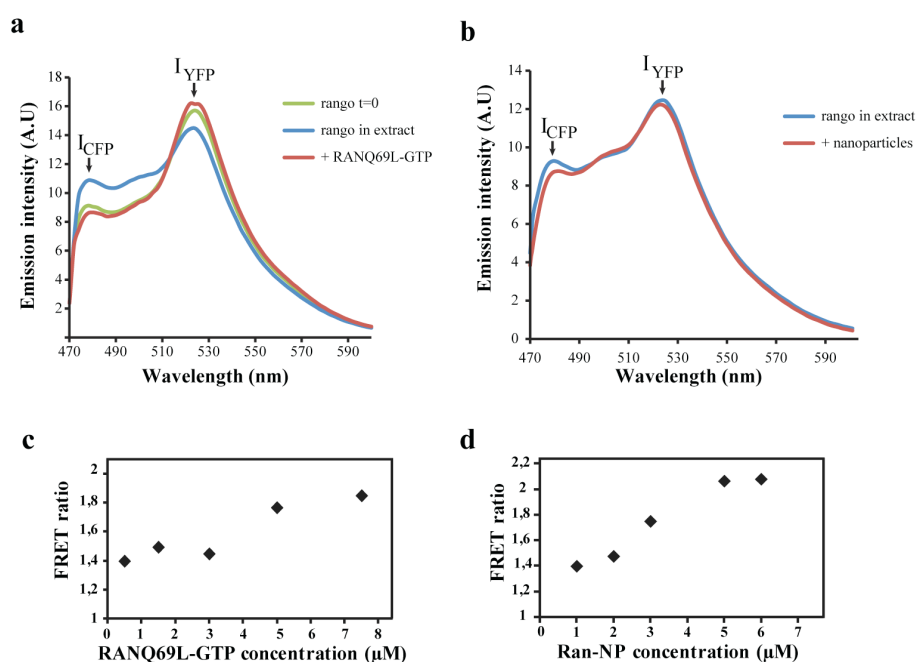
mixture was clarified by centrifugation in a TLA100 rotor at 90000 g for 5 min at 35°C. Microtubule seeds were prediluted in taxol-free BRB80 and were frozen in 2- μ l aliquots in liquid nitrogen. In order to obtain short micrometer-sized filaments, microtubule seeds were sheared by pipetting up and down. Cell extract containing FITC-labelled tubulin, Ran-NPs and ATP were complemented with these short filaments. The emulsion was then submitted to magnetic field during 10 min.

Inhibition of ATPase activity of molecular motors was performed using Na-ortho-vanadate ⁴. Before performing the formation of droplets, *Xenopus* cell extract was incubated with ortho-vanadate (100 μ M final), fluorescently-labelled tubulin and RanQ69L or Ran-NPs.

2 Supplementary Figures



Supplementary Figure S1. Characterisation of Ran-NP complexes. a,b) Determination of conjugation stoichiometry by SDS-PAGE electrophoresis. a) SDS-PAGE electrophoresis of various Ran-NP complexes. Lane 1 : molecular weight protein standard , lane 2 to 6 : purified complexes with variation of RanQ69L/NP initial ratio : lane 2= 0; lane 3= 300; lane 4= 500; lane 5= 1000; lane 6= 1500; lane 7= 0,1 μ g BSA; lane 8= 0,2 μ g BSA; lane 9= 0,3 μ g BSA; lane 10 = 0,5 μ g BSA. b) RanQ69L/NP final molar ratio as a function of RanQ69L/NP initial molar ratio. c) Ran-NP stability. Percentage of Ran grafted to nanoparticles as a function of time.

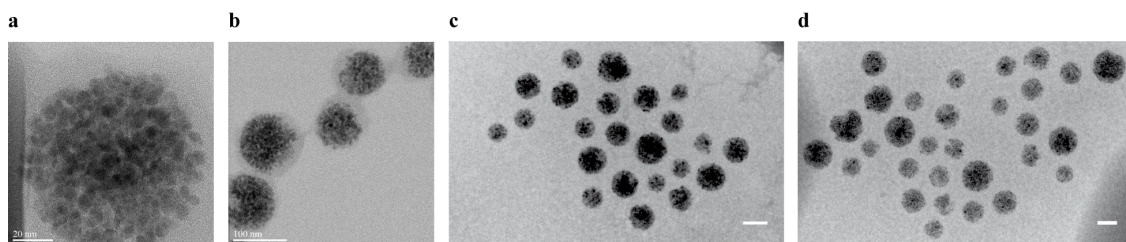


Supplementary Figure S2. Fluorescence spectra of the FRET biosensor Rango.

a) Fluorescence spectra of the energy transfer of the biosensor (2 μ M) excited at 435 nm immediately after addition to cell extract ($t=0$, green line), after 10 min incubation in cell extract (blue line) and 20 min after addition of 6 μ M RanQ69L-GTP (red line).

b) Fluorescence spectra of the FRET biosensor in presence of uncoated nanoparticles. The fluorescence emission spectra of the biosensor (2 μ M) excited at 435 nm is recorded after 10 min of incubation in cell extract (blue line) and 20 min after the addition of uncoated nanoparticles. The final concentration of uncoated nanoparticles was equivalent to Ran-NP concentration performed in Fig. 2e (7,5 nM) (red line).

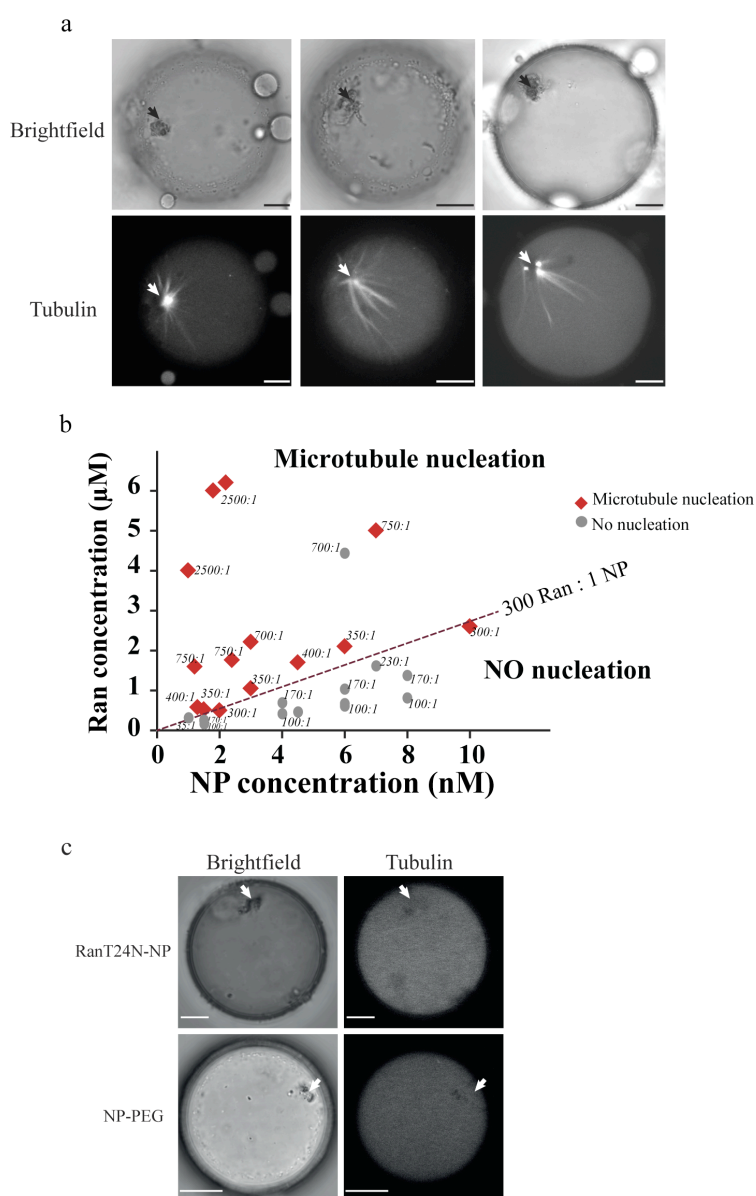
c,d) Variation in FRET ratio, determined as I_{YFP}/I_{CFP} ratio, when increasing concentrations of Ran (c) or Ran-NPs (d) were added to the extract.



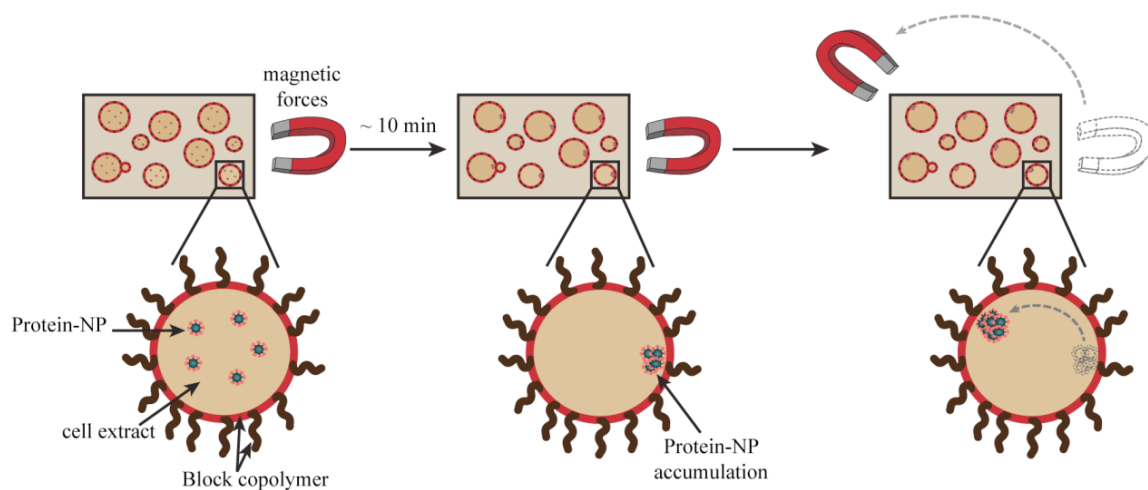
Supplementary Figure S3: Microscopic observations of uncoupled nanoparticles and Ran-NPs

a, b) Transmission Electron Microscopy of uncoupled nanoparticles. These nanoparticles are around 120 nm large with a magnetic core diameter of about 100 nm. Scale bars, 20 and 100 nm respectively.

c, d) Cryo-TEM of Ran-NPs within cellular extracts. Scale bars, 100 nm.

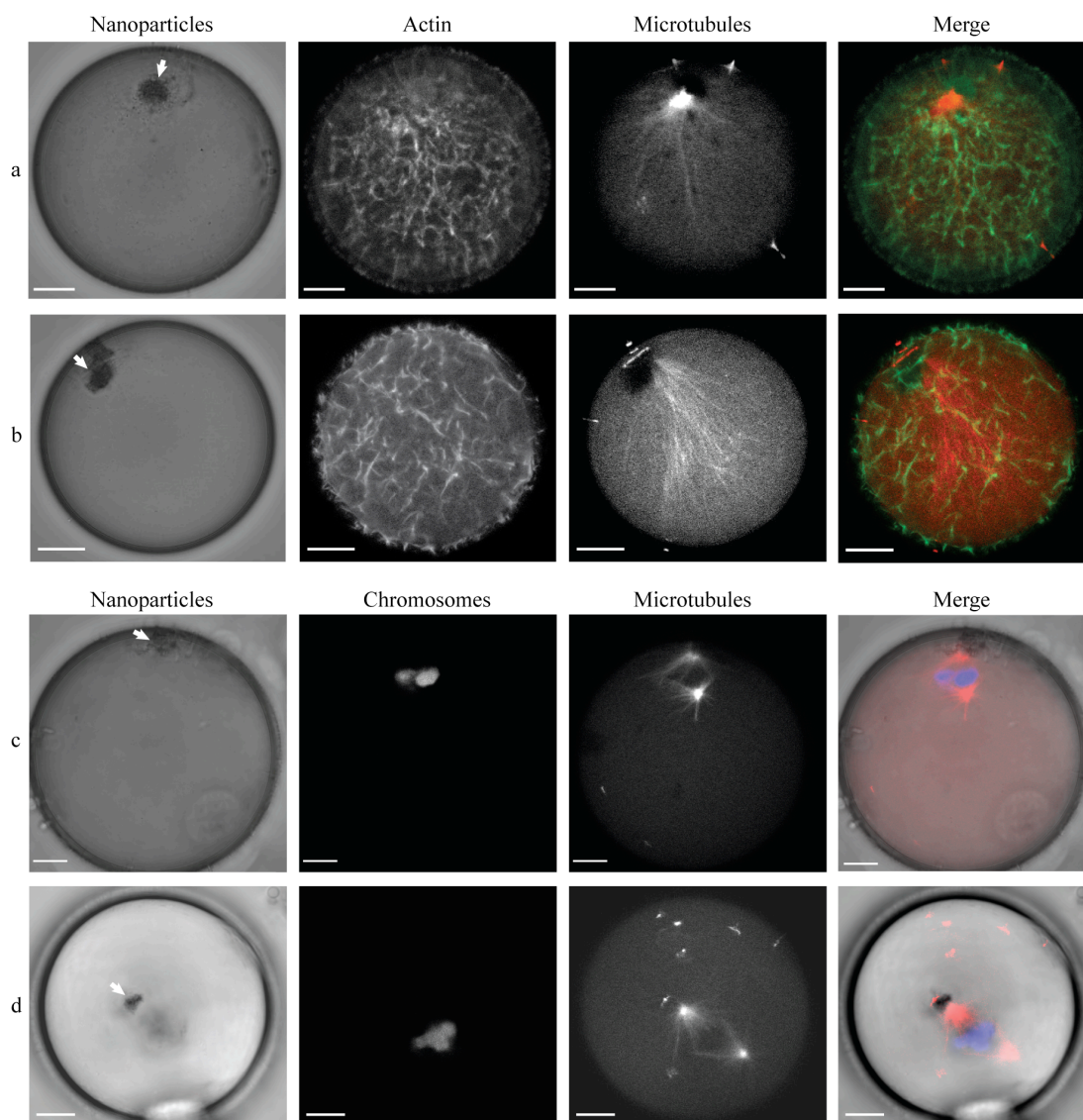


Supplementary Figure S4. Microtubule nucleation is specifically induced by Ran conjugated to nanoparticles. a) Examples of microtubule nucleation induced by accumulation of Ran-NPs under magnetic field. Ran-NP accumulations in droplets were visualised under brightfield illumination (top). Microtubule-based structures were visualised by fluorescence microscopy (bottom). Ran-NP accumulations are indicated by arrows, scale bars = 10 μm . b) MT nucleation efficiency under magnetic accumulation for various Proteins to nanoparticle ratio. N= 27 independent experiments. c) Magnetic accumulation of incompetent Ran-NPs within extracts failed in triggering aster assembly, ruling out the possibility to non-specifically concentrate microtubule nucleation factors from the extract.

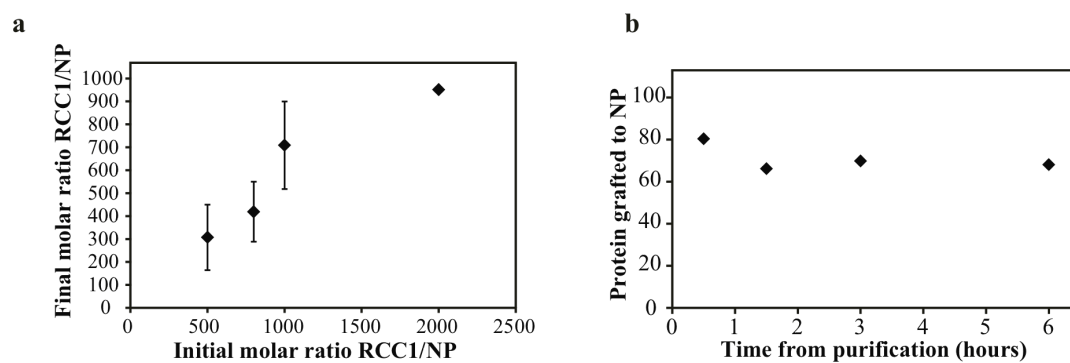


Supplementary Figure S5. Schematic of the magnetic accumulation and manipulation of Protein-nanoparticles under magnetic field.

Starting from an homogeneous repartition of Protein-NP inside droplet, application of a magnetic field lead to the accumulation of Protein-NPs. Ran-NP accumulation can be redirected inside the droplet by moving the magnet around the sample.

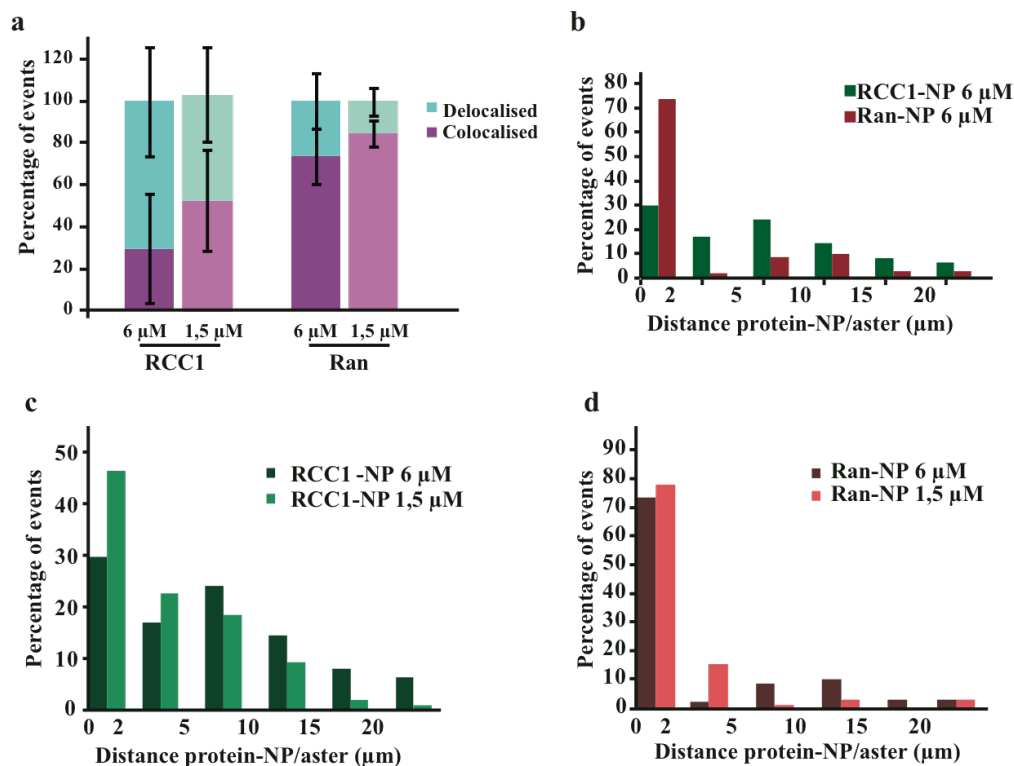


Supplementary Figure S6: Magnetic induction of microtubule arrays in presence of native cytoskeleton structures within *Xenopus* extracts. Cytoskeleton structures were observed by fluorescence microscopy after the magnetic accumulation of Ran-NPs.
a,b) F-Actin meshwork (green), microtubule aster (red).
c,d) Meiotic spindle around *Xenopus* chromosomes: Chromosomes (blue) and Microtubules (red).
Scale bars, 10 μm .



Supplementary Figure S7. Characterisation of RCC1-NP complexes.

- a) Stoichiometry of RCC1-NPs. RCC1/NP final molar ratio as a function of RCC1/NP initial molar ratio is determined by SDS-PAGE electrophoresis as previously described for Ran-NPs.
- b) RCC1-NP stability. Percentage of RCC1 grafted to nanoparticles as a function of time.



Supplementary Figure S8. Distribution of microtubule-based structure position relative to Ran-NP or RCC1-NP position

a) Quantification of aster pole localisation relative to RCC1-NP and Ran-NP accumulations (10 independent experiments, N droplets = 167 and 166 for RCC1-NPs and Ran-NPs respectively).
b,c,d) Distribution of microtubule aster position relative to Ran-NP (orange bars) or RCC1-NP position (green bars).

3 Supplementary Experimental Procedure

Characterisation of protein conjugation to magnetic nanoparticles

By varying the initial ratio of protein per nanoparticles, we can control the density of grafted proteins (Supplementary Figure S1a and b). The conjugation was performed with a fixed quantity of nanoparticles ($90 \cdot 10^{-15}$ moles) and various initial quantities of proteins. After conjugation, the excess of unbound proteins was removed by placing the solution on a permanent magnet and by performing successive rinses in XB1 buffer. Then, the conjugated nanoparticles were resuspended in a known volume. We estimated that there was no loss of nanoparticles during rinses, so quantification of proteins in our complexes solution allowed us to determine the ratio of proteins per nanoparticles.

We used Ran-NP complexes with an average of 800 RanQ69L per nanoparticle; it means an average of 1 protein per 50 nm^2 . By analysing the quantity of protein still bound to nanoparticles as a function of time, we demonstrated that the complex is stable during at least 6 hours. Indeed, an average of 70 % of proteins initially bound to nanoparticles is still conjugate to nanoparticles after 6 hours of conservation (Supplementary Fig. S1c).

For RCC1-NPs, we used complexes with an average of 800 RCC1 per nanoparticle; it means an average of 1 protein per 50 nm^2 (Supplementary Fig. S7a). We demonstrated that at least 70 % of proteins initially bound to nanoparticles are still conjugate to nanoparticles after 6 hours of conservation (Supplementary Fig. S7b).

For experiments performed at a concentration under the nucleation threshold (around $1.5 \mu\text{M}$), 30% of proteins are desorbed from the nanoparticles. This proportion of desorbed proteins is lower than the concentration threshold and therefore is insufficient in triggering microtubule nucleation (around $0.45 \mu\text{M}$ for an initial concentration of $1.5 \mu\text{M}$).

To determine the minimum of Ran concentration that must be brought into proximity to trigger aster assembly, the stoichiometry ratio Proteins/NPs was tuned for various nanoparticle concentrations (between 1 to 10 nM). For instance, starting with a given concentration of nanoparticles, we have varied the stoichiometry ratio of Proteins to nanoparticles from 1:1 to 2500:1. We found that in the presence of the magnetic field, microtubule nucleation occurs for a minimum ratio of ~ 300 proteins per nanoparticles (which correspond to ~ 1 protein per 150 nm^2 .) This allows us to determine the minimum number of Ran concentration required to trigger aster assembly, after magnetic accumulation, to be about $0.4 \mu\text{M}$ (NP concentration of 1.5 nM). An estimation of the total number of Ran within a $40 \mu\text{m}$ droplet gives $\sim 10^7$ Ran proteins ($[\text{NPs}] = 1.5 \text{ nM}$). We have reported these results in the Supplementary Figure S4b.

Transmission Electron Microscopy (TEM) and Cryo-TEM

TEM samples were prepared by depositing a drop of a dilute solution of Ademtech nanoparticles

(Ademtech SA, Pessac, France) onto a Formvar coated carbon copper grid (Agar Scientific, Stansted, England). Z-contrast images were achieved on a dedicated aberration-corrected JEOL 2200FS apparatus (Jeol Ltd, Tokyo, Japan) operating at 200 kV in scanning transmission electron microscopy (STEM) mode, using a high angle annular dark field (HAADF) detector. By collecting electrons scattered to high angles, we can yield images where the observed contrast is mainly due to variations in the atomic number of the atoms present in the sample. To image Ran-NP aggregation directly within cellular extracts, magnetically-clustered Ran-NPs were spread on an electron microscopy grid and rapidly frozen in liquid ethane.

Fluorescence energy transfer (FRET) measurements

In order to test the efficiency of Ran-NPs to interact and bind with importin β , we used the FRET biosensor Rango (Ran-regulated importin- β cargo), designed to monitor the release of MAPs from importins. Fluorescence measurements were performed using a LPS 220 spectrofluorimeter equipped with a data recorder and a temperature-controlled cell holder (PTI, Monmouth Junction, NJ). The fluorescence spectra were measured with a 1 cm path-length cell and at a constant temperature of 20°C. First, we had acquired the emission spectra of the cell extracts in absence of Rango and Ran proteins and used these spectra as blank that is subtracted for all measurements. Then, Rango was added to the extract at a final concentration of 2 μ M and we monitored the fluorescence emission spectra (470 to 590 nm) at t=0 min and t=10 min (excitation: 410 and 435 nm). The fluorescence spectrum of the FRET biosensor presents two fluorescence emission peaks at 525 nm and 575 nm corresponding to CFP emission and YFP emission, respectively. Initially (t = 0 min), interaction with importin β is limited and Rango is predominantly under the conformation where fluorescent transfer occurs (see Supplementary Fig. S2a, green line). After 10 minutes of incubation in the extract, the energy transfer decreases (Supplementary Fig. S2a, blue line), illustrating the interactions between Rango and importin β . RanQ69L-GTP or Ran-NPs were added at a final Ran concentration ranging from 1 to 9 μ M and incubated for 15-20 min. Before recording emission spectra, the Ran-NP solution was placed in a magnet in order to remove nanoparticles therefore ruling out any contribution of light absorption and/or scattering by nanoparticles. 20 min after addition of RanGTP, the YFP emission signal increased to reach its initial level, meaning an increase of the FRET that occurs the sequestration of importin β by RanQ69L (Supplementary Fig. S2a, red line).

No change in the fluorescence emission spectra of Rango was observed with uncoated nanoparticles (Supplementary Fig. S2b, red line). These data indicate that the increase of FRET signal observed after addition of Ran-NPs (Fig. 2e) is specific to the presence of Ran, conjugated to nanoparticles.

To rule out any significant role of bleaching at the timescale and excitation power (5 mW/cm²) used in our conditions, we evaluated the bleaching rate of Rango. We found that after 20 cycles of excitations, e.g. 20 minutes of continuous illumination, no significant bleaching of CFP and YFP signals were

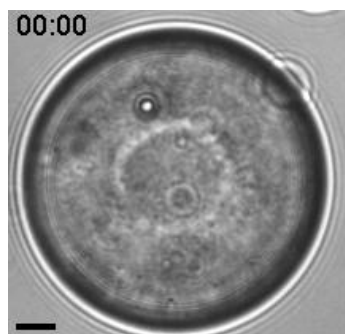
observed. We have computed the acceptor/donor fluorescence intensity ratio as a measure of the FRET ratio.

Protein-nanoparticle accumulation under magnetic field

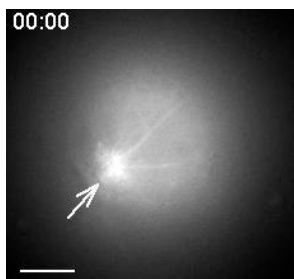
Cell extract containing fluorescent tubulin, ATP regenerating system, and Ran-NPs (or RCC1-NPs) was encapsulated in droplets by water-in-oil emulsion stabilised by a block copolymer (PHS-PEO-PHS, Arlacel). At the initial step, Protein-NPs are homogeneous in the cell extract. Application of a magnetic field by placing a permanent NdFeB magnet at 2 to 3 mm from the emulsion induces an accumulation of Protein-NPs inside droplets in an area close to the magnetic field direction (Figure 2 and Supplementary Movie 1). Application of a rotational magnetic field induces the movement of Protein-NP accumulation inside the droplet, that follows the direction of the magnetic field (supplementary Fig. S5 and Supplementary Movie 2).

We have characterised the magnetic field generated by the NdFeB magnet using hall probe measurements and found a gradient of ~ 50 T/m. We have estimated the forces applied on a nanoparticle, f_{NP} , using both Stoke's law and mean velocity measurements of nanoparticles ($v \sim 0.25 - 0.5 \mu\text{m.s}^{-1}$). We found $f_{NP} \sim 10$ fN. Therefore the total force could be roughly approximated to $F \sim n f_{NP} \sim 200-400$ pN, using a number of particles $n \sim 4 \cdot 10^4$ (corresponding to a concentration of 1nM in a $50 \mu\text{m}$ -droplet).

4 Legends for Supplementary movies



Supplementary Movie 1. Dynamic of Ran-NP accumulation under magnetic field. Scale bar = 10 μm , time lapse in seconds.



Supplementary Movie 2. Magnetic manipulation of microtubule-based structure in response to a rotating magnetic field. Microtubule array polarity rotates jointly with the direction of magnetic forces. Position of the magnet is represented by white arrow. Scale bar = 10 μm . Time in seconds.

5 Numerical Simulations

5.1 General Context for the Simulations

The investigations detailed in the following Section are mainly based on a framework developed to simulate the *Ran* network in the context of nuclear transport and/or mitotic spindle morphogenesis (see Görlich *et al.*,⁵ Riddick & Macara,⁶ and Caudron *et al.*⁷).

5.1.1 Solver and Integration

For each species A present in the mixture, its concentration $[A]$ can be computed as a function of space and time by solving the corresponding partial differential equation (PDE). For instance, if the considered molecule forms a complex $A \cdot B$ with partner B , is produced from substrate C by the enzyme E according to Michaelis-Menten kinetics, and finally is involved in the $A + D \rightarrow F + G$ exchange, one has

$$\frac{\partial[A]}{\partial t} = D_A \Delta[A] - k^+[A][B] + k^-[A \cdot B] + k^{\text{cat}}[E \cdot C] - k^{\text{exc}}[A][D]. \quad (1)$$

The variation of the concentration in A with time t is thus related to both molecular transport and chemical transformation, the diffusion coefficient being denoted D_A and the various kinetic constants k . More precisely, for the latter ones we adopted the following superscripts: $^+$ and $^-$ respectively indicate association and dissociation, $^{\text{cat}}$ is associated with the second step of Michaelis-Menten catalysis, and $^{\text{exc}}$ refers to a two reagents - two products reaction.

We assumed a spherical geometry (see Sec. 5.1.2) and therefore r , the distance to the droplet centre, was used as the sole space coordinate. The Laplacian operator consequently simplified in $\Delta = \partial^2/\partial r^2 + 2/r \times \partial/\partial r$. Moreover, one mainly looked for stationary solutions, i.e. verifying $\partial[A]/\partial t = 0$.

Numerous PDEs being coupled (see Sec. 5.2.2 and 5.3.2), concentration profiles were obtained relying on the finite element method (FEM) software Comsol Multiphysics 3.5a (Comsol, Stockholm, Sweden): one utilised the ‘1D axial symmetry’ solver in the ‘diffusion’ environment. Furthermore, to facilitate integration mass conservation relations were substituted to PDEs each time it was possible, i.e. when the species diffusion coefficient was null because of conjugation to nanoparticles (see Eqs. (20) and (49) below).

Before launching FEM simulations, we selected ‘initial values’ in agreement with the total concentrations given in Table SI1. As mass is always conserved by the solver along calculation, we could check that integrating both initial and final species distribution over space yielded equal results.

5.1.2 Domains

After emulsification of the mixture made of mineral oil and *Xenopus laevis* egg extract supplemented with bioactive magnetic nanoparticles, one obtains droplets with a diameter in between 40 and 80

μm . The latter objects are spherical because their characteristic size is well below the capillary length $\kappa^{-1} = \sqrt{\gamma_{wo}/\rho_w g} \sim 800 \mu\text{m}$ – to find this rough estimate we used the well-known water density $\rho_w = 1000 \text{ kg.m}^{-3}$ and standard gravity $g = 9.8 \text{ m.s}^{-2}$, as well as the extract/oil surface tension that we have previously measured, $\gamma_{wo} = 7 \times 10^{-3} \text{ N.m}^{-1}$.⁸ If no magnetic field is applied colloids are homogeneously dispersed in solution and therefore we can define a single spherical domain of radius $R_d = 30 \mu\text{m}$.

Conversely, nanoparticles assemble when a magnet is approached to the sample. They form magnetic clusters which diameter varies from 4 to 8 μm . Despite the irregular shape these aggregates sometimes exhibit we hypothesise that they are spherical, with a radius $R_c = 3 \mu\text{m}$. Further using the concentration in particles in the initial mix as well as their radius, respectively $C_p = 1.8 \text{ nmol.L}^{-1}$ and $R_p = 60 \text{ nm}$, we can compute the solid density inside a cluster. We find ~ 1 , which is close to the upper theoretical limit of 0.74. As a matter of fact, no molecular diffusion seems possible within this assembly and reactions have to occur at its surface.

Thus, to account for the latter considerations we decided to model magnetic aggregates with a two-layer geometry including (i) an inner core inaccessible to any reagent, (ii) an outer core having the properties of the free solution and being the place where binding to the proteins grafted on the nanoparticles is effective. Accordingly, we chose for the thickness of this envelop a value that reflects the roughness of the interface, i.e. $2 R_p$. Finally, for the sake of simplicity the magnetic clusters were assumed to be centred with respect to the water/oil interface and the equation system could then be solved relying on the sole r coordinate. In summary, for FEM simulations in the applied magnetic field case we defined two spherical and concentric domains, one extending from $R_c - 2R_p = 2.88 \mu\text{m}$ to $R_c = 3 \mu\text{m}$ and the other one from $R_c = 3 \mu\text{m}$ to $R_d = 30 \mu\text{m}$.

The flux in every molecule A is null at the droplet edge, $\partial[A]/\partial r = 0$. After concentration a similar relation characterises the inner core surface. Moreover, continuity conditions are enforced at the boundary between the outer core and the free solution, both for the concentration $[A]$ and the flux $\partial[A]/\partial r$. Although two domains are formed in the presence of the magnet, identical transport and reaction properties apply across the cluster surface. Every reagent, except the one that functionalises nanoparticles, can diffuse freely from one compartment to the other.

5.1.3 Sample compositions

***Xenopus laevis* Egg Extract.** Modeling phenomena that take place in complex biological samples is a difficult task since the considered species may interact with unknown partners. As recently demonstrated by theoretical analysis, participation to hidden pathways significantly decrease the pool of available molecules involved in a given reactive network and therefore has tremendous consequences on its dynamic behavior.⁹ Similarly, sequestration by either non-specific adsorption or specific binding can false simulation results. Paradise *et al.*¹⁰ have reported up to 50 % immobile fraction for some

proteins participating in the *Ran* regulatory cycle. However, latter studies have indicated that the amount of such inactive molecules is most likely limited to a few percents.^{11,12} Thus, for the total concentrations we will here use without any modification the data compiled by the authors that have carried out the first computational works.⁵⁻⁷ Nonetheless, one has to be aware that some of the numbers have been only roughly measured or even simply estimated. Additionally, they most often do not report on *X. laevis* egg extract but on other cell types.

All together with the total amount in each protein, Table SI1 gives the list of the various species that will be taken into account in FEM computations. We here mainly follow the work of Caudron *et al.*⁷ For instance, as the microtubule-associated proteins (*MAPs*) tagged with a NLS sequence constitute a rather heterogeneous ensemble that would be impossible to model, we decided to hypothesise a single entity having an average diffusion coefficient and average thermokinetic parameters. In addition, according to Riddick & Macara,⁶ we explicitly included Importin α in the network.

Proteins Grafted on Nanoparticles. Magnetic nanoparticles were conjugated with either *RCC1*, the guanine nucleotide-exchange factor associated with *Ran*, or *RanQ69L-GTP*, a *Ran* mutant locked in the GTP-active-bound state. These two species will respectively be denoted GEF° and $RanGTP^\circ$ in the following, the $^\circ$ superscript indicating that they have been attached to colloids. By SDS-PAGE we could evaluate that the reaction stoichiometry is around 800 proteins per particle (see Figure S1). Furthermore, as proven by nucleation experiments in absence of magnetic field as well as by FRET titrations, both molecules were proved fully functional (see the Main Text Figure 2).

As far as magnetic triggering of microtubule assembly is concerned, the grafted protein was mixed with the *Xenopus laevis* egg extract to yield a final 1.5 μ M titer (see Table SI1). After magnet application, it resulted in a $(R_d/R_c)^3 \sim 10^3$ enrichment inside the cluster, i.e. a final 1.5 mM total concentration. No conjugated species remains present in free solution. Furthermore, as previously explained, only the molecules in the 120 nm thick outer core are available for chemical interaction. They are homogeneously distributed and their diffusion coefficient is null. Of course all complexes involving a partner attached to the nanoparticles are also immobile.

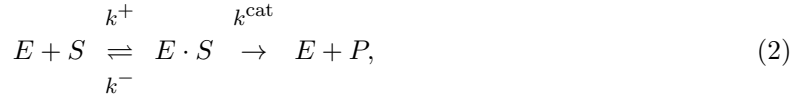
Content in Guanine Nucleotides. To our knowledge, no information on the amount of free *GTP* and *GDP* is available for *X. laevis* egg extract. Consequently, as reported⁷ we will rely on the values established by Traut,¹³ who collected and averaged numerous literature data from various cell types and tissues (see Table SI1). With $[GTP]$ close to half a millimole per liter and $[GDP]$ approaching a tenth of the latter figure, we are nearly one order of magnitude above the concentrations in the other components participating the *Ran* reaction-diffusion system. Then, we can hypothesize that no significant titer variation occurs on the present experiment time-scale: in the following we will always set $[GTP] = 500$ mM and $[GDP] = 50$ mM.

5.1.4 Kinetic Constants

Most of the dynamic parameters injected in FEM simulations are issued from experiments performed using either guanine nucleotide fluorescent analogs enabling stopped-flow investigations and/or proteins bearing various attachment-tags dedicated to SPR sensor functionalisation or affinity purification (see Table SI2). Consequently, discrepancies with the actual biochemical species exist and we found appropriate to give thermokinetic data with a single significant figure.

As noticed by Görlich *et al.*,⁵ one must also consider the effects of macromolecular crowding.¹⁴ Indeed, all reported values were collected in dilute buffers and not in cytoplasm extracts where each protein is surrounded by thousands of other ones. Extrapolating *in vivo* data from *in vitro* ones may be difficult because, for instance, crowding by artificial agents may result in either acceleration or deceleration of molecular kinetics.^{15,16} Additionally, only a few experiments have been undertaken *in cellulo*.¹⁷ Thus, for the present FEM simulations we will not apply any correction to the available corpus, although it has been shown *in silico* that crowding has a significant effect on reaction networks dynamics.¹⁸

Finally, special attention has to be devoted to the modeling of Michaelis-Menten kinetics. In order to express the rate of transformation of a substrate S in a product P by an enzyme E ,



Görlich *et al.*⁵ and Caudron *et al.*⁷ utilises

$$-\frac{\partial[S]}{\partial t} = \frac{\partial[P]}{\partial t} = \frac{k^{\text{cat}}[E]_{\text{tot}}[S]}{K_M + [S]}. \quad (3)$$

with the so-called Michaelis constant given by $K_M = (k^- + k^{\text{cat}})/k^+$ and with $[E]_{\text{tot}}$, the total concentration in enzyme, been equal to $[E] + [E \cdot S]$. The latter expression is obtained from a macroscopic integration of the kinetic equations under the hypotheses that (i) concentrations are homogeneous in space, (ii) the enzymatic system does not exchange matter by chemical transformation nor transport, and (iii) the total amount of enzyme is smaller than the available quantity of substrate.^{19,20} To account for microscopic kinetics in a situation where one of the above assumptions may be not verified, we will rather rely on a complete decomposition of the reaction mechanism, taking into consideration each elementary step associated with the k^+ , k^- , and k^{cat} constants, as well as the diffusion of the $E \cdot S$ complex (see for instance Eqs. (26) and (53)).

5.1.5 Diffusion Coefficients

No experimental data could be found for the considered species diffusing in *X. laevis* egg extract. Thus, similarly to Caudron *et al.*⁷ we computed rough estimates using the Stokes-Einstein equation. The latter relates the diffusion coefficient D of a protein assumed to be spherical to its hydrodynamic

radius R :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (4)$$

with k_B the Boltzmann constant, T the absolute temperature, and η the fluid viscosity. Experiments were performed at room temperature, $T = 293$ K, and according to measurements realised in the cytoplasm of various cell lines the sample was supposed four times more viscous than water, $\eta = 4 \times 10^{-3}$ Pa.s.^{21,22} Finally, R was evaluated thanks to some average protein density d and according to each species molecular weight M :

$$R = \sqrt[3]{\frac{4M}{3\pi d N_a}} \quad (5)$$

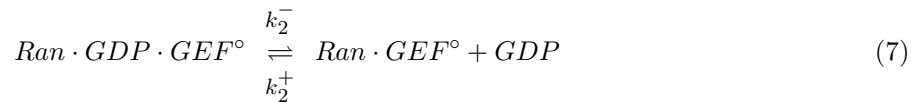
N_a being the Avogadro number. We here selected $d = 1.37$ g.cm⁻³, a commonly accepted value that takes into account the presence of the hydration layer.²³ As far as M is concerned, data corresponding to *X. laevis* were collected on the UniProtKB website. Furthermore, as explained above, microtubule-associated proteins tagged with a NLS sequence were all assumed identical for the sake of simplicity. To model their transport properties we retained the 83 kDa size of *TPX2*, one of the most representative species of the group. One can here remark that this value is also an intermediate one, *Rae1* being only 41 kDa whereas *NuMA* is 257 kDa.

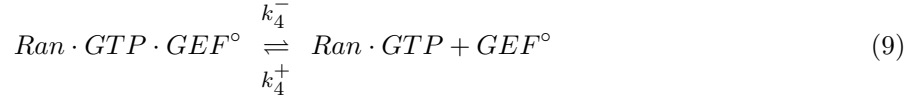
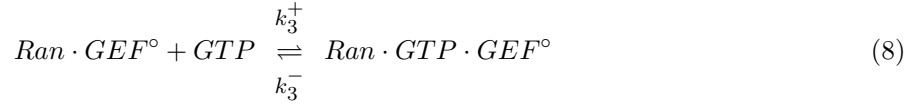
Table SI3 gives for each species both its molecular weight and the corresponding diffusion coefficient that will be used for FEM calculations. As protein sizes have most often been inferred from nucleic acid sequences and as numerous approximations have been invoked all along D calculations, displayed values were rounded in order to keep only two significant figures. However, it is noteworthy that the present coarse hydrodynamic model agrees well with published fluorescence correlation spectroscopy investigations: computation and measurement respectively yield 22 and 24 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ diffusion coefficients for the 27 kDa *eGFP*,¹¹ 23 and 23 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ones for the 25 kDa *eYFP*.¹² Additionally, for the 52 kDa fusion protein *eYFP-Ran* we obtain $D = 18$ $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ while a 17 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ value has been reported.¹²

5.2 Experiments involving GEF^o

5.2.1 Chemical System

Synthesis of Ran·GTP by GEF^o. Exchanging *GDP* for *GTP* on *Ran*, and vice versa, is performed by the *RCC1* guanine nucleotide-exchange factor, which we shall call *GEF*. More precisely, according to Fig. 6 in Klebe *et al.*,²⁴ the catalytic cycle can be described by four successive reactions:

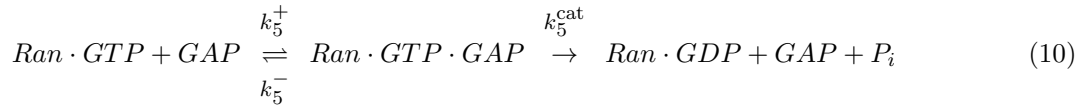




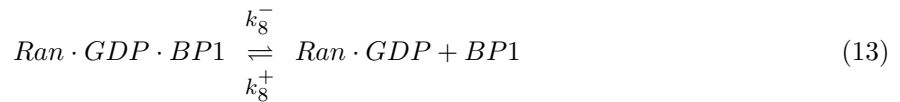
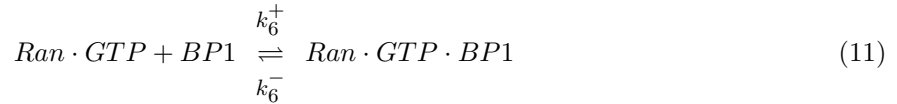
As discussed above, the concentrations in both *GXP*s were assumed constant; therefore, Eqs (7) and (8) correspond to pseudo-first order reactions.

Hydrolysis of Ran·GTP by GAP. The transformation of *Ran · GTP* in *Ran · GDP* is catalysed by *RanGAP*, simply denoted *GAP* below.²⁵ In fact, for the latter enzyme it is possible to work on either *Ran · GTP* alone or on the complex it can form with *RanBP1*,²⁶ a binding protein we shall refer to as *BP1*. In both cases Michaelis-Menten kinetics have been evidenced and from Fig. 13 in Seewald *et al.*²⁵ we can propose the two parallel mechanisms that follow:

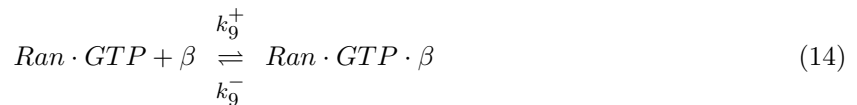
BP1-off pathway

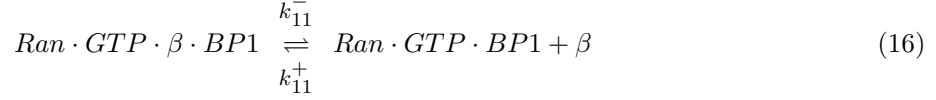
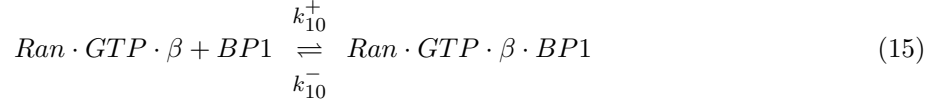


BP1-on pathway

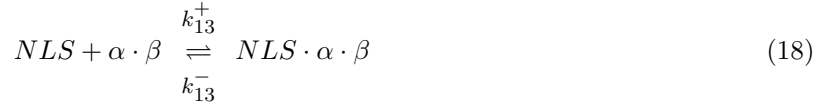


Interactions of Ran·GTP with β . *Ran · GTP* binds to Importin β , called β in the following, and it yields a complex resistant to hydrolysis by *GAP*. Association is slow but very tight; therefore, release is mainly based on a catalytic pathway involving the formation of a ternary adduct with *BP1*:^{27,28}





Interactions of β with NLS. Importin β can be found attached to various molecules, among which microtubule-associated proteins carrying a NLS tag (*MAPs-NLS* or more shortly *NLS* in the present text). For the complex to form, one in fact needs a third species, Importin α , that acts as an adapter in between the two partners:^{29,30}



Furthermore, it has been proven than binding of $Ran \cdot GTP$ to the complexed β is able to induce the dissociation of both α and NLS :^{31,32}



5.2.2 Reaction-Diffusion Equations

The following PDEs apply in the outer core. The ones corresponding to the free solution are deduced by simply setting at zero the concentrations of the species related to the nanoparticles, i.e. indicated by the $^\circ$ superscript.

$$[GEF^\circ] = [GEF^\circ]_{\text{tot}} - [Ran \cdot GDP \cdot GEF^\circ] - [Ran \cdot GEF^\circ] - [Ran \cdot GTP \cdot GEF^\circ] \quad (20)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial [Ran \cdot GDP \cdot GEF^\circ]}{\partial t} = & -k_1^- [Ran \cdot GDP \cdot GEF^\circ] + k_1^+ [Ran \cdot GDP][GEF^\circ] \\ & -k_2^- [Ran \cdot GDP \cdot GEF^\circ] + k_2^+ [Ran \cdot GEF^\circ][GDP]_{\text{e.e.}} \end{aligned} \quad (21)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial [Ran \cdot GEF^\circ]}{\partial t} = & -k_2^+ [Ran \cdot GEF^\circ][GDP]_{\text{e.e.}} + k_2^- [Ran \cdot GDP \cdot GEF^\circ] \\ & -k_3^+ [Ran \cdot GEF^\circ][GTP]_{\text{e.e.}} + k_3^- [Ran \cdot GTP \cdot GEF^\circ] \end{aligned} \quad (22)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial[Ran \cdot GTP \cdot GEF^\circ]}{\partial t} = & -k_3^- [Ran \cdot GTP \cdot GEF^\circ] + k_3^+ [Ran \cdot GEF^\circ][GTP]_{e.e.} \\ & -k_4^- [Ran \cdot GTP \cdot GEF^\circ] + k_4^+ [Ran \cdot GTP][GEF^\circ] \end{aligned} \quad (23)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial[Ran \cdot GDP]}{\partial t} = & D_{Ran \cdot GDP} \Delta[Ran \cdot GDP] \\ & -k_1^+ [Ran \cdot GDP][GEF^\circ] + k_1^- [Ran \cdot GDP \cdot GEF^\circ] \\ & +k_5^{\text{cat}} [Ran \cdot GTP \cdot GAP] \\ & -k_8^+ [Ran \cdot GDP][BP1] + k_8^- [Ran \cdot GDP \cdot BP1] \end{aligned} \quad (24)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial[Ran \cdot GTP]}{\partial t} = & D_{Ran \cdot GTP} \Delta[Ran \cdot GTP] \\ & -k_4^+ [Ran \cdot GTP][GEF^\circ] + k_4^- [Ran \cdot GTP \cdot GEF^\circ] \\ & -k_5^+ [Ran \cdot GTP][GAP] + k_5^- [Ran \cdot GTP \cdot GAP] \\ & -k_6^+ [Ran \cdot GTP][BP1] + k_6^- [Ran \cdot GTP \cdot BP1] \\ & -k_9^+ [Ran \cdot GTP][\beta] + k_9^- [Ran \cdot GTP \cdot \beta] \\ & -k_{14}^{\text{exc}} [Ran \cdot GTP][NLS \cdot \alpha \cdot \beta] \end{aligned} \quad (25)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial[GAP]}{\partial t} = & D_{GAP} \Delta[GAP] \\ & -k_5^+ [Ran \cdot GTP][GAP] + k_5^- [Ran \cdot GTP \cdot GAP] \\ & +k_5^{\text{cat}} [Ran \cdot GTP \cdot GAP] \\ & -k_7^+ [Ran \cdot GTP \cdot BP1][GAP] + k_7^- [Ran \cdot GTP \cdot BP1 \cdot GAP] \\ & +k_7^{\text{cat}} [Ran \cdot GTP \cdot BP1 \cdot GAP] \end{aligned} \quad (26)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial[Ran \cdot GTP \cdot GAP]}{\partial t} = & D_{Ran \cdot GTP \cdot GAP} \Delta[Ran \cdot GTP \cdot GAP] \\ & -k_5^- [Ran \cdot GTP \cdot GAP] + k_5^+ [Ran \cdot GTP][GAP] \\ & -k_5^{\text{cat}} [Ran \cdot GTP \cdot GAP] \end{aligned} \quad (27)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial[BP1]}{\partial t} = & D_{BP1} \Delta[BP1] \\ & -k_6^+ [Ran \cdot GTP][BP1] + k_6^- [Ran \cdot GTP \cdot BP1] \\ & -k_8^+ [Ran \cdot GDP][BP1] + k_8^- [Ran \cdot GDP \cdot BP1] \\ & -k_{10}^+ [Ran \cdot GTP \cdot \beta][BP1] + k_{10}^- [Ran \cdot GTP \cdot \beta \cdot BP1] \end{aligned} \quad (28)$$

$$\begin{aligned}
\frac{\partial[Ran \cdot GTP \cdot BP1]}{\partial t} &= D_{Ran \cdot GTP \cdot BP1} \Delta[Ran \cdot GTP \cdot BP1] \\
&\quad -k_6^- [Ran \cdot GTP \cdot BP1] + k_6^+ [Ran \cdot GTP][BP1] \\
&\quad -k_7^+ [Ran \cdot GTP \cdot BP1][GAP] + k_7^- [Ran \cdot GTP \cdot BP1 \cdot GAP] \\
&\quad -k_{11}^+ [Ran \cdot GTP \cdot BP1][\beta] + k_{11}^- [Ran \cdot GTP \cdot \beta \cdot BP1]
\end{aligned} \tag{29}$$

$$\begin{aligned}
\frac{\partial[Ran \cdot GTP \cdot BP1 \cdot GAP]}{\partial t} &= D_{Ran \cdot GTP \cdot BP1 \cdot GAP} \Delta[Ran \cdot GTP \cdot BP1 \cdot GAP] \\
&\quad -k_7^- [Ran \cdot GTP \cdot BP1 \cdot GAP] + k_7^+ [Ran \cdot GTP \cdot BP1][GAP] \\
&\quad -k_7^{\text{cat}} [Ran \cdot GTP \cdot BP1 \cdot GAP]
\end{aligned} \tag{30}$$

$$\begin{aligned}
\frac{\partial[Ran \cdot GDP \cdot BP1]}{\partial t} &= D_{Ran \cdot GDP \cdot BP1} \Delta[Ran \cdot GDP \cdot BP1] \\
&\quad -k_8^- [Ran \cdot GDP \cdot BP1] + k_8^+ [Ran \cdot GDP][BP1]
\end{aligned} \tag{31}$$

$$\begin{aligned}
\frac{\partial[\beta]}{\partial t} &= D_\beta \Delta[\beta] \\
&\quad -k_9^+ [Ran \cdot GTP][\beta] + k_9^- [Ran \cdot GTP \cdot \beta] \\
&\quad -k_{11}^+ [Ran \cdot GTP \cdot BP1][\beta] + k_{11}^- [Ran \cdot GTP \cdot \beta \cdot BP1] \\
&\quad -k_{12}^+ [\alpha][\beta] + k_{12}^- [\alpha \cdot \beta]
\end{aligned} \tag{32}$$

$$\begin{aligned}
\frac{\partial[Ran \cdot GTP \cdot \beta]}{\partial t} &= D_{Ran \cdot GTP \cdot \beta} \Delta[Ran \cdot GTP \cdot \beta] \\
&\quad -k_9^- [Ran \cdot GTP \cdot \beta] + k_9^+ [Ran \cdot GTP][\beta] \\
&\quad -k_{10}^+ [Ran \cdot GTP \cdot \beta][BP1] + k_{10}^- [Ran \cdot GTP \cdot \beta \cdot BP1] \\
&\quad +k_{14}^{\text{exc}} [Ran \cdot GTP][NLS \cdot \alpha \cdot \beta]
\end{aligned} \tag{33}$$

$$\begin{aligned}
\frac{\partial[Ran \cdot GTP \cdot \beta \cdot BP1]}{\partial t} &= D_{Ran \cdot GTP \cdot \beta \cdot BP1} \Delta[Ran \cdot GTP \cdot \beta \cdot BP1] \\
&\quad -k_{10}^- [Ran \cdot GTP \cdot \beta \cdot BP1] + k_{10}^+ [Ran \cdot GTP \cdot \beta][BP1] \\
&\quad -k_{11}^- [Ran \cdot GTP \cdot \beta \cdot BP1] + k_{11}^+ [Ran \cdot GTP \cdot BP1][\beta]
\end{aligned} \tag{34}$$

$$\begin{aligned}
\frac{\partial[\alpha]}{\partial t} &= D_\alpha \Delta[\alpha] \\
&\quad +k_{14}^{\text{exc}} [Ran \cdot GTP][NLS \cdot \alpha \cdot \beta] \\
&\quad -k_{12}^+ [\alpha][\beta] + k_{12}^- [\alpha \cdot \beta]
\end{aligned} \tag{35}$$

$$\frac{\partial[\alpha \cdot \beta]}{\partial t} = D_{\alpha \cdot \beta} \Delta[\alpha \cdot \beta] \tag{36}$$

$$\begin{aligned}
& -k_{12}^-[\alpha \cdot \beta] + k_{12}^+[\alpha][\beta] \\
& -k_{13}^-[\alpha \cdot \beta][NLS] + k_{13}^+[NLS \cdot \alpha \cdot \beta]
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{\partial[NLS]}{\partial t} = & D_{NLS} \Delta[NLS] \\
& + k_{14}^{\text{exc}}[Ran \cdot GTP][NLS \cdot \alpha \cdot \beta] \\
& - k_{13}^+[NLS][\alpha \cdot \beta] + k_{13}^-[NLS \cdot \alpha \cdot \beta]
\end{aligned} \tag{37}$$

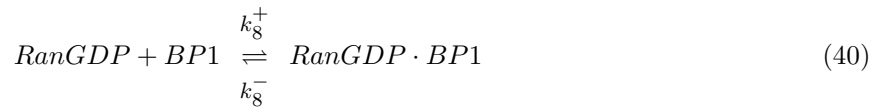
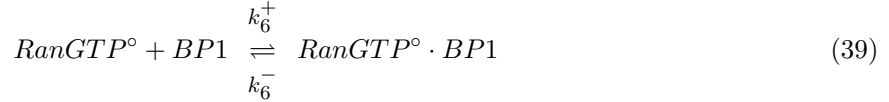
$$\begin{aligned}
\frac{\partial[NLS \cdot \alpha \cdot \beta]}{\partial t} = & D_{NLS \cdot \alpha \cdot \beta} \Delta[NLS \cdot \alpha \cdot \beta] \\
& - k_{14}^{\text{exc}}[Ran \cdot GTP][NLS \cdot \alpha \cdot \beta] \\
& - k_{13}^-[NLS \cdot \alpha \cdot \beta] + k_{13}^+[NLS][\alpha \cdot \beta]
\end{aligned} \tag{38}$$

5.3 Experiments involving RanGTP^o

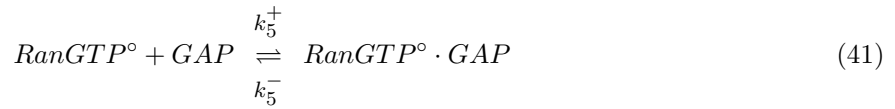
5.3.1 Chemical System

The Section 5.2.1 framework was conserved. Numerous proteins are able to bind the nanoparticles through specific interactions with the non-hydrolysable *RanGTP^o* compound and the sole reactions taking place in solution are the ones involving the associations of *BP1* with native *Ran \cdot GDP*, α with β , and $\alpha \cdot \beta$ with *NLS*.

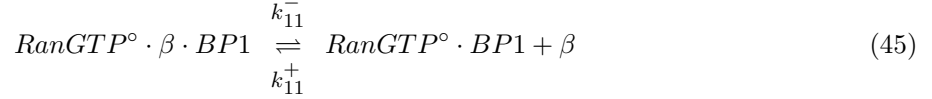
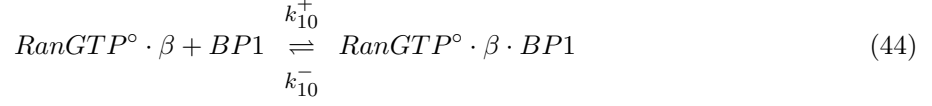
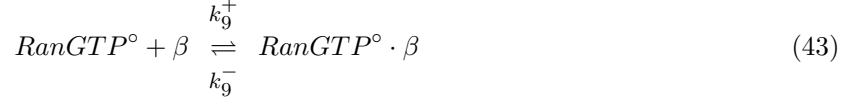
Interactions of BP1 with RanGTP^o and RanGDP.



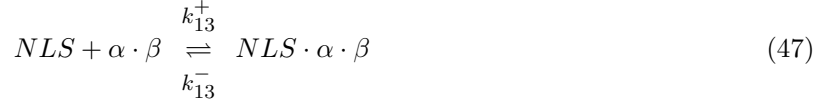
Binding of GAP to RanGTP^o coated nanoparticles.



Binding of β to RanGTP° coated nanoparticles.



Interactions of β with NLS.



5.3.2 Reaction-Diffusion Equations

$$\begin{aligned} [\text{RanGTP}^\circ] &= [\text{RanGTP}^\circ]_{\text{tot}} \\ &\quad - [\text{RanGTP}^\circ \cdot \text{BP1}] - [\text{RanGTP}^\circ \cdot \text{GAP}] - [\text{RanGTP}^\circ \cdot \text{BP1} \cdot \text{GAP}] \\ &\quad - [\text{RanGTP}^\circ \cdot \beta] - [\text{RanGTP}^\circ \cdot \beta \cdot \text{BP1}] \end{aligned} \quad (49)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial [\text{Ran} \cdot \text{GDP}]}{\partial t} &= D_{\text{Ran} \cdot \text{GDP}} \Delta [\text{Ran} \cdot \text{GDP}] \\ &\quad - k_8^+ [\text{Ran} \cdot \text{GDP}] [\text{BP1}] + k_8^- [\text{Ran} \cdot \text{GDP} \cdot \text{BP1}] \end{aligned} \quad (50)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial [\text{BP1}]}{\partial t} &= D_{\text{BP1}} \Delta [\text{BP1}] \\ &\quad - k_6^+ [\text{RanGTP}^\circ] [\text{BP1}] + k_6^- [\text{RanGTP}^\circ \cdot \text{BP1}] \\ &\quad - k_8^+ [\text{Ran} \cdot \text{GDP}] [\text{BP1}] + k_8^- [\text{Ran} \cdot \text{GDP} \cdot \text{BP1}] \\ &\quad - k_{10}^+ [\text{RanGTP}^\circ \cdot \beta] [\text{BP1}] + k_{10}^- [\text{RanGTP}^\circ \cdot \beta \cdot \text{BP1}] \end{aligned} \quad (51)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial[RanGTP^\circ \cdot BP1]}{\partial t} &= -k_6^- [RanGTP^\circ \cdot BP1] + k_6^+ [RanGTP^\circ][BP1] \\ &\quad -k_7^+ [RanGTP^\circ \cdot BP1][GAP] + k_7^- [RanGTP^\circ \cdot BP1 \cdot GAP] \\ &\quad -k_{11}^+ [RanGTP^\circ \cdot BP1][\beta] + k_{11}^- [RanGTP^\circ \cdot \beta \cdot BP1] \end{aligned} \quad (52)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial[GAP]}{\partial t} &= D_{GAP} \Delta[GAP] \\ &\quad -k_5^+ [RanGTP^\circ][GAP] + k_5^- [RanGTP^\circ \cdot GAP] \\ &\quad -k_7^+ [RanGTP^\circ \cdot BP1][GAP] + k_7^- [RanGTP^\circ \cdot BP1 \cdot GAP] \end{aligned} \quad (53)$$

$$\frac{\partial[RanGTP^\circ \cdot GAP]}{\partial t} = -k_5^- [RanGTP^\circ \cdot GAP] + k_5^+ [RanGTP^\circ][GAP] \quad (54)$$

$$\frac{\partial[RanGTP^\circ \cdot BP1 \cdot GAP]}{\partial t} = -k_7^- [RanGTP^\circ \cdot BP1 \cdot GAP] + k_7^+ [RanGTP^\circ \cdot BP1][GAP] \quad (55)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial[\beta]}{\partial t} &= D_\beta \Delta[\beta] \\ &\quad -k_9^+ [RanGTP^\circ][\beta] + k_9^- [RanGTP^\circ \cdot \beta] \\ &\quad -k_{11}^+ [RanGTP^\circ \cdot BP1][\beta] + k_{11}^- [RanGTP^\circ \cdot \beta \cdot BP1] \\ &\quad -k_{12}^+ [\alpha][\beta] + k_{12}^- [\alpha \cdot \beta] \end{aligned} \quad (56)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial[RanGTP^\circ \cdot \beta]}{\partial t} &= -k_9^- [RanGTP^\circ \cdot \beta] + k_9^+ [RanGTP^\circ][\beta] \\ &\quad -k_{10}^+ [RanGTP^\circ \cdot \beta][BP1] + k_{10}^- [RanGTP^\circ \cdot \beta \cdot BP1] \\ &\quad +k_{14}^{exc} [Ran \cdot GTP][NLS \cdot \alpha \cdot \beta] \end{aligned} \quad (57)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial[RanGTP^\circ \cdot \beta \cdot BP1]}{\partial t} &= -k_{10}^- [RanGTP^\circ \cdot \beta \cdot BP1] + k_{10}^+ [RanGTP^\circ \cdot \beta][BP1] \\ &\quad -k_{11}^- [RanGTP^\circ \cdot \beta \cdot BP1] + k_{11}^+ [RanGTP^\circ \cdot BP1][\beta] \end{aligned} \quad (58)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial[\alpha]}{\partial t} &= D_\alpha \Delta[\alpha] \\ &\quad +k_{14}^{exc} [Ran \cdot GTP^\circ][NLS \cdot \alpha \cdot \beta] \\ &\quad -k_{12}^+ [\alpha][\beta] + k_{12}^- [\alpha \cdot \beta] \end{aligned} \quad (59)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial[\alpha \cdot \beta]}{\partial t} &= D_{\alpha \cdot \beta} \Delta[\alpha \cdot \beta] \\ &\quad -k_{12}^- [\alpha \cdot \beta] + k_{12}^+ [\alpha][\beta] \\ &\quad -k_{13}^- [\alpha \cdot \beta][NLS] + k_{13}^+ [NLS \cdot \alpha \cdot \beta] \end{aligned} \quad (60)$$

$$\begin{aligned}
\frac{\partial[NLS]}{\partial t} &= D_{NLS} \Delta[NLS] \\
&\quad + k_{14}^{\text{exc}}[Ran \cdot GTP^o][NLS \cdot \alpha \cdot \beta] \\
&\quad - k_{13}^+[NLS][\alpha \cdot \beta] + k_{13}^-[NLS \cdot \alpha \cdot \beta]
\end{aligned} \tag{61}$$

$$\begin{aligned}
\frac{\partial[NLS \cdot \alpha \cdot \beta]}{\partial t} &= D_{NLS \cdot \alpha \cdot \beta} \Delta[NLS \cdot \alpha \cdot \beta] \\
&\quad - k_{14}^{\text{exc}}[Ran \cdot GTP^o][NLS \cdot \alpha \cdot \beta] \\
&\quad - k_{13}^-[NLS \cdot \alpha \cdot \beta] + k_{13}^+[NLS][\alpha \cdot \beta]
\end{aligned} \tag{62}$$

Supplementary Table SII. List of the proteins we relied on to account for the experimental results on the spatiotemporal control of microtubule nucleation and assembly. Each molecule is described by its full name and the abbreviation used in the present supporting document. Additionally, we itemised all the species it belongs to and give the sum of the corresponding concentrations before application of the magnet. When possible the latter values refer to original measurements; on the opposite, a reference in italic indicates that the reported figure is only an estimate. ^{exp} means that the concentration was in the present work imposed by the experimentalist, as described in Sec. 5.1.3. We took $[GTP] = 500 \mu M$ and $[GDP] = 50 \mu M$, according to the data averaged by Traut.¹³

Molecule full name	Molecule abbreviated name	<i>GEF</i> ^o experiments		<i>RanGTP</i> ^o experiments	
		Considered species	Total concentration (μM)	Considered species	Total concentration (μM)
RAs-related Nuclear protein	<i>Ran</i>	<i>Ran</i> · <i>GDP</i> · <i>GEF</i> ^o	2	<i>Ran</i> · <i>GDP</i>	2
		<i>Ran</i> · <i>GEF</i> ^o		<i>Ran</i> · <i>GDP</i> · <i>BP1</i>	
		<i>Ran</i> · <i>GTP</i> · <i>GEF</i> ^o			
		<i>Ran</i> · <i>GDP</i>			
		<i>Ran</i> · <i>GTP</i>			
		<i>Ran</i> · <i>GTP</i> · <i>GAP</i>			
		<i>Ran</i> · <i>GTP</i> · <i>BP1</i>			
		<i>Ran</i> · <i>GTP</i> · <i>BP1</i> · <i>GAP</i>			
		<i>Ran</i> · <i>GDP</i> · <i>BP1</i>			
		<i>Ran</i> · <i>GTP</i> · β			
Regulator of Chromosome Condensation 1 (<i>RCC1</i>)	<i>GEF</i>	<i>Ran</i> · <i>GTP</i> · β · <i>BP1</i>		<i>RanGTP</i> ^o · β · <i>BP1</i>	
		<i>GEF</i> ^o	1.5		
		<i>Ran</i> · <i>GDP</i> · <i>GEF</i> ^o		<i>RanGTP</i> ^o · <i>BP1</i>	
		<i>Ran</i> · <i>GEF</i> ^o		<i>RanGTP</i> ^o · <i>GAP</i>	
Ran Binding Protein 1 (<i>RanBP1</i>)	<i>BP1</i>	<i>Ran</i> · <i>GTP</i> · <i>GEF</i> ^o		<i>RanGTP</i> ^o · β	
		<i>Ran</i> · <i>GTP</i> · <i>BP1</i>	2	<i>BP1</i>	2
		<i>Ran</i> · <i>GTP</i> · <i>BP1</i> · <i>BP1</i>		<i>RanGTP</i> ^o · <i>BP1</i>	
		<i>Ran</i> · <i>GTP</i> · <i>BP1</i> · <i>GAP</i>		<i>RanGTP</i> ^o · <i>BP1</i> · <i>GAP</i>	
		<i>Ran</i> · <i>GDP</i> · <i>BP1</i>		<i>RanGDP</i> · <i>BP1</i>	
Ran GTPase Activating Protein (<i>RanGAP</i>)	<i>GAP</i>	<i>Ran</i> · <i>GTP</i> · β · <i>BP1</i>		<i>RanGTP</i> ^o · β · <i>BP1</i>	
		<i>GAP</i>	0.7	<i>GAP</i>	0.7
		<i>Ran</i> · <i>GTP</i> · <i>GAP</i>		<i>RanGTP</i> ^o · <i>GAP</i>	
		<i>Ran</i> · <i>GTP</i> · <i>BP1</i> · <i>GAP</i>		<i>RanGTP</i> ^o · <i>BP1</i> · <i>GAP</i>	
Importin β	β	β	3	β	3
		<i>Ran</i> · <i>GTP</i> · β		<i>RanGTP</i> ^o · β	
		<i>Ran</i> · <i>GTP</i> · β · <i>BP1</i>		<i>RanGTP</i> ^o · β · <i>BP1</i>	
		α · β		α · β	
Importin α	α	<i>NLS</i> · α · β		<i>NLS</i> · α · β	
		α	1	α	1
		α · β		α · β	
		<i>NLS</i> · α · β		<i>NLS</i> · α · β	
Microtubule-Associated Proteins with a Nuclear Localisation Signal (<i>MAPs-NLS</i>)	<i>NLS</i>	<i>NLS</i>	1	<i>NLS</i>	1
		<i>NLS</i> · α · β		<i>NLS</i> · α · β	

Supplementary Table SI2. Kinetic constants for the reactions associated with *Ran* cycling and the generation of a gradient of *MAPs-NLS*. Data are mostly issued from *in vitro* measurements on recombinant and purified proteins issued from various sources. However, sometimes only estimates are available, the reference is then written in italic.

Constant name	Value	Unit	Ref.
k_1^+	70	$10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	24
k_1^-	50	s^{-1}	24
k_2^+	10	$10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	24
k_2^-	20	s^{-1}	24
k_3^+	0.6	$10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	24
k_3^-	20	s^{-1}	24
k_4^+	100	$10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	24
k_4^-	50	s^{-1}	24
k_5^+	20	$10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	25
k_5^-	100	s^{-1}	25
k_5^{cat}	8	s^{-1}	25
k_6^+	0.5	$10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	26
k_6^-	0.0004	s^{-1}	26
k_7^+	400	$10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	25
k_7^-	900	s^{-1}	25
k_7^{cat}	10	s^{-1}	25
k_8^+	0.08	$10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	26
k_8^-	0.5	s^{-1}	26
k_9^+	0.02	$10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	28
k_9^-	0.00001	s^{-1}	28
k_{10}^+	0.3	$10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	7
k_{10}^-	0.0004	s^{-1}	6
k_{11}^-	0.04	s^{-1}	7
k_{11}^+	0.05	$10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	28
k_{12}^+	0.035	$10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	30
k_{12}^-	0.0005	s^{-1}	30
k_{13}^+	0.005	$10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	30
k_{13}^-	0.0005	s^{-1}	30
k_{14}^{exc}	0.45	$10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	7

Supplementary Table SI3. Estimation of the diffusion coefficients D for the species involved in our model. Computations relied on the Stokes-Einstein equation using molecular weights M issued from the UniProtKB database and a 1.37 average protein density.

Species name	Molecular weight M (kDa)	Diffusion coefficient D (10^{-12} m ² s ⁻¹)
$Ran \cdot GDP$ / $Ran \cdot GTP$	24	23
GAP	63	17
$BP1$	24	23
$Ran \cdot GTP \cdot GAP$	87	15
$Ran \cdot GDP \cdot BP1$ / $Ran \cdot GTP \cdot BP1$	49	18
$Ran \cdot GTP \cdot BP1 \cdot GAP$	112	14
$Ran \cdot GTP \cdot \beta$	122	14
$Ran \cdot GTP \cdot \beta \cdot BP1$	146	13
β	97	15
α	58	17
$\alpha \cdot \beta$	155	12
NLS	83	15
$NLS \cdot \alpha \cdot \beta$	238	10

References

1. A. Desai, A. Murray, T. J. Mitchison, C. E. Walczak, *Methods Cell Biol.* **1999**, *61*, 385–412.
2. M. Pinot, F. Chesnel, J. Z. Kubiak, I. Arnal, F. J. Nedelec, Z. Gueroui, *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 954–960.
3. R. K. Doot, H. Hess, V. Vogel, *Soft Matter* **2007**, *3*, 349–356.
4. B. H. Gibbons, I. R. Gibbons, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 8354–8359.
5. D. Görlich, M. J. Seewald, K. Ribbeck, *EMBO J.* **2003**, *22*, 1088–1100.
6. G. Riddick, I. G. Macara, *J. Cell Biol.* **2005**, *168*, 1027–1038.
7. M. Caudron, G. Bunt, P. Bastiaens, E. Karsenti, *Science* **2005**, *309*, 1373–1376.
8. A. M. Jimenez, M. Roché, M. Pinot, P. Panizza, L. Courbin, Z. Gueroui, *Lab Chip* **2011**, *11*, 429–434.
9. Y. Rondelez, *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *108*, 018102.
10. A. Paradise, M. K. Levin, G. Korza, J. H. Carson, *J. Mol. Biol.* **2007**, *365*, 50–65.
11. J. Wu, A. H. Corbett, K. M. Berland, *Biophys. J.* **2009**, *97*, 3840–3849.
12. A. Abu-Arish, P. Kalab, J. Ng-Kamstra, K. Weis, C. Fradin, *Biophys. J.* **2009**, *97*, 2164–2178.
13. T. W. Traut, *Mol. cell. Biochem.* **1994**, *140*, 1–22.
14. R. J. Ellis, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 114–119.
15. K. Totani, Y. Ihara, I. Matsuo, Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2101–2107.
16. A. Dhar, A. Samiotakis, S. Ebbinghaus, L. Nienhaus, D. Homouz, M. Gruebele, M. S. Cheung, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 17586–17591.
17. I. Schoen, H. Krammer, D. Braun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 21649–21654.
18. M. J. Morelli, R. J. Allen, P. R. ten Wolde, *Biophys. J.* **2011**, *101*, 2882–2891.
19. C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry, Part III*, Freeman, New York, 1980.
20. D. A. Beard, H. Qian, *Chemical Biophysics: Quantitative Analysis of Cellular Systems*, Cambridge University Press, Cambridge, 2008.
21. A. S. Verkman, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 27–33.

22. This value from Verkman²¹ may seem in contradiction with the $\eta = 20 \times 10^{-3}$ Pas.s one reported in Valentine *et al.*, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 680–689, and used in the Main Text to estimate the viscous force applying on the 120 nm diameter magnetic particles. However, diffusion in complex fluids is often length scale depend and we thus favored experimental data collected on tracers having a size similar to the one of the objects under consideration. The former paper dealt with proteins whereas the latter studied the behavior of 1 μ m diameter beads.
23. H. Fischer, I. Polikarpov, A. F. Craievich, *Prot. Sci.* **2004**, *13*, 2825–2828.
24. C. Klebe, H. Prinz, A. Wittinghofer, R. S. Goody, *Biochemistry* **1995**, *34*, 12543–12552.
25. M. J. Seewald, A. Kraemer, M. Farkasovsky, C. Körner, A. Wittinghofer, I. R. Vetter, *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 8124–8136.
26. J. Kulhmann, I. Macara, A. Wittinghofer, *Biochemistry* **1997**, *36*, 12027–12035.
27. F. R. Bischoff, D. Görlich, *FEBS Lett.* **1997**, *419*, 249–254.
28. C. I. Villa Braslavsky, C. Nowak, D. Görlich, A. Wittinghofer, J. Kulhmann, *Biochemistry* **2000**, *39*, 11629–11639.
29. P. Fanara, M. R. Hodel, A. H. Corbett, A. E. Hodel, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21218–21223.
30. B. Catimel, T. Teh, M. R. M. Fontes, I. G. Jennings, D. A. Jans, G. J. Howlett, E. C. Nice, B. Kobe, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 34189–34198.
31. M. Rexach, G. Blobel, *Cell* **1995**, *83*, 683–692.
32. J. Morianu, G. Blobel, A. Radu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 7059–7062.
33. I. Palacios, K. Weis, C. Klebe, I. W. Mattaj, C. Dingwall, *J. Cell Biol.* **1996**, *133*, 485–494.
34. F. R. Bischoff, H. Krebber, E. Smirnova, W. H. Dong, H. Ponstogl, *EMBO J.* **1995**, *14*, 705–715.
35. K. Ribbeck, G. Lipowsky, H. M. Kent, M. Stewart, D. Görlich, *EMBO J.* **1998**, *17*, 6587–6598.

2.3 Magnetic control of protein spatial patterning to direct microtubule self-assembly

En révision chez la revue *ACS Nano*

Résumé de la méthodologie implémentée

Une suspension de nanobilles fonctionnalisées par la protéine RanGTPQ69L est immergée dans un canal microfluidique déposé sur un réseau micro-structuré de plots de matériau ferromagnétique. Soumis à une excitation magnétique uniforme, chaque élément de ferromagnétique s'aimante créant un champ magnétique local non-uniforme. Ainsi, il se forme des colonnes dont le diamètre peut, selon les conditions, varier entre la taille d'une nanoparticule et plusieurs microns. Nous pouvons ainsi suivre le comportement des microtubules au sein d'un environnement compétitif de taille contrôlée.

Ma contribution aux résultats présentés dans cet article

Pour ce travail, j'ai réalisé les réseaux de plots de nickel structurés selon un pas hexagonal compris entre 5 et 20 μm , déposés sur une lamelle de verre et recouverts d'une couche protectrice en silice de 100 nm d'épaisseur. De plus, j'ai déterminé les dimensions appropriées des canaux microfluidiques, à savoir une largeur comprise entre 100 et 500 μm et une hauteur qui varie entre 10 et 60 μm pour atteindre un réseau de colonnes de nanoparticules fonctionnalisées stable. J'ai alors sélectionné les valeurs de champs magnétiques produits par une bobine magnétique adaptées à la génération de colonnes de nanoparticules superparamagnétiques immergées dans des extraits acellulaires.

J'ai par la suite participé aux expériences préliminaires au sein d'extraits afin de générer des réseaux de colonnes composées de nanobilles fonctionnalisées par la protéine RanGTPQ69L. Ce type d'expérience permet la formation en 15 à 20 minutes d'asters de microtubules selon un pas fixé par la concentration en nanobilles superparamagnétiques fonctionnalisées, la hauteur ainsi que la largeur du microcanal et le pas des plots ferromagnétiques.

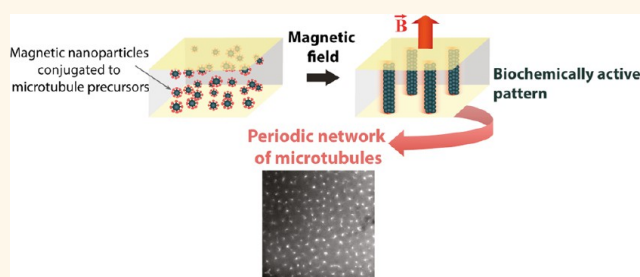
Enfin, j'ai adapté le modèle théorique de réaction-diffusion élaboré pour l'article «Spatiotemporal control of microtubule nucleation and assembly using magnetic nanoparticles» (cf. 2.2) pour ces manipulations au sein de canaux. Ceci nous a permis de partiellement caractériser la manière dont le réseau de signalisation Ran génère la nucléation et la croissance des microtubules à l'échelle moléculaire.

Magnetic Control of Protein Spatial Patterning to Direct Microtubule Self-Assembly

Céline Hoffmann,[†] Elsa Mazari,[‡] Charlie Gosse,[‡] Louise Bonnemay,[†] Sarah Hostachy,[†] Jérémie Gautier,[†] and Zoher Gueroui^{†,*}

[†]Department of Chemistry, Ecole Normale Supérieure, UMR 8640 CNRS-ENS-UPMC Pasteur, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France and [‡]Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, LPN-CNRS, route de Nozay, 91460 Marcoussis, France. C.H. and Z.G. conceived and designed the experiments. C.H., L.B., S.H., J.G., and E.M. performed the experiments. All authors analyzed the data. C.H. and Z.G. wrote the manuscript, and all authors commented on it.

ABSTRACT Living systems offer attractive strategies to generate nanoscale structures because of their innate functional properties such as the dynamic assembly of ordered nanometer fibers, the generation of mechanical forces, or the directional transport mediated by molecular motors. The design of hybrid systems, capable of interfacing artificial building blocks with biomolecules, may be a key step toward the rational design of nanoscale devices and materials. Here, we have designed a bottom-up approach to organize cytoskeletal elements in space using the self-assembly properties of magnetic nanoparticles conjugated to signaling proteins involved in microtubule nucleation. We show that magnetic nanoparticles conjugated to signaling proteins involved in microtubule nucleation can control the positioning of microtubule assembly. Under a magnetic field, a self-organized pattern of biofunctionalized nanoparticles is formed and leads to the nucleation of a periodical network of microtubules in *Xenopus laevis* egg extract. Our method shows how bioactive nanoparticles can generate a biochemically active pattern upon magnetic actuation, which triggers the spatial organization of nonequilibrium biological structures.



KEYWORDS: self-organization · protein signaling · magnetic nanoparticles · biological materials · self-assembly · microtubule · magnetogenetics

The design of hybrid systems, capable of interfacing artificial building blocks with biomolecules, is a key step toward the rational design of nanoscale devices and materials^{1,2} and offers to bridge the gap between top-down and bottom-up approaches.^{3,4} Patterning techniques using top-down approaches such as microcontact printing,^{5,6} photolithography,⁷ and nanoparticle-based protein patterns⁸ are powerful tools of control at the molecular, cellular, and tissue scales. Notably, surface patterning of proteins has increased the understanding of numerous processes, from protein–protein interactions,⁹ to cell behavior, such as extracellular matrix–cell interactions,^{10,11} cell spreading and adhesion,¹² or neurite outgrowth.¹³ Complementary to these surface patterning techniques, bottom-up approaches that use the self-assembly properties of interacting species, including macromolecules or colloidal particles, have

been used to generate specific patterns and engineer new materials.^{14–16} DNA, the cellular membrane, and the cytoskeleton are just several examples of the many self-association processes based on the intrinsic properties of biomolecules found within biological systems.^{17–20} The physical properties of cytoskeleton proteins can be exploited to generate new materials having novel properties^{21–24} or hybrid assemblies with inorganic nanoparticles.^{25,26} Expanding on this domain, microtubule (MT) fibers have unique mechanical and chemical properties that permit efficient directional transport of cargos using specific molecular motors powered by ATP.^{27,28} The transport of specific molecular components at the mesoscopic scale could therefore be achieved without requiring mass transport along fluid pressure gradients.²⁹ In addition, networks of microtubule asters could be used as programmed bioinspired templates with perspectives including the

* Address correspondence to zoher.gueroui@ens.fr.

Received for review May 6, 2013 and accepted October 15, 2013.

Published online 10.1021/nn4022873

© XXXX American Chemical Society

control of the positioning or growth of inorganic materials²⁶ and functional devices such as optical devices.³⁰

The assembly of magnetic colloidal particles under magnetic field has allowed for the generation of various spatial structures, such as linear arrays^{31,32} and ring colloidal superstructures.³³ For instance, linear arrays of particles have been used as templates for examining the mitotic spindle morphogenetic properties or as force sensors during actin filament polymerization.^{34,35} Magnetic nanoparticles conjugated to proteins were used to trigger specific signaling pathways involved in cellular functions.^{36–41} Moreover, magnetic beads that were self-assembled into a quasi-regular array of columns have been successfully used in a broad range of applications, including DNA separation,^{42,43} protein digestion,⁴⁴ and cell sorting.⁴⁵ Here, we demonstrate a bottom-up approach to organize cytoskeletal elements in space using the self-assembly properties of magnetic nanoparticles. We show that magnetic nanoparticles conjugated to signaling proteins involved in microtubule nucleation can dictate the positioning of microtubule assembly. Under magnetic field, a self-organized pattern of biofunctionalized nanoparticles is formed and leads to the nucleation of a periodical network of MTs in *Xenopus laevis* egg extract. Our method shows how bioactive nanoparticles can generate a biochemically active pattern upon magnetic actuation that triggers the spatial organization of nonequilibrium biological structures.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to generate a spatial biochemically active pattern, we designed an assay allowing for the control of the periodic nucleation of microtubule fibers using self-assembled magnetic nanoparticle arrays. Iron oxide nanoparticles (120 nm) were conjugated to a promoting factor of MT polymerization, RanGTP.⁴⁰ We first examined the conjugation of purified RanGTP to carboxylic-functionalized magnetic nanoparticles (Ran–NPs) through their biofunctionality and their ability to induce MT assembly (Figure 1 and see Experimental Section). Variation of the initial RanGTP:

NP reactant ratio allowed us to tune the amount of protein–nanoparticle conjugation (Figure 1b). We found that almost 70% of the protein initially bound to nanoparticles remained conjugated after several hours (Supporting Information Figure S1).

In reconstituted functional cytoplasm, microtubule nucleation has been previously described as highly sensitive to RanGTP concentration with a nucleation threshold of about 3 μM .^{40,46} During microtubule growth, dynein molecular motors assembled the fibers into very stereotyped radial arrays called asters.^{47,48} We monitored aster assembly as a function of increasing concentration of Ran–NP complexes ([RanGTP] = 1 to 6 μM for Ran:NP between 700 and 1000) and compared the results to data with uncoupled RanGTP. We found that microtubule polymerization follows a sigmoidal response with RanGTP concentration under both conditions (proteins coupled to NPs or uncoupled proteins) as previously described (Figure 1c).⁴⁰ Both RanGTP conjugated to NPs and uncoupled RanGTP promote MT nucleation with a switch-like behavior with concentration threshold of about 4 μM .

We used the biochemical sensitivity of the MTs to remotely control the aster formation using self-assembled magnetic nanoparticle arrays (Figure 2a). In principle, the accumulation of nanoparticles conjugated to RanGTP (Ran–NP) as columns will induce a strong local increase of RanGTP concentration exceeding the concentration threshold and will locally trigger microtubule nucleation (Figure 2a).

The NP concentration and magnetic field strength were tuned to promote robust column formation within cell extracts. *Xenopus* egg extract containing NPs was placed in a PDMS microfluidic channel (45 μm height $\times$ 1 mm large, see Experimental Section). A magnetic field perpendicular to the channel was applied during 10 min at 65 mT, which was strong enough to induce the aggregation of the magnetic nanoparticles into columns. Then the magnetic field was decreased to 25 mT during the experiment course to avoid a temperature increase due to Joule dissipation in the electric coil. The magnetic field

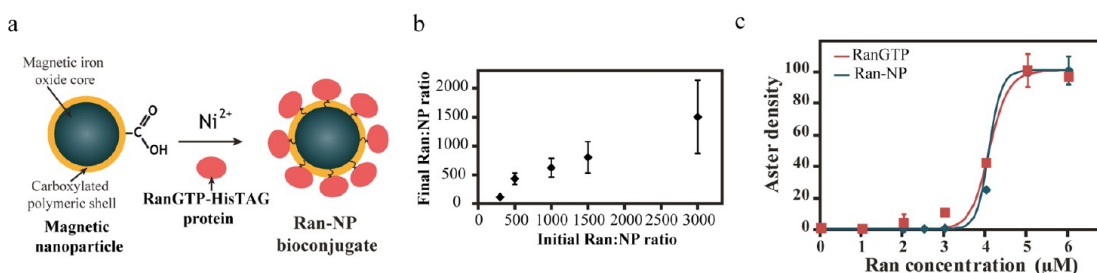


Figure 1. Synthesis and characterization of Ran–NP complex. (a) Ran is conjugated to magnetic nanoparticles by chelation of nickel ions between the carboxylic acid function presented at the nanoparticle surface and the polyhistidine tag of RanGTP recombinant protein. (b) Control of conjugation stoichiometry. By varying the initial ratio of Ran per nanoparticle, the number of Ran conjugated per nanoparticle can vary between 100 to 1500. (c) Microtubule nucleation and aster assembly are ultrasensitive to the concentration of RanGTP (red line) or Ran–NPs (green line). Aster density was determined by fluorescence microscopy and normalized to reach 100% for the plateau at the highest RanGTP concentration.

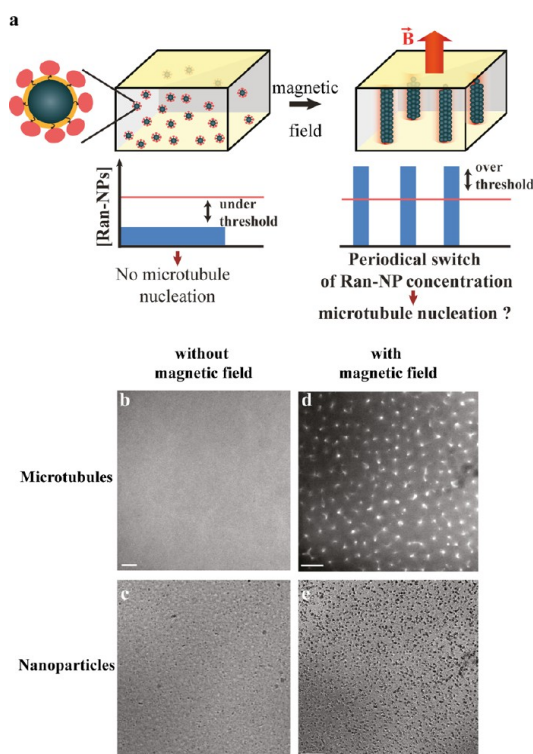


Figure 2. Formation of an array of Ran–NP columns using magnetic field trigger microtubule assembly in a switch-like behavior. (a) Principle of a periodical magnetic switch of Ran–NP concentration. Magnetic nanoparticles conjugated to RanGTP were placed into a microfluidic channel at a concentration below the MT nucleation threshold. The application of an external magnetic field leads to the formation of magnetic columns parallel to the field. At the vicinity of the Ran–NP columns, the concentration of Ran is larger than the nucleation threshold. (b–e) *Xenopus* egg extract containing Ran–NPs ($[Ran] = 1.5 \mu M$, $[NP] = 2 \text{ nM}$), and fluorescent tubulin (100 nM) was placed in a microfluidic channel in absence (b,c) or presence (d,e) of a magnetic field (65 mT). (b,d) Observation by fluorescence microscopy of microtubule assemblies. (c,e) Microscopic observation of nanoparticles under brightfield illumination. Bar = $50 \mu m$.

induced the alignment of the magnetic moment of each nanoparticle along the field and promoted their local attraction through dipole–dipole interactions. This process led to formation of nanoparticle columns regularly spaced (Supporting Information Figure S2). We found that a minimum of 0.5 nM of NPs allow the self-assembly of an array of columns with an interdistance of about $7.5 \mu m$ within 10 s in egg extracts (Supporting Information Figure S3). In addition, the spacing between columns does not vary with the nanoparticle concentration (Supporting Information Figure S3), in agreement with previous observations.⁴⁹ Closer look to the column diameter shows that the structures are made of several chains of nanoparticle aggregates (Supporting Information Figure S4). This effect can be explained by the formation of a protein corona around the nanoparticles within the egg extract that may promote nonspecific aggregation of the nanoparticles (see Supporting Information).⁵⁰

Next, we investigated the effect of Ran–NP column assembly on MT nucleation. Ran–NPs were added at an initial concentration such that the relative concentration of bound RanGTP was under the MT nucleation threshold in egg extract ($[Ran] = 1.5 \mu M$ and $[NPs] = 2 \text{ nM}$). Microtubule fibers were detected by supplementing the extracts with 100 nM of fluorescently labeled tubulin (see Experimental Section).⁵¹ Without magnetic field, e.g., in absence of column formation, and with a Ran–NP concentration of $1.5 \mu M$, no MT nucleation was observed (Figure 2b,c). In contrast, at the same Ran–NP concentration, upon magnetic field, e.g., in presence of an array of Ran–NP columns (Figure 2e), we observed the formation of fluorescent MT bundles organized in radial asters with a distinguished pole (Figure 2d). MTs could be observed 20 min after application of magnetic field as thin fibers that continued to evolve until they formed arrays of MTs organized in asters, after 35 to 40 min (Supporting Information Figure S5). The time scale of MT assembly was similar to experiments performed with uncoupled RanGTP proteins, consistent with the microtubule polymerization rate in extracts, which is $0.5\text{--}2 \mu m \text{ min}^{-1}$. Using confocal microscopy, we found that the asters were localized a few micrometers above the coverslide of the microfluidic channel with a thickness of about $4 \mu m$ (Supporting Information Figure S6). Therefore upon magnetic field application, the localization of RanGTP at the surface of the columns was sufficient to trigger MT polymerization. We estimated that our system allows a local enhancement of the concentration of 40 fold the initial Ran concentration (see Experimental Section). Next, we quantified the structure of the microtubule patterns. From quantification by autocorrelation analysis ($N = 4$), we found that asters were positioned periodically with an interdistance periodicity of $30 \pm 6 \mu m$ (Figure 3a,b) while the nanoparticle interdistance was $7.5 \pm 2.1 \mu m$ (Figure 3e–h). In addition, using fast Fourier transform analysis, we found that the MT networks were organized as a hexagonal phase (Figure 3c,d). We then investigated the conditions required to obtain a periodic network by varying the stoichiometry of Ran per nanoparticle and the initial concentrations of RanGTP and NP (Figure 4). We found that a minimum of 550 Ran per NP was necessary to induce MT nucleation and that a RanGTP concentration ranging from 1 to $3.5 \mu M$ generated a periodic MT network. Above $3.5 \mu M$, a disordered network of MTs was observed (Figure 4). Altogether these observations demonstrate that the formation of Ran–NP columns upon magnetic stimulation leads to a robust biochemical switch triggering the assembly of a regular array of microtubule fibers.

Microtubule assembly using freely diffusing (unbound) RanGTP was monitored to investigate the role of the magnetic nanoparticles in generating periodic structures. In the presence of free RanGTP ($1.5 \mu M$, in egg

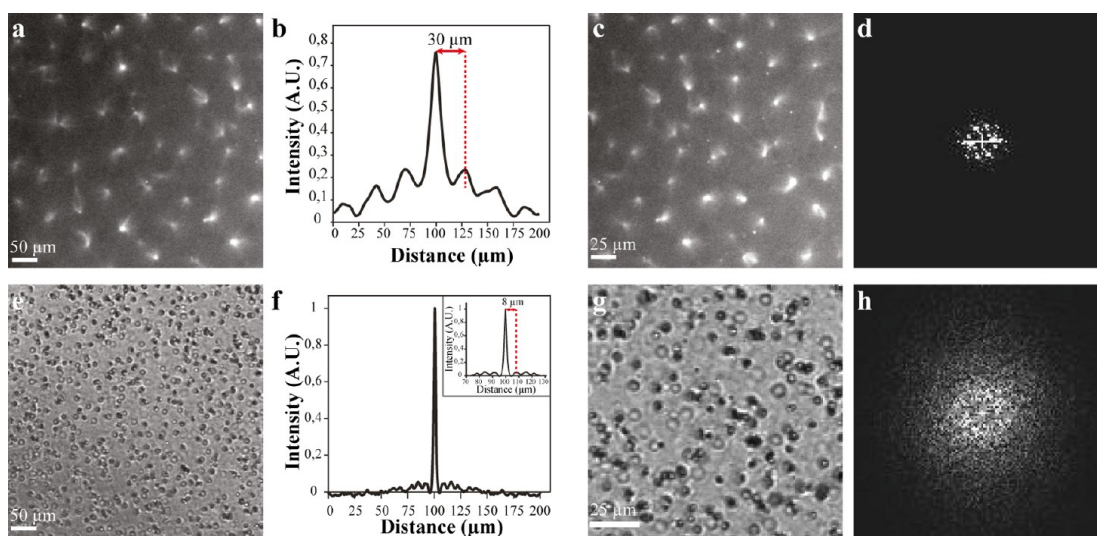


Figure 3. Periodical switch of RanGTP concentration generates a periodical network of microtubules. *Xenopus* egg extract containing Ran–NPs ([Ran] = 1.5 μ M, [NP] = 2 nM) and fluorescent tubulin (100 nM) was placed in a microfluidic channel in presence of magnetic field. (a,c) Observation by fluorescence microscopy of microtubule assemblies. (e,g) Microscopic observation of nanoparticle arrays under brightfield illumination. (b,f) Autocorrelation profile for microtubules (b) and Ran–NP patterns (f). They give an average distance between microtubule asters of 30 μ m (b) or between Ran–NP columns of 8 μ m (f). Fourier transform analysis of microtubule structures (d) and nanoparticle column arrays (h) obtained under magnetic field.

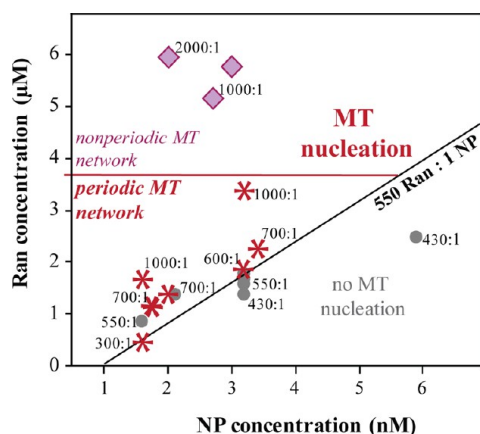


Figure 4. Effect of NP and Ran concentration on microtubule patterns under magnetic field. This phase diagram shows that a minimum of 550:1 Ran per NP is necessary to induce microtubule nucleation. RanGTP initial concentration should range from 1 to 3.5 μ M to observe a periodic network. (Number of independent experiments = 20).

extract and within the microfluidic channel), no microtubule nucleation was observed regardless of magnetic field application (Figure 5a,b). Above the nucleation threshold (RanGTP = 6 μ M), we observed the assembly of asters (Figure 5c,d). Interestingly in this later case, MTs were first organized into a connected network of fibers that start to collectively collapse after 10 min all over the channel and over hundreds of micrometers until reaching a steady state with structures of 200 μ m width.

Then, to clarify the role of the spatial distribution of RanGTP concentration in determining the periodical organization of MT asters (Figure 2), we next investigated the influence of the magnetic column matrix by comparing MT nucleation in presence of RanGTP

and unconjugated nanoparticles or in presence of Ran–NPs. In the presence of RanGTP and unconjugated nanoparticles, we observed an absence of MT nucleation at 1.5 μ M as expected (Figure 5e,f), whereas at 6 μ M, microtubule assemblies formed isolated and contracted bundle-like structures that did not collapse as much as in experiments performed in the absence of nanoparticles (Figure 5g,h). The morphology of the MT networks in those conditions is independent of the magnetic field strength. When the Ran–NP complexes (1.5 μ M) were added in the solution but without a magnetic field, no MT nucleation was observed (Figure 5i). This is in contrast with experiments performed in presence of magnetic columns (Figure 5j). In the presence of Ran–NPs at a concentration of 6 μ M, we observed that MT assemblies were similar (Figure 5k,l) to those found in the conditions of unbound RanGTP (Figure 5g,h). In addition these organizations did not present any periodical organization as shown by Fourier transform analysis (Supporting Information Figure S7).

Therefore, the spatial organization of microtubule patterns depends drastically on the presence of nanoparticles. More precisely, the large-scale contraction is not observed in presence of NPs for every cases: NPs conjugated or not to Ran and NPs forming columns or not.

To investigate the mechanism driving the aster fusion process, we next examined the role of dynein motors. In presence of an inhibitor of dynein ATPase activity, Na-orthovanadate, MTs formed isolated fibers, randomly orientated and homogeneously distributed over the entire length of the microchannels (Supporting Information Figure S8). This result shows

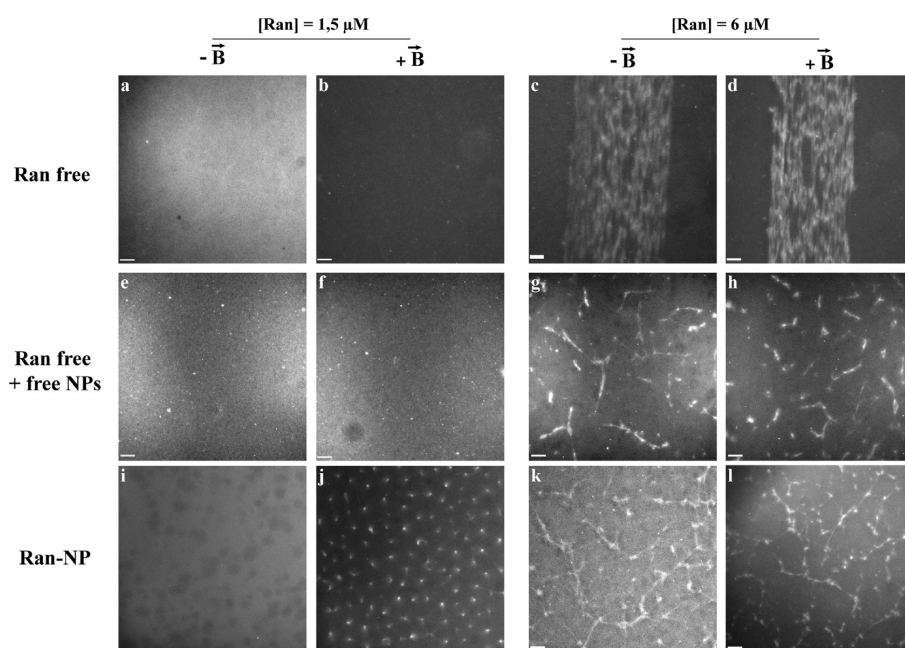


Figure 5. Comparison of microtubule network organization under different conditions: RanGTP concentration, presence of magnetic field, conjugated or unconjugated nanoparticles. *Xenopus* cell extract supplemented with 100 nM fluorescent tubulin and containing RanGTP, RanGTP and free nanoparticle, or Ran–NP at the indicated concentration (1.5 or 6 μ M) was placed in microfluidic channel. Microtubule network formation was observed under application of magnetic field (+B) or not (–B). Bars: 25 μ m.

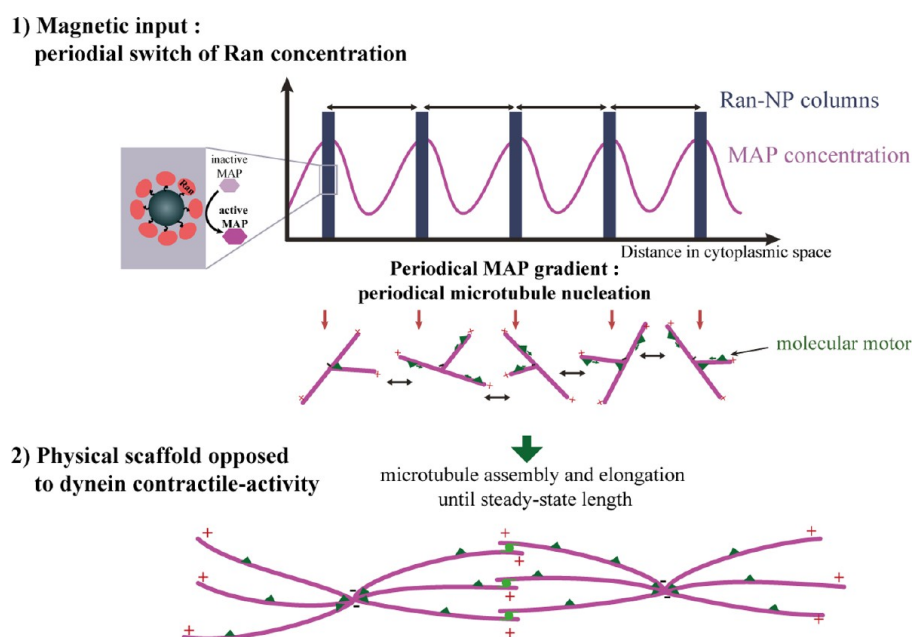


Figure 6. Periodical network of microtubules is generated both by periodical concentration of Ran proteins and by molecular motors. Schematic of the generation of aster networks induced by Ran–NP columns. First, under magnetic field, Ran–NP self-organized into periodical columns. This periodical accumulation of Ran activates the microtubule nucleators (MAPs) at the vicinity of the columns, leading to the nucleation of microtubule in a restricted space. Second, the interplay between molecular motors and growing microtubules leads to the formation of an aster network, and presence of magnetic nanoparticle scaffold limits the contractility of microtubules, leading to the organization of the final periodical aster network.

the essential role of dyneins in generating large-scale reorganization of the network through a contraction–fusion process.

The presence of nanoparticles in the extract resulted in a decreased spatial extension of the MT network

contraction–fusion process. However, our results also showed that the patterning of unconjugated nanoparticles was not sufficient to achieve a periodical positioning of MT asters. Taken together, a combination of a physical matrix of nanoparticle columns

and a periodical concentration in space of Ran protein is key to trigger microtubule periodical organization.

By using magnetic nanoparticles conjugated to RanGTP, we showed that we could generate a robust biochemical switch triggering MT nucleation that leads to a periodical organization of aster network. Several elements can explain the steady state aster network formation. The positioning of Ran–NP columns induces the spatially restricted activation of MT nucleators (microtubule associated proteins, MAPs) that trigger the nucleation of the fibers (Figure 6), in agreement with studies showing that a point source of RanGTP coupled to NPs generates localized MT polymerization through reaction diffusion processes.⁴⁰ Dynein motor activity will favor the fusion and coalescence of nascent MT-based structures.⁵² Indeed, during the MT assembly process, the fibers are first organized in bundles and then in asters by dynein motors, which cross-link, sort, and promote fiber sliding and translation (Supporting Information Figure S5). The MT steady state length is about 15 μm in meiotic *Xenopus* egg extracts and determines the 30 μm -aster diameter. Finally, the array of magnetic columns limits the contractility of MT aster network by providing a physical scaffold opposed to dynein motor activity. Therefore, two coupled mechanisms may be involved in generating the periodical organization of MT networks. First, the periodical distribution of Ran–NPs induces a localized nucleation of microtubules. Second, growing MT fibers at restricted sites are organized by molecular motors until reaching a periodic aster network with a typical length scale set by the microtubule dimension (Figure 6).

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents. ATP, DDT, creatine phosphate, creatine phosphokinase, mineral oil (M5904), Na-orthovanadate were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Tubulins, labeled with X-Rhodamin or with FITC, were ordered from Cytoskeleton, Inc. (Denver, CO). All the experiments were done in metaphase extracts. RTV 615 PDMS was from Momentive (Columbus, OH) and SU8-2050 from Microchem (Newton, MA). Cytostatic-factor-arrested (CSF) *Xenopus laevis* egg extracts, which correspond to “active” cytoplasm of oocytes arrested in metaphase II of meiosis, were prepared as previously described.⁶⁰

Expression and Purification of Recombinant Proteins. Expression of plasmid and purification of recombinant proteins were realized as previously described.⁶¹ The plasmids for *Escherichia coli* expression of RanQ69L-GTP (pQE32-Ran, 6His Tag) were kindly provided by Iain Mattaj (EMBL).

Microtubule Nucleation in *Xenopus laevis* Egg Extracts. Microtubule structures were assembled in metaphase *Xenopus* egg extracts containing X-Rhodamin-labeled tubulin (200 nM final), an ATP regenerating system (1 mM ATP, 10 mM creatine phosphate, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of creatine phosphokinase, final concentrations) and DTT (2 mM final). This mixture was then incubated in the presence of protein and/or magnetic particles at the final concentration indicated in the manuscript. All the experiments were performed in a temperature-controlled room at 18 °C.

CONCLUSIONS

Our results demonstrate that the patterning of signaling proteins allows for the spatial control of MT nucleation and organization. The interplay between the spatial patterning of microtubule nucleators and the self-organizing properties of the fibers under motor activity leads to the formation of a periodic hexagonal network of asters. Our system provides a bottom-up approach of biochemical patterning using magnetic control of signaling protein spatial organization. Further strategies based on the process of nanoparticle assembly or on the mechanism of cytoskeleton assembly may increase the spatial control of cytoskeleton pattern formation. For instance, tuning physical parameters such as the confinement height of the microfluidic channel, the ability of localizing the magnetic field by using an array of nickel dots, or changing the NP interactions through their size and composition can offer relevant future opportunities. On the other hand, biological systems offer a large protein toolbox that could be used to enlarge the possibility of molecular controls at works. The aster diameter could be tuned by adding either specific MAPs that change the fiber lengths in extracts, such as XMAP215,⁵³ or cyclin dependent kinase proteins.⁵⁴ For instance, similar studies could be extended to other biopolymers involved in cell architecture. As an example, the spatial control of actin nucleators may generate additional cytoskeleton organizations with various topologies such as dendritic networks or parallel bundles.^{55,56} In addition, our method could be used as a framework for achieving molecular transport⁵⁷ and generating new bioinspired materials.^{30,58,59}

Magnetic Nanoparticles. Conjugation of Protein to Magnetic Nanoparticles. Superparamagnetic nanoparticles (120 nm diameter, Carboxyl Ademabeads 0211, Ademtech, Pessac) were made of a Fe_2O_3 magnetic core encapsulated by a highly cross-linked hydrophilic polymer shell. Their surface displays a carboxylic acid functionality. The initial concentration in nanoparticles was equal to 78 nM. For conjugation to RanQ69L-GTP, 90×10^{-15} moles of magnetic nanoparticles were placed in XB1 buffer (Hepes 10 mM, MgCl_2 1 mM KCl 100 mM Sucrose 50 mM, pH 7.7) by three successive rinses under magnetic field. Then, NiCl_2 (2 mM final) and proteins were added at a concentration corresponding to an initial molar ratio of 1500 protein/NP. After 30 min reaction at 4 °C, unconjugated proteins were purified by 3 rinses in XB1 under magnetic field. After purification, we set the concentration of nanoparticle around 60 nM. Conjugation stoichiometry and stability were determined by a semiquantitative assay using SDS-PAGE electrophoresis.⁴⁰

Pegylation of Nanoparticles. For control experiments, we conjugated a hydrophilic polymer (PLL-PEG, Susos) to the nanoparticles. PLL (20 kDa) grafted with PEG (2 kDa) having Lys units/PEG chains = 3.5. PLL-PEG was added to carboxylated nanoparticles at an initial ratio of 100 PEG/COOH in XB1 buffer overnight at 4 °C. After conjugation, the excess of PLL-PEG was removed by 2 successive rinses on permanent magnet with XB1 (wash volume = conjugation volume).

Microfluidic Devices. Master templates were first fabricated on silicon wafers using the SU8-2050 negative photoresist and

PDMS stamps were obtained by conventional replica molding. After unimolding, the elastomeric material was washed with ethanol and dried with a nitrogen flux. Microchannels were then sealed with glass cover slides that have been similarly processed. Tight bonding was obtained by baking at 60 °C overnight. Fluidic features were 47 μm high, 1 mm wide, and 3 mm long.

Formation of Nanoparticle Columns under Magnetic Field. Self-organization of Ran–NPs under magnetic field was performed as follows: cell extract, X-rhodamine tubulin, ATP regenerating system, DTT, and Ran–NPs ([Ran] = 1.5 μM and [NPs] = 1.8 nM final) were mixed at 4 °C before injection in microfluidic channel. Channels were sealed with adhesive tape and immediately placed on microscope. Magnetic field was applied using an electromagnet. A magnetic field of 65 mT was first applied during 10 min, and then external field was decreased until 25 mT throughout the remaining time of the experiment. We estimated that each column is composed of an average of 1600 nanoparticles (based on the number of column/volume unit and on the total number of nanoparticles) and occupied a volume of 43 μm^3 . Starting from a homogeneous Ran concentration of 1.5 μM and a conjugation stoichiometry of 1000 Ran per nanoparticles, we calculate the number of Ran molecules per column that lead to a local Ran concentration of 60 μM , meaning a 40 fold increase in Ran local concentration around magnetic column.

Imaging and Data Analysis. Fluorescence imaging of microtubules asters was performed using an IX81 (Olympus) microscope and $\times 10$ (PlanN, NA 0.25), $\times 20$ (UPlanFLN, NA 0.5) and $\times 40$ (UPlanFLN, NA 1.30) objectives, equipped with an EM-CCD (C9102, Hamamatsu, Corporation, Sewickley, PA). Microscope settings and functions were controlled using Simple PCI software (Hamamatsu). Image analysis was performed using Image J Software (Scion Image) and Simple PCI software. Brightfield illumination was used to monitor nanoparticle accumulation.

Data Analysis. In order to precisely characterize microtubules networks orientation and spacing, Fourier transform (FT) computations were achieved relying on the Image J software (Scion). However, when a regular lattice could not be obtained, we analyzed images by computing autocorrelation functions with the DigitalMicrograph software (Gatan). More exactly, the latter tool realizes a FT of the considered image and multiplies it by its complex conjugate before performing the normalized inverse FT. Autocorrelation intensity profiles were finally achieved by angular integration.

Conflict of Interest: The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgment. The authors thank I. Mattaj and B. Koch for the RanQ69L expression plasmid. Thanks also go to V. Marchi, R. Le Borgne, and the members of the Biophysical Chemistry Center of ENS for fruitful discussions, X. Zhao for technical assistance with PDMS processing, A. Cattoni for lending us the magnetic coil, and Joe Dragavon of the Plate-Forme d'Imagerie Dynamique, Imagopole, Institut Pasteur, for critical reading of the manuscript. This work was supported by the CNRS (MI Emergence, Peps-PSL), the Association pour la Recherche sur le Cancer (SFI20101201426), the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC, 2009), Ville de Paris "Emergence(s)" (to Z.G.), and the Agence Nationale de la Recherche (ANR, ANR-08-PNANO-050 to C.G. and Z.G.). E. Mazari was a recipient of Ph. D. studentships from both the "Fondation pour la Recherche Médicale" and the "Triangle de la Physique".

Supporting Information Available: Supplementary figures and discussion. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES AND NOTES

- Hess, H.; Clemmens, J.; Brunner, C.; Doot, R.; Luna, S.; Ernst, K. H.; Vogel, V. Molecular Self-Assembly of "Nanowires" and "Nanospoils" Using Active Transport. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 629–633.
- Goel, A.; Vogel, V. Harnessing Biological Motors to Engineer Systems for Nanoscale Transport and Assembly. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 465–475.
- Hess, H.; Bachand, G. D.; Vogel, V. Powering Nanodevices with Biomolecular Motors. *Chem.—Eur. J.* **2004**, *10*, 2110–2116.
- Choi, D. S.; Byun, K. E.; Hong, S. Dual Transport Systems Based on Hybrid Nanostructures of Microtubules and Actin Filaments. *Small* **2011**, *7*, 1755–1760.
- Mrksich, M.; Whitesides, G. M. Patterning Self-Assembled Monolayers Using Microcontact Printing—A New Technology for Biosensors. *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 228–235.
- Whitesides, G. M.; Ostuni, E.; Takayama, S.; Jiang, X. Y.; Ingber, D. E. Soft Lithography in Biology and Biochemistry. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2001**, *3*, 335–373.
- Blattler, T.; Huwiler, C.; Ochsner, M.; Stadler, B.; Solak, H.; Voros, J.; Grandin, H. M. Nanopatterns with Biological Functions. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 2237–2264.
- Blattler, T. M.; Binkert, A.; Zimmermann, M.; Textor, M.; Voros, J.; Reimhult, E. From Particle Self-Assembly to Functionalized Sub-Micron Protein Patterns. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 1–10.
- Rakickas, T.; Gavutis, M.; Reichel, A.; Piehler, J.; Liedberg, B.; Valiokas, R. Protein-Protein Interactions in Reversibly Assembled Nanopatterns. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 3369–3375.
- Gallant, N. D.; Capadona, J. R.; Frazier, A. B.; Collard, D. M.; Garcia, A. J. Micropatterned Surfaces to Engineer Focal Adhesions for Analysis of Cell Adhesion Strengthening. *Langmuir* **2002**, *18*, 5579–5584.
- Chen, T. H.; Guo, C. Y.; Zhao, X.; Yao, Y. C.; Bostrom, K. I.; Wong, M. N.; Tintut, Y.; Demer, L. L.; Ho, C. M.; Garfinkel, A. Patterns of Periodic Holes Created by Increased Cell Motility. *Interface Focus* **2012**, *2*, 457–464.
- Lehnert, D.; Wehrle-Haller, B.; David, C.; Weiland, U.; Ballestrem, C.; Imhof, B. A.; Bastmeyer, M. Cell Behaviour on Micropatterned Substrata: Limits of Extracellular Matrix Geometry for Spreading and Adhesion. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 41–52.
- Fereol, S.; Fodil, P.; Barnat, M.; Georget, V.; Milbreta, U.; Nothias, F. Micropatterned ECM Substrates Reveal Complementary Contribution of Low and High Affinity Ligands to Neurite Outgrowth. *Cytoskeleton* **2011**, *68*, 373–388.
- Lee, D. H. Fabrication of Silica Mesh Patterns via Self-Assembly of Block Copolymers. *Macromol. Res.* **2012**, *20*, 990–995.
- Loverde, S. M.; Pantano, D. A.; Christian, D. A.; Mahmud, A.; Klein, M. L.; Discher, D. E. Curvature, Rigidity, and Pattern Formation in Functional Polymer Micelles and Vesicles—From Dynamic Visualization to Molecular Simulation. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2011**, *15*, 277–284.
- Hamon, C.; Postic, M.; Mazari, E.; Bizien, T.; Dupuis, C.; Even-Hernandez, P.; Jimenez, A.; Courbin, L.; Gosse, C.; Artzner, F.; et al. Three-Dimensional Self-Assembly of Gold Nanorods with Controlled Macroscopic Shape and Local Smectic B Order. *ACS Nano* **2012**, *6*, 4137–4146.
- Seeman, N. C. DNA in a Material World. *Nature* **2003**, *421*, 427–431.
- Shimizu, T.; Masuda, M.; Minamikawa, H. Supramolecular Nanotube Architectures Based on Amphiphilic Molecules. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1401–1443.
- Hess, H. Self-Assembly Driven by Molecular Motors. *Soft Matter* **2006**, *2*, 669–677.
- Reymann, A. C.; Martiel, J. L.; Cambier, T.; Blanchoin, L.; Boujemaa-Paterski, R.; Thery, M. Nucleation Geometry Governs Ordered Actin Networks Structures. *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 827–832.
- Sanchez, T.; Chen, D. T. N.; DeCamp, S. J.; Heymann, M.; Dogic, Z. Spontaneous Motion in Hierarchically Assembled Active Matter. *Nature* **2012**, *491*, 431–434.
- Wong, G. C. L.; Tang, J. X.; Lin, A.; Li, Y. L.; Janmey, P. A.; Safinya, C. R. Hierarchical Self-Assembly of F-Actin and Cationic Lipid Complexes: Stacked Three-Layer Tubule Networks. *Science* **2000**, *288*, 2035–2039.
- Boal, A. K.; Headley, T. J.; Tissot, R. G.; Bunker, B. C. Microtubule-Templated Biomimetic Mineralization of Lepidocrocite. *Adv. Funct. Mater.* **2004**, *14*, 19–24.

24. Leduc, P. R.; Robinson, D. N. Using Lessons from Cellular and Molecular Structures for Future Materials. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 3761–3770.
25. Henry, E.; Dif, A.; Schmutz, M.; Legoff, L.; Amblard, F.; Marchi-Artzner, V.; Artzner, F. Crystallization of Fluorescent Quantum Dots within a Three-Dimensional Bio-Organic Template of Actin Filaments and Lipid Membranes. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 5443–5448.
26. Spoerke, E. D.; Boal, A. K.; Bachand, G. D.; Bunker, B. C. Templated Nanocrystal Assembly on Biodynamic Artificial Microtubule Asters. *ACS Nano* **2013**, *7*, 2012–2019.
27. Nedelec, F. J.; Surrey, T.; Maggs, A. C.; Leibler, S. Self-Organization of Microtubules and Motors. *Nature* **1997**, *389*, 305–308.
28. Surrey, T.; Nedelec, F.; Leibler, S.; Karsenti, E. Physical Properties Determining Self-Organization of Motors and Microtubules. *Science* **2001**, *292*, 1167–1171.
29. Bottier, C.; Fattaccioli, J.; Tarhan, M. C.; Yokokawa, R.; Morin, F. O.; Kim, B.; Collard, D.; Fujita, H. Active Transport of Oil Droplets along Oriented Microtubules by Kinesin Molecular Motors. *Lab Chip* **2009**, *9*, 1694–1700.
30. Aoyama, S.; Shimoike, M.; Hiratsuka, Y. Self-Organized Optical Device Driven by Motor Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 16408–16413.
31. Zerrouki, D.; Baudry, J.; Pine, D.; Chaikin, P.; Bibette, J. Chiral Colloidal Clusters. *Nature* **2008**, *455*, 380–382.
32. Snezhko, A. Non-Equilibrium Magnetic Colloidal Dispersions at Liquid-Air Interfaces: Dynamic Patterns, Magnetic Order and Self-Assembled Swimmers. *J. Phys.: Condens. Matter* **2011**, *23*, 1–21.
33. Erb, R. M.; Son, H. S.; Samanta, B.; Rotello, V. M.; Yellen, B. B. Magnetic Assembly of Colloidal Superstructures with Multipole Symmetry. *Nature* **2009**, *457*, 999–1002.
34. Gaetz, J.; Gueroui, Z.; Libchaber, A.; Kapoor, T. M. Examining How The Spatial Organization of Chromatin Signals Influences Metaphase Spindle Assembly. *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 924–932.
35. Brangbour, C.; du Roure, O.; Helfer, E.; Demoulin, D.; Mazurier, A.; Fermigier, M.; Carlier, M. F.; Bibette, J.; Baudry, J. Force-Velocity Measurements of a Few Growing Actin Filaments. *PLoS Biol.* **2011**, *9*, 1–7.
36. Mannix, R. J.; Kumar, S.; Cassiola, F.; Montoya-Zavala, M.; Feinstein, E.; Prentiss, M.; Ingber, D. E. Nanomagnetic Actuation of Receptor-Mediated Signal Transduction. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 36–40.
37. Lee, J.-H.; Kim, E. S.; Cho, M. H.; Son, M.; Yeon, S.-I.; Shin, J.-S.; Cheon, J. Artificial Control of Cell Signaling and Growth by Magnetic Nanoparticles. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 5698–5702.
38. Steketee, M. B.; Moysidis, S. N.; Jin, X.-L.; Weinstein, J. E.; Pita-Thomas, W.; Raju, H. B.; Iqbal, S.; Goldberg, J. L. Nanoparticle-Mediated Signaling Endosome Localization Regulates Growth Cone Motility and Neurite Growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 19042–19047.
39. Kumar, S. Microtubule Assembly: Switched on with Magnets. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 162–163.
40. Hoffmann, C.; Mazari, E.; Lallet, S.; Le Borgne, R.; Marchi, V.; Gosse, C.; Gueroui, Z. Spatiotemporal Control of Microtubule Nucleation and Assembly Using Magnetic Nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 199–205.
41. Etoc, F.; Lisse, D.; Bellaiche, Y.; Piehler, J.; Coppey, M.; Dahan, M. Subcellular Control of Rac-GTPase Signalling by Magnetogenetic Manipulation Inside Living Cells. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 193–198.
42. Doyle, P. S.; Bibette, J.; Bancaud, A.; Viovy, J. L. Self-Assembled Magnetic Matrices for DNA Separation Chips. *Science* **2002**, *295*, 2237–2237.
43. Minc, N.; Futterer, C.; Dorfman, K. D.; Bancaud, A.; Gosse, C.; Goubault, C.; Viovy, J. L. Quantitative Microfluidic Separation of DNA in Self-Assembled Magnetic Matrixes. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3770–3776.
44. Slovakova, M.; Minc, N.; Bilkova, Z.; Smadja, C.; Faigle, W.; Futterer, C.; Taverna, M.; Viovy, J. L. Use of Self Assembled Magnetic Beads for On-Chip Protein Digestion. *Lab Chip* **2005**, *5*, 935–942.
45. Saliba, A. E.; Saias, L.; Psychari, E.; Minc, N.; Simon, D.; Bidard, F. C.; Mathiot, C.; Pierga, J. Y.; Fraissier, V.; Salamero, J.; et al. Microfluidic Sorting and Multimodal Typing of Cancer Cells in Self-Assembled Magnetic Arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 14524–14529.
46. Caudron, M.; Bunt, G.; Bastiaens, P.; Karsenti, E. Spatial Coordination of Spindle Assembly by Chromosome-Mediated Signaling Gradients. *Science* **2005**, *309*, 1373–1376.
47. Verde, F.; Berrez, J. M.; Antony, C.; Karsenti, E. Taxol-Induced Microtubule Asters in Mitotic Extracts of *Xenopus* Eggs—Requirement for Phosphorylated Factors and Cytoplasmic Dynein. *J. Cell Biol.* **1991**, *112*, 1177–1187.
48. Pinot, M.; Chesnel, F.; Kubiak, J. Z.; Arnal, I.; Nedelec, F. J.; Gueroui, Z. Effects of Confinement on the Self-Organization of Microtubules and Motors. *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 954–960.
49. Liu, J.; Lawrence, E. M.; Wu, A.; Ivey, M. L.; Flores, G. A.; Javier, K.; Bibette, J.; Richard, J. Field-Induced Structures in Ferrofluid Emulsions. *Phys. Rev. Lett.* **1995**, *74*, 2828–2831.
50. Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Berggard, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S. Understanding the Nanoparticle-Protein Corona Using Methods to Quantify Exchange Rates and Affinities of Proteins for Nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 2050–2055.
51. Jimenez, A. M.; Roché, M.; Pinot, M.; Panizza, P.; Courbin, L.; Gueroui, Z. Towards High Throughput Production of Artificial Egg Oocytes Using Microfluidics. *Lab Chip* **2011**, *11*, 429–434.
52. Verde, F.; Berrez, J. M.; Antony, C.; Karsenti, E. Taxol-Induced Microtubule Asters in Mitotic Extracts of *Xenopus* Eggs: Requirement for Phosphorylated Factors and Cytoplasmic Dynein. *J. Cell Biol.* **1991**, *112*, 1177–1187.
53. Reber, S. B.; Baumgart, J.; Widlund, P. O.; Pozniakovsky, A.; Howard, J.; Hyman, A. A.; Julicher, F. XMAP215 Activity Sets Spindle Length by Controlling the Total Mass of Spindle Microtubules. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 1116–1122.
54. Verde, F.; Dogterom, M.; Stelzer, E.; Karsenti, E.; Leibler, S. Control of Microtubule Dynamics and Length by Cyclin A- and Cyclin B-Dependent Kinases in *Xenopus* Egg Extracts. *J. Cell Biol.* **1992**, *118*, 1097–1108.
55. Pollard, T. D.; Cooper, J. A. Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* **2009**, *326*, 1208–1212.
56. Pinot, M.; Steiner, V.; Dehapiot, B.; Yoo, B. K.; Chesnel, F.; Blanchoin, L.; Kervrann, C.; Gueroui, Z. Confinement Induces Actin Flow in a Meiotic Cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 11705–11710.
57. Reuther, C.; Hajdo, L.; Tucker, R.; Kasprzak, A. A.; Diez, S. Biotemplated Nanopatterning of Planar Surfaces with Molecular Motors. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 2177–2183.
58. Needleman, D. J.; Ojeda-Lopez, M. A.; Raviv, U.; Miller, H. P.; Wilson, L.; Safinya, C. R. Higher-Order Assembly of Microtubules by Counterions: From Hexagonal Bundles to Living Necklaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 16099–16103.
59. Huebsch, N.; Mooney, D. J. Inspiration and Application in the Evolution of Biomaterials. *Nature* **2009**, *462*, 426–432.
60. Desai, A.; Murray, A.; Mitchison, T. J.; Walczak, C. E. The Use of *Xenopus* Egg Extracts to Study Mitotic Spindle Assembly and Function *In Vitro*. *Methods Cell Biol.* **1999**, *61*, 385–412.
61. Kutay, U.; Izaurralde, E.; Bischoff, F. R.; Mattaj, J. W.; Gorlich, D. Dominant-Negative Mutants of Importin- β Block Multiple Pathways of Import and Export Through the Nuclear Pore Complex. *EMBO J.* **1997**, *16*, 1153–1163.

Supporting Information

Magnetic Control of Protein Spatial Patterning to Direct Microtubule Self-Assembly

*Céline Hoffmann¹, Elsa Mazari², Charlie Gosse², Louise Bonnemay¹, Sarah Hostachy¹,
Jérémy Gautier¹ and Zoher Gueroui^{1,*}*

¹ Department of Chemistry, Ecole Normale Supérieure, UMR 8640 CNRS-ENS-UPMC Pasteur,
24, rue Lhomond, 75005 Paris, France.

² Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, LPN-CNRS, route de Nozay, 91460
Marcoussis, France.

Supplemental discussion: Column formation upon magnetic field application

The applied magnetic field H has first been chosen in order to be strong enough to induce the aggregation of the magnetic nanoparticles. As explained for instance in Liu *et al.* ¹, the λ parameter comparing the magnetic energy of interaction between two colloids to the thermal energy has to be larger than 1. One has

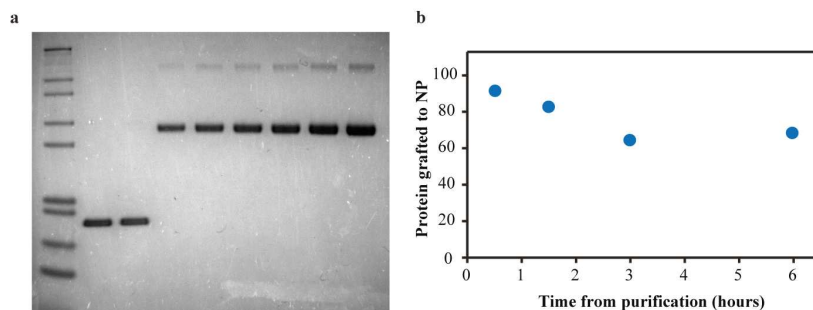
$$\lambda = \frac{\pi\mu_0 a^3 \chi^2 H^2}{9k_B T}$$

where μ_0 is the magnetic permeability in vacuum, a the particle radius, χ its susceptibility, k_B the Boltzmann constant, and T the temperature. Consequently, larger beads will tolerate weaker fields whereas smaller beads will necessitate larger fields. In their paper, Liu *et al.* applied $H = 38$ mT on beads of radius $a = 250$ nm. They reported to have $\lambda = 166$. In agreement with the above formula, with $a = 285$ nm, Minc *et al.* ² could use $H = 10$ mT which yielded $\lambda = 17$. Conversely, in the present work we have $a = 60$ nm and with $H = 65$ mT we are at $\lambda = 9$. Also the latter value is small, it allowed the formation of columns within 30 s, which is a typical timescale reported for such self-assembly.

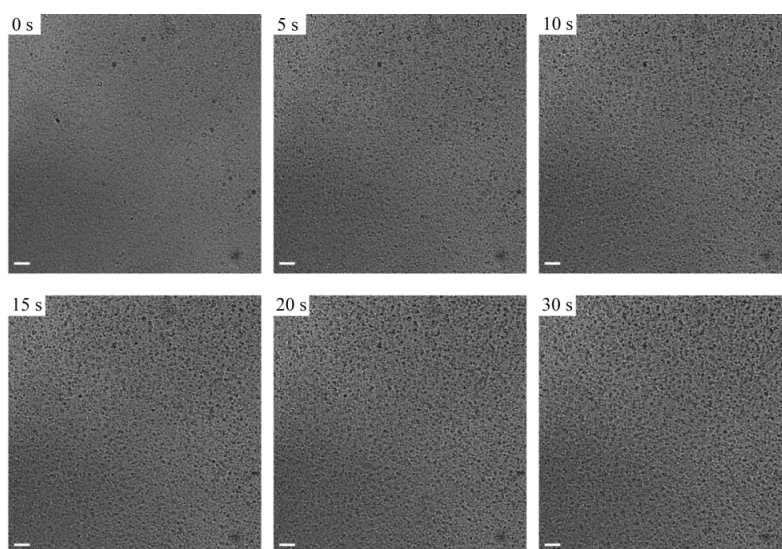
We did not apply a larger field because of Joule dissipation in the electric coil, which could subsequently induce some ambient temperature increase. Here is also the reason why after 10 min, when heat starts to radiate towards the sample, the current is decreased. The field, which is now at 25 mT, is nevertheless large enough to maintain the columns well organized and vertical. Indeed, in the present case aggregation between the bioconjugated nanoparticles has revealed irreversible.

Closer look to the column diameter shows that the structures are made of several chains of nanoparticle aggregates (Supplementary Figure S4). Nanoparticles dispersed in biofluids such as *Xenopus laevis* egg extract can build a protein corona around them ³. Such protein corona can therefore explain the irreversible aggregation of the nanoparticles observed.

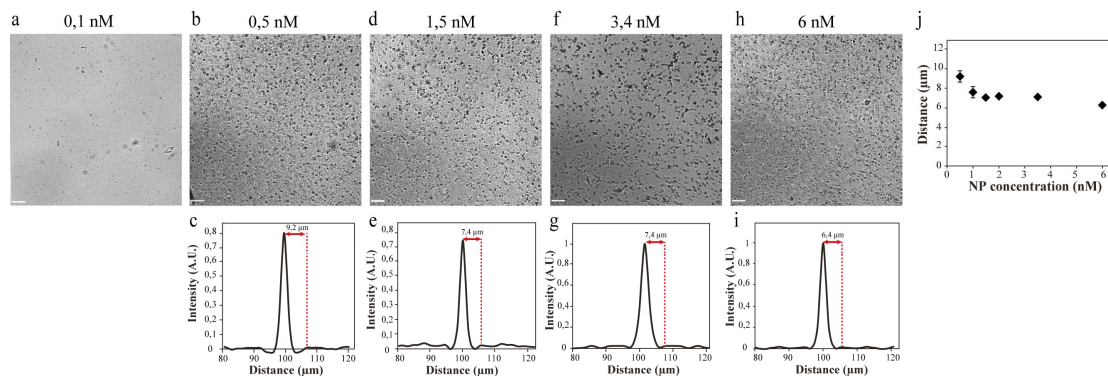
Supplementary Figures



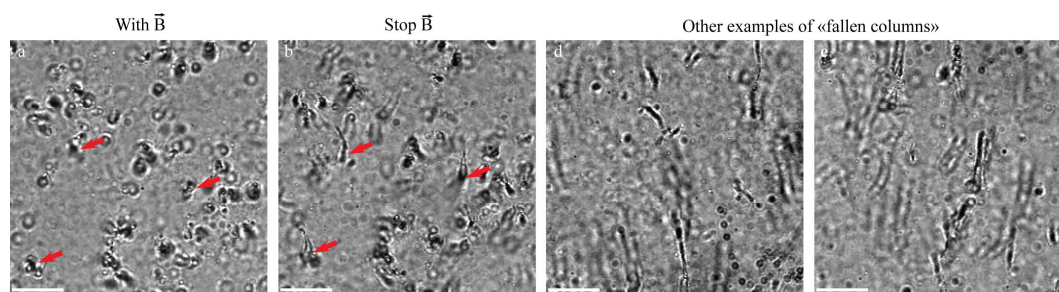
Supplementary Figure S1. Characterisation of Ran-NP complexes. a) Example of SDS-PAGE electrophoresis of Ran-NP complexes for determination of Ran-NP stoichiometry. Lane 1 : molecular weight protein standard , lane 2-3: BSA concentration range b) Ran-NP stability. Percentage of Ran grafted to nanoparticles as a function of time.



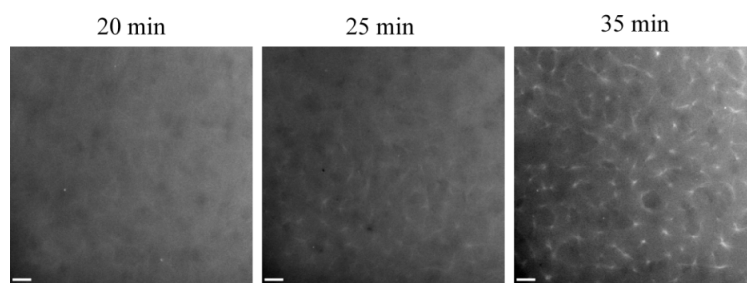
Supplementary Figure S2. Time course of the formation of Ran-NP magnetic columns in microfluidic channel. Microscopic observation under brightfield illumination. Bars: 20 μ m.



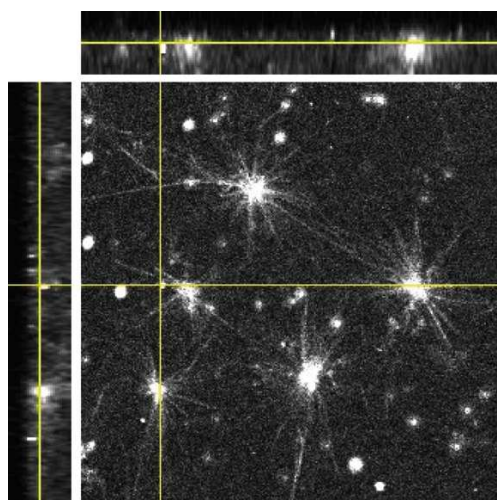
Supplementary Figure S3. Influence of nanoparticle concentration on nanoparticle column formation and column interdistance. The bead concentration varies between 0.5 and 6 nM, which corresponds to fraction volumes f between $2.5 \cdot 10^{-4}$ and $3 \cdot 10^{-3}$. Bars = 25 μm.



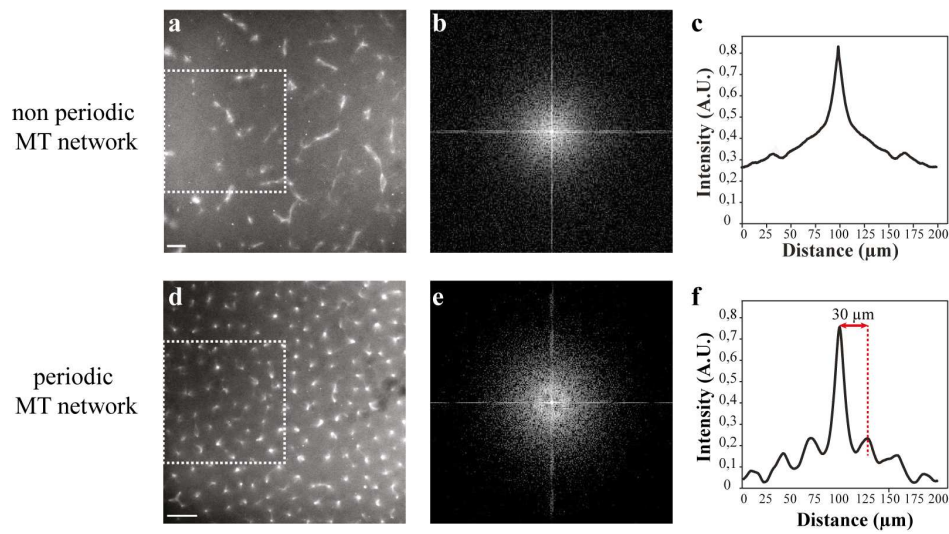
Supplementary Figure S4. Characterization of the height of Ran-NP columns. Ran-NP column microscopic observations (brightfield) under magnetic field (a) and after stopping the magnetic field (b) in cell extract. Red arrows point some columns that remain aligned after the removal of magnetic field. d,e) Other examples of columns after the magnetic field was stopped. Bar: 20 μm.



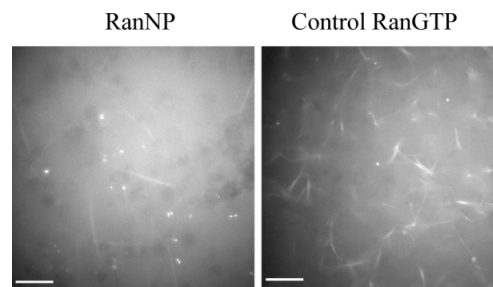
Supplementary Figure S5. Time dependent evolution of microtubule nucleation induced by Ran-NP columns. Scale bar: 25 μm .



Supplementary Figure S6. Confocal image of microtubules generated by RanNP columns. Z-stack of images allowed the imaging of microtubule repartition in the third spatial dimension (along the channel thickness). Left panel and top panel: 7 μm -width orthogonal view of the Z stack along the yellow lines. Size of the image: 75 μm x 75 μm .



Supplementary Figure S7. Characterization of periodic and non-periodic microtubule patterns. a,d) Xenopus cell extract supplemented with fluorescent tubulin and 1.5 μ M of Ran-NPs (d) or 6 μ M RanGTP and unconjugated nanoparticles (a). Application of magnetic field allow the formation of a periodic network of microtubules with 1.5 μ M of Ran-NPs, whereas 6 μ M RanGTP and unconjugated nanoparticles lead to non periodic organization of MT. b,e) FFT analysis of corresponding fluorescence microscopy image (a,d). c,f) Autocorrelation analysis of non-periodic (a) and periodic networks (d) obtained. Bars: 25 μ m.



Supplementary Figure S8. Inhibition of dynein activity with 100 nM orthovanadate avoids the formation of microtubule aster in presence of RanNP column or RanGTP. Bars = 25 μ m.

Supplementary References

1. Liu, J.; Lawrence, E. M.; Wu, A.; Ivey, M. L.; Flores, G. A.; Javier, K.; Bibette, J.; Richard, Field-Induced Structures in Ferrofluid Emulsions. *J. Phys. Rev. Lett.* **1995**, *74*, 2828-2831.
2. Minc, N.; Futterer, C.; Dorfman, K. D.; Bancaud, A.; Gosse, C.; Goubault, C.; Viovy, J. L. Quantitative Microfluidic Separation of DNA in Self-Assembled Magnetic Matrixes. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3770-3776.
3. Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Berggard, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S. Understanding the Nanoparticle-Protein Corona Using Methods to Quantify Exchange Rates and Affinities of Proteins for Nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 2050-2055.

Chapitre 3

Discussion et perspectives

3.1 Discussion

Du fait de sa nature dynamique, l'auto-assemblage d'un fuseau de microtubules requiert un haut niveau de contrôle des interactions moléculaires. Les mécanismes régulant l'organisation d'une telle structure ne semblent donc pas exclusivement reposer sur un processus type « search and capture » où les chromosomes sont « capturés » par des microtubules [95].

L'inhibition de la production de Ran-GTP dans les extraits d'œufs destabillise l'assemblage de fuseaux et ce, même en présence de centrosomes [205]. Ceci suggère que la seule présence de centrosomes qui nucléent des microtubules ne suffit pas pour organiser un fuseau. En outre, la nucléation des microtubules proches des chromosomes est essentielle pour produire une structure stable et bipolaire [134]. Comme proposé dans le modèle baptisé « effet chromatine » les chromosomes induisent des gradients de molécules de signalisation indispensables à l'assemblage du fuseau. L'instauration de gradients d'espèces régulatrices semble donc primordiale pour l'organisation et les interactions entre microtubules.

A proximité des chromosomes, la complexation de RanGTP aux importines β libèrent des gradients de protéines NLS [140]. Ces derniers forment des gradients qui ont des effets distincts sur la nucléation et la dynamique des microtubules et ce, à différentes distances [126, 98]. Afin de mettre en évidence l'action de ces gradients de protéines NLS libres, nous avons au cours de ce travail conçu une approche expérimentale qui permet l'émergence de diverses distributions maîtrisées de protéines RCC1 et RanGTP centrales pour l'auto-organisation des microtubules.

Au sein de microémulsions encapsulant les extraits cellulaires d'œufs de xénope, nous avons observé des distributions spatiales différentes de microtubules générés par concentration magnétique des protéines RanQ69L et RCC1 (cf. sec-

tion 2.2). Ces écarts de répartitions spatiales semblent être dus aux propriétés biochimiques respectives des protéines RCC1 et Ran qui interviennent dans des cascades de signalisation moléculaires imbriquées. La protéine RCC1 générant RanGTP, cela produit une étape biochimique supplémentaire durant laquelle RanGTP peut diffuser librement dans le cytoplasme. Un gradient de RanGTP est alors créé. Lors de la diffusion de RanGTP, des complexes RanGTP-importines sont formés libérant les protéines MAPs responsables de la nucléation des microtubules.

Afin de valider ces hypothèses, nous avons élaboré un modèle décrivant le comportement cinétique et diffusif des espèces mises en présence expérimentalement, i.e. RCC1, RanGTP, importines ainsi que les protéines MAPs. Ce modèle suggère que les gradients de MAP générés par la protéine RCC1 opèrent dans un espace plus étendu que ceux générés par la protéine RanGTPQ69L. Plus exactement, dans le cas des gradients de MAP induits par la protéine RCC1, la distance caractéristique séparant l'ensemble des microtubules formés aux agrégats de protéines magnétiquement formés est égale à $10\text{ }\mu\text{m}$, contre $5\text{ }\mu\text{m}$ pour les gradients de MAPs générés par RanGTPQ69L. Bien plus, toujours dans le cas des nanobilles magnétiques décorées par RCC1, cette distance dans un tiers des cas est égale à $15\text{ }\mu\text{m}$, c'est-à-dire équivalente à celle établie dans le cas d'ensembles de microtubules induits par la chromatine [141]. Les phénomènes de réaction-diffusion autour des nanobilles magnétiques bien semblent bien à la base du contrôle de l'auto-organisation des microtubules préalable à la formation d'un fuseau bipolaire.

Par ailleurs, notre habilité à distribuer précisément dans l'espace et dans le temps des protéines nous a permis de provoquer l'auto-assemblage de microtubules pour former un réseau périodique au sein de canaux microfluidiques. En imposant par l'intermédiaire d'un champ magnétique uniforme la position des nanobilles fonctionnalisées par RanGTPQ69L, nous avons provoqué la nucléation de microtubules. L'inter-distance entre agrégats de nanobilles assemblées en colonnes et celle entre asters de microtubules structurés en réseaux n'étant pas la même, ceci suggère l'existence d'un processus supplémentaire qui interviendrait après la nucléation des microtubules au niveau des colonnes de nanobilles. La croissance et l'organisation des microtubules s'effectuant sous l'action des protéines MAPs et des protéines motrices, c'est l'action de ces dernières qui pourrait être ainsi mise en évidence. Tout d'abord, sous l'action des MAPs, les microtubules nucléent du fait de l'augmentation locale de concentration en nanobilles magnétiques conjuguées à RanGTPQ69L. Ensuite, la croissance des microtubules sur des sites restreints serait organisée par des protéines motrices comme les dynéines, ceci jusqu'à ce que le réseau de microtubules atteigne une distance caractéristique imposée par la longueur des fibres polymériques le constituant.

En conclusion, nos observations suggèrent que l'assemblage de microtubules est coordonné à l'échelle moléculaire par l'action de deux catégories de protéines : les MAPs et les moteurs moléculaires [206]. L'analyse du réseau de signalisation induit par les protéines Ran/RCC1 est cruciale pour l'identification des biomolécules (protéines ou complexes de protéines) nécessaire à l'élaboration d'une structure auto-organisée.

3.2 Perspectives

3.2.1 Une approche générique

Ce travail constitue une première étape démontrant la pertinence du contrôle par des nanobilles superparamagnétiques des voies de signalisation intra-cellulaires impliqués dans la morphogénèse du cytosquelette. Grâce à cette approche, il est possible de structurer, à un instant donné, la répartition d'espèces moléculaires selon des motifs requis par l'expérimentateur. Ce type de méthodologie *bottom-up* peut inspirer de nouvelles stratégies d'étude des réseaux de régulation.

Ce travail souligne en effet à quel point la distribution spatiale d'une protéine donnée peut jouer un rôle décisif en émettant un «signal» qui déclenche l'émergence de nombreux processus à l'échelle moléculaire.

3.2.2 Applications potentielles

La technique validée au cours de ce travail pourra être utilisée pour analyser les gradients d'interaction moléculaires autour de chromosomes mitotiques. Il s'agira d'obtenir une image de la distribution d'une protéine MAP comme TPX2 et d'imager son champ d'opération. Nous avons pu observer que les gradients de protéines MAPs générés par la protéine RCC1 pénètrent largement à travers le cytoplasme. Ces mêmes gradients induits au cours de la division cellulaire devraient avoir les mêmes caractéristiques mais une démonstration expérimentale serait pleinement convaincante.

En outre, d'autres mécanismes impliqués dans l'organisation de microtubules ont été récemment mis en évidence au sein d'extraits d'œufs de xénope. Le complexe passager (chromosomal passenger complex, CPC) au niveau des centromères de chromosomes permettrait notamment l'assemblage de microtubules autour de la chromatine [207]. De plus, des mécanismes indépendants des pôles et des chromosomes semblent intervenir dans la génération de microtubules au sein du fuseau avec, par exemple, des travaux rapportant la nucléation à partir de microtubules préexistants [208, 209, 210]. Des nanobilles fonctionnalisées avec des molécules présumées ou identifiées comme essentielles au cours de ces mécanismes pourraient aider à la compréhension des interactions moléculaires

à l'œuvre.

Troisième partie

Microsystèmes électriques pour la modification spatiotemporelle de la concentration à l'échelle d'un tissu en développement

Chapitre 1

Cadre et problématique

1.1 L'embryon précoce de souris, un ensemble cellulaire en développement

Chez l'embryon de mammifère, comment des cellules en apparence identiques adoptent-elles des destins différents de façon coordonnée ? Durant le développement embryonnaire précoce, la spécification des différents types cellulaires induit une régulation dynamique, fine et précise, de différents processus cellulaires tels que la prolifération, la migration ou la différenciation. Au niveau moléculaire, ce sont des voies de signalisation majeures qui assurent le contrôle spatio-temporel de ces processus pendant les premières étapes du développement. Comprendre la fonction précise de ces molécules ou de ces réseaux de molécules requiert la capacité de contrôler localement leur activité.

L'électroporation localisée d'acides nucléiques constitue un outil d'étude puissant pour modifier spatio-temporellement l'expression des gènes qui régissent le devenir des cellules. Au cours de ce travail, nous avons ainsi conçu et réalisé des microsystèmes électriques dédiés à l'électroporation d'embryons de souris entre 5 et 7 jours de développement (notés respectivement E5 et E7). Outre le développement technique de ces microdispositifs, nous avons élaboré un modèle électrique décrivant leurs performances et nous avons établi des protocoles expérimentaux permettant d'obtenir des électro-transfections reproductibles, localisées et qui garantissent la survie cellulaire au sein de ces organismes délicats.

1.1.1 Contexte et enjeux

L'équipe «Spécification des destins cellulaires chez la souris» de l'Institut Jacques Monod étudie, à l'échelle moléculaire et cellulaire, les événements qui initient la spécification des différents lignages de l'embryon de mammifère, en

utilisant la souris comme modèle d'étude. Des mécanismes moléculaires majeurs par lesquels des cellules en apparence identiques adoptent des destins différents s'engagent en particulier lorsque la polarité antéro-postérieure (AP) de l'embryon est mise en place [213]. Les voies de signalisation impliquées sont les mêmes qui assurent la maintenance et le renouvellement des tissus chez l'organisme adulte, des fonctions qui les placent au centre de situations pathologiques telles la tumorigenèse [214, 215, 216]. L'étude de l'implication et de l'interaction de ces réseaux de molécules de signalisation pendant les premières étapes du développement, i.e. lorsque l'organisme est encore relativement simple, est particulièrement pertinente pour la compréhension de leurs fonctions.

1.1.2 Événements morphologiques

Devant la multitude du vivant, les études des processus biologiques qui dirigent le développement se sont concentrées sur un nombre limité d'espèces jugées représentatives. Parmi ces organismes-modèles, la souris possède un génome, entièrement séquencé depuis la fin de l'année 2002, qui présente beaucoup de similitudes avec celui de l'espèce humaine. Par ailleurs, la souris de laboratoire supporte bien la consanguinité ce qui a permis le développement de nombreuses lignées aux caractéristiques génétiques bien établies et stables, devenant par là même un modèle incontournable pour les études de génétique et de biologie moléculaire chez les mammifères. Enfin, d'un point de vue expérimental, cet organisme présente de nombreux avantages : il est petit, facile à manipuler, extrêmement fécond et son cycle vital est suffisamment bref.

La gestation d'une souris dure 20 à 21 jours et est divisée en deux périodes (Fig.1.1). D'une part, le développement pré-implantatoire s'étend de la fécondation jusqu'à l'implantation à E4.5 et d'autre part, le développement post-implantatoire se déroule de E4.5 jusqu'à la naissance de l'animal. Au cours de la phase pré-implantatoire, l'embryon circule librement dans le tractus génital maternel. A l'issue de cette période, l'embryon compte une centaine de cellules et les premiers événements de spécification et de différenciation cellulaire ont permis la formation de tissus-extra-embryonnaires qui assureront les échanges nutritionnels avec la mère après l'implantation. Plus précisément, à E4.5, l'embryon appelé blastocyte (Fig.1.1) se compose de trois tissus distincts : (i) deux tissus extra-embryonnaires, le trophoctoderme qui produit une partie du placenta ainsi que l'endoderme primitif qui engendre une partie du sac vitellin dans lequel se développe le fœtus et (ii) un tissu pluripotent, l'épiblaste, dont les cellules donneront naissance à tous les tissus du fœtus (Fig.1.2).

Ce n'est qu'après l'implantation que les cellules de l'épiblaste vont s'engager dans des voies de différenciation pour produire une grande diversité de tissus

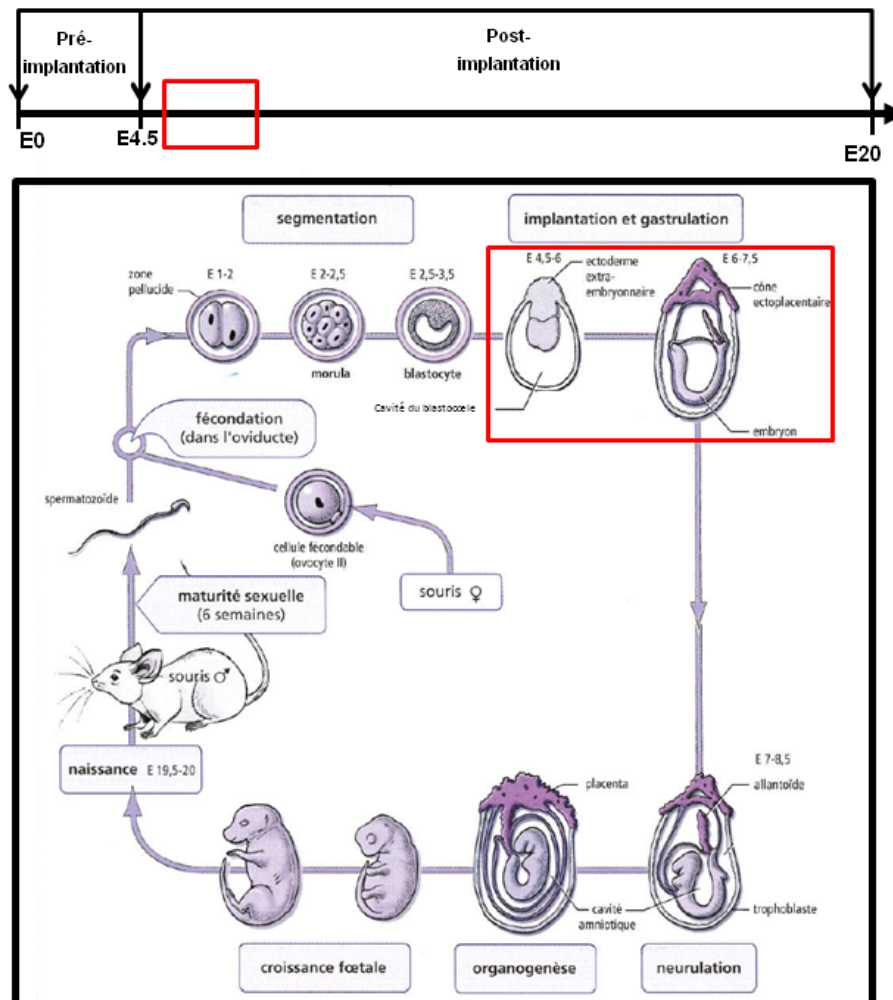


FIGURE 1.1 – Le cycle de développement chez la souris. En rouge sont encadrés les stades d'intérêt dans notre travail. D'après T. Darribère : le développement d'un mammifère : la souris, p10.

embryonnaires. Au cours de la gastrulation intervenant entre les stades E6.0 et E7.5 des processus de spécification, prolifération, de changements de morphologie cellulaires, de modifications d'adhérence et de migrations cellulaires assurent la mise en place des trois feuillets embryonnaires qui donneront naissance à l'ensemble des tissus des futurs organes (Fig.1.2). Apparaissent l'ectoderme qui donne naissance au système nerveux et à la peau, le mésoderme qui produit, entre autres, les futures cellules musculaires et l'endoderme qui génère essentiellement le futur système digestif [217].

Les recherches menées au cours de ce travail se sont focalisées sur des embryons entre E5.0 et E7.0, ces stades post-implantatoires étant au centre des études menées par l'équipe «Spécification des destins cellulaires chez la souris» (Fig.1.2).

1.1.3 Spécification et régulation des destins cellulaires

Après l'implantation

Au cours de l'implantation, entre E4.0 et E5.0, l'embryon subit un changement morphologique important pour adopter une forme caractéristique en cylindre allongé. Cette transformation est liée à la croissance importante du trophoctoderme polaire, désormais appelé ectoderme extra-embryonnaire, qui «pousse» les cellules de l'épiblaste dans la cavité du blastocœle. Par ailleurs, la cavité pro-amniotique se forme par apoptose des cellules centrales de l'épiblaste. Enfin, l'endoderme viscéral (VE, Visceral Endoderm), un dérivé de l'endoderme primitif, constitue l'épithélium externe couvrant l'ectoderme extra-embryonnaire dans la région proximale, et l'épiblaste dans la région distale [217, 218].

A E5.5 un groupe de 10 à 15 cellules distales de l'VE (DVE, Distal Visceral endoderm) adoptent une identité distincte. Les cellules du DVE se caractérisent par une morphologie allongée de type épithélium colonnaire mais aussi par l'expression d'un répertoire spécifique de gènes codant pour des facteurs de transcription tels Hex ou des protéines secrétées telles Cer1, Lefty1 ou Dkk1 [218]. Entre E5.5 et E6.0, les cellules du DVE migrent vers une position plus proximale définissant ainsi le futur pôle antérieur de l'embryon et adoptent alors le nom d'endoderme viscéral antérieur (AVE, Anterior Visceral Endoderm).

Au cours de leur migration, les cellules du DVE produisent des filopodes orientés dans la direction du mouvement dont la présence est dépendante de l'activité de régulateurs du cytosquelette d'actine tels Rac1 et Nap1 [221, 223]. Les cellules du DVE migrent au sein de l'épithélium du VE sans perdre les

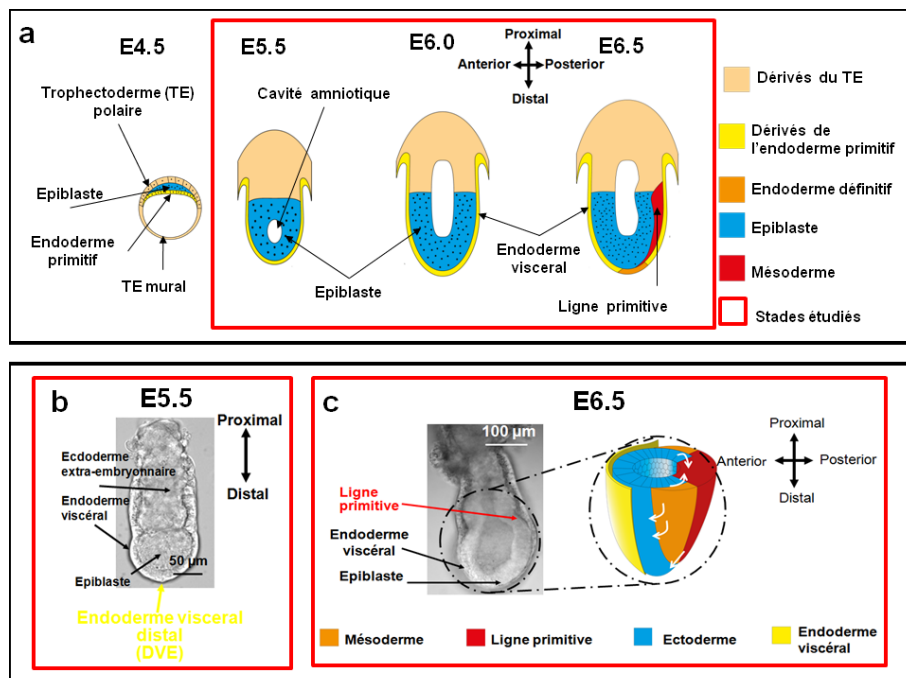


FIGURE 1.2 – Premières étapes du développement post-implantatoire. Après l'implantation à E4.5, l'embryon adopte une forme allongée d'œuf-cylindre. A E6.5, l'épiblaste donne naissance au mésoderme, à l'ectoderme embryonnaire et à l'endoderme définitif. Les stades étudiés au cours de ce travail sont encadrés en rouge. (b) Dès le stade E5.5 des critères morphologiques permettent de distinguer des cellules différenciées de l'endoderme viscéral distal. Il est possible de distinguer ces cellules tout au long de leur migration vers le futur pôle antérieur de l'embryon. (c) Image d'un embryon de souris au stade E6.5 en début de gastrulation et représentation schématique des différents feuillets embryonnaires apparaissant et migrant lorsque l'embryon gastrule, avec en rouge : mésoderme, en jaune : endoderme viscéral, en bleu : ectoderme. Les flèches blanches indiquent les mouvements des cellules de l'épiblaste postérieur vers la ligne primitive et des cellules du mésoderme qui couvrent progressivement l'épiblaste.

contacts cellule-cellule suggérant que ce phénomène s'apparente à la migration cellulaire collective décrite aussi dans les situations de cicatrisation et d'invasion par les cancers épithéliaux [224]. Plusieurs mécanismes non exclusifs ont été invoqués pour expliquer la migration directionnelle du DVE. Les cellules du DVE pourraient orienter leur migration en réponse à l'action de signaux chimiques répulsifs ou attractants localisés [220]. Il a aussi été suggéré que la migration du DVE fait partie d'un phénomène plus global de réorganisation de l'endoderme viscéral, où des changements dans les relations de voisinage et dans les taux de prolifération régionaux pourraient contribuer à la translocation de la population du DVE [243, 226].

La gastrulation

A E6.0 la gastrulation débute par la formation de la ligne primitive. Au sein de cette région de l'épiblaste postérieur les cellules perdent leurs adhésions inter-cellulaires, subissent une transition épithélium mésenchyme, se délaminent et migrent pour former deux nouveaux feuillets embryonnaires, le mésoderme et l'endoderme définitif, qui contribueront à la formation des futurs organes. Le facteur de la famille TGF β Nodal est essentiel pour l'initiation de la gastrulation aussi bien chez la souris que dans d'autres espèces de vertébrés [225]. Nodal, en se fixant à ses récepteurs de type Activine, active une cascade de transduction dans la cellule aboutissant à l'expression de gènes cibles impliqués dans la spécification du mésoderme, de l'endoderme et la transition épithélium-mésenchyme [217]. Les cellules du DVE/AVE produisent des protéines sécrétées, Cer1 et Lefty1, qui agissent comme des antagonistes sécrétés de Nodal [226]. Ainsi la migration du DVE vers un côté de l'embryon définit une zone où le signal Nodal, initialement distribué de façon homogène dans l'épiblaste, est localement inhibé de sorte que la ligne primitive se forme à l'opposé de l'AVE [222] (Fig1.3).

Des études génétiques et embryologiques ont montré que, outre son action dans l'initiation de la gastrulation, Nodal joue un rôle majeur dans d'autres processus du développement embryonnaire précoce. En particulier, la fonction de Nodal est essentielle pour le maintien de la pluripotence de l'épiblaste, pour la spécification et la migration des cellules du DVE, pour la régionalisation du mésoderme et de l'endoderme au cours de la gastrulation, et pour la mise en place de l'asymétrie droite/gauche [219, 217]. Ainsi la signalisation Nodal intervient de façon récurrente et cruciale dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur et de la spécification des destins cellulaires au cours des premières étapes du développement post-implantatoire de la souris (Fig.1.3).

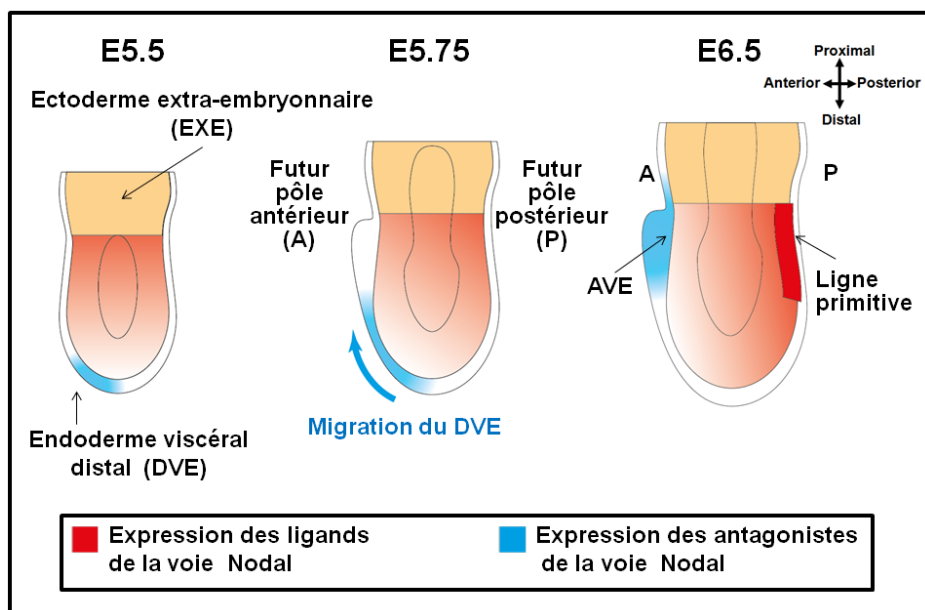


FIGURE 1.3 – Le rôle de la voie de signalisation Nodal entre les stades E5.5 et E6.75. A E5.5, la voie de signalisation Nodal est requise pour spécifier les cellules du DVE. Ces cellules expriment les antagonistes de Nodal Cerberus et lefty 1 et inhibent son action dans l'épiblaste distal. En parallèle, des interactions entre l'épiblaste et l'ectoderme extra-embryonnaire (EXE) renforcent la signalisation Nodal dans l'épiblaste proximal (non figuré). Suite à la migration du DVE vers le pôle antérieur, l'expression et l'activité de Nodal sont réprimés confinant la formation de la ligne primitive à l'épiblaste postérieur. Adapté de [222].

Analyse des mécanismes à l'œuvre

Si une connaissance globale des mécanismes impliqués dans ces divers processus fondamentaux pour le développement de l'embryon aux stades post-implantatoires est d'ores et déjà acquise, des études à l'échelle cellulaire et moléculaire sont nécessaires. Par quels mécanismes est accomplie la migration du DVE, comment la direction de ce mouvement est-elle déterminée? Quel est le niveau d'activité suffisant de signalisation Nodal pour précisément réguler une multitude de comportements et de destins cellulaires entre E5.0 et E7.0? La compréhension fine de ces phénomènes requiert des outils capables de modifier localement et de manière reproductible l'expression génique à l'échelle d'une sous-population de cellules afin de suivre leur comportement et d'éventuellement le modifier. Plus exactement, par l'intermédiaire d'instruments dédiés, nous serons en mesure par exemple de marquer un sous-groupe de cellules au sein et hors DVE afin d'imager leur devenir ou encore nous pourrions manipuler localement la signalisation Nodal. Il s'agit donc d'implémenter une technique de perturbation locale adaptée aux embryons de souris aux stades post-implantatoires précoces.

1.1.4 Principales techniques de perturbations localisées appliquées aux embryons de souris

Contexte

Les approches mises en œuvre en biologie du développement ont pour objectif de suivre et de modifier le comportement de cellules au sein d'un organisme entier en formation. Outre les techniques de biologie expérimentale telles que les greffes ectopiques ou l'ablation de tissus, deux techniques ont la faveur des embryologistes. D'une part, des expériences de lignage permettent de suivre le devenir de cellules données au cours du développement. D'autre part, des expériences dites de perte ou de gain de fonction consistent respectivement à invalider un gène ou au contraire à forcer son expression.

Lignage cellulaire

En biologie du développement, une question essentielle est le suivi du devenir de cellules pouvant se déplacer considérablement dans l'embryon au cours du temps. L'utilisation de marquages spécifiques rend compte des mouvements opérés par le groupe de cellules originellement ciblé ainsi que par leur descendance [296].

Chez la souris, l'essor de l'embryologie expérimentale et de la culture *in vitro* d'embryons ont rendu possible des expériences de lignage consistant à suivre le devenir de populations greffées. En utilisant comme donneurs des embryons

porteurs d'un marqueur génétique tel le gène codant la β -galactosidase, il est par exemple possible de déduire le mouvement de cellules de mésoderme au cours de la gastrulation [229].

Une autre méthode repose sur l'utilisation de colorants dérivés de la carbo-cyanine comme diO ou DiI. Il s'agit de substances très hydrophobes qui s'incorporent aux membranes lipidiques des cellules cibles et qui sont bien retenues dans les cellules originellement ciblées ainsi que leur descendance. Ces marqueurs extracellulaires ont ainsi permis de cibler 100 à 150 cellules de l'endoderme définitif d'embryons de souris de stade E8.0-E8.5 [296].

Alors que, pour ces techniques de marquage, le ciblage d'une sous-population précise de cellules est délicat, l'iontophorèse permet en revanche de marquer des cellules individuelles. Une molécule chargée telle l'enzyme horseradish peroxydase ou le Dextran fluorescent est ainsi injectée dans une cellule unique à travers une aiguille dans laquelle circule un faible courant électrique. Cette technique a été appliquée avec succès pour l'étude des mouvements dans l'épiblaste et l'endoderme d'embryons de souris à E6.5 et E7.5 [231, 230, 232].

Enfin, les mouvements cellulaires peuvent être suivis par imagerie en temps réel d'embryons porteurs de transgènes permettant l'expression de protéines fluorescentes dans les sous-populations d'intérêt. C'est ainsi que le mouvement des cellules du DVE a été visualisé dans des embryons porteurs du transgène Hex-GFP [233]. La production récente de lignées transgéniques pour l'expression de protéines photoactivables offre de nouvelles possibilités pour le contrôle spatio-temporel fin du marquage cellulaire au cours du développement embryonnaire [242].

Modifications génétiques

Si une expérience de lignage cellulaire renseigne quant aux processus de prolifération, de changements de forme, de déplacements ou de regroupements de cellules au cours du développement, elle ne permet pas de rendre compte de la fonction précise des gènes d'intérêt quant à la coordination de ces activités cellulaires fondamentales. Aussi, un autre type d'expérimentation permet d'élucider la fonction ainsi que la dynamique des gènes en perturbant de manière contrôlée leur expression. Chez la souris, ce type d'analyse repose principalement sur des techniques de transgénèse.

Perturbations germinales Des animaux génétiquement modifiés sont générés soit par micro-injection d'un transgène soit par recombinaison homologue dans les cellules embryonnaires souches. Plus précisément, la micro-injection d'ADN a été la première technique développée pour obtenir des animaux transgéniques. Quelques heures après la fécondation, l'ADN à transférer aussi appelé

transgène est injecté dans le pronucléus mâle. C'est cette technique qui a été mise en œuvre pour produire par exemple la lignée transgénique *TgHex-GFP* où les cellules du DVE de l'embryon à E5.5 expriment la GFP [233]. Toutefois, cette méthode ne permet de contrôler ni le site d'insertion du transgène dans le génome ni le nombre de transgènes intégrés, ces paramètres étant déterminants pour son expression.

Une autre technique de transgénèse repose sur l'utilisation de cellules souches embryonnaires ou cellules ES (*embryonic stem cells*) dont le génôme a été modifié par la technique de recombinaison homologue. Les cellules souches ainsi modifiées sont injectées dans des blastocytes et contribuent à la formation de l'embryon porteur de la modification. Il s'agit de remplacer très précisément une séquence d'ADN endogène par une séquence d'ADN apportée par un vecteur. Cette opération est effectuée par une recombinaison entre des séquences portées par le vecteur et les séquences homologues du génôme des cellules ES. Il est ainsi possible de générer des animaux «*knock-out*» où le gène d'intérêt est délété ou muté. Une variante de cette méthode consiste à remplacer la séquence endogène par la séquence d'un gène rapporteur qui s'exprime alors à la place du gène cible. C'est cette technique de «*knock-in*» qui a été utilisée pour invalider le gène Nodal par insertion du gène codant la β -galactosidase [234].

En outre, un système d'inactivation conditionnelle repose sur l'utilisation de la recombinaise Cre et de ses séquences de reconnaissance appelées sites *LoxP*. La Cre catalyse la recombinaison entre deux sites *LoxP* et la délétion de la séquence flanquée par ces sites. Ce système dit «*Cre-LoxP*» permet un contrôle temporel et spatial de l'inactivation d'un gène. Plus exactement, par recombinaison homologue des cellules ES, l'un des allèles du gène cible est encadré par deux sites *LoxP* dans la même orientation alors que l'autre allèle de ce gène a été inactivé. En parallèle, des souris transgéniques porteuses du gène Cre sont créées par microinjection. Le croisement entre ces deux lignées de souris produit des embryons pour lesquels, dans les cellules qui expriment l'enzyme Cre, la séquence d'ADN présente entre les deux sites *LoxP* est éliminée, inactivant le deuxième allèle du gène cible. Une inactivation conditionnelle est ainsi effectuée dans un tissu choisi par avance, plus exactement celui où s'exprime le gène Cre [235]. Bien plus, un contrôle supplémentaire de l'activité de la recombinaise Cre peut être obtenu grâce à des versions inductibles de cette dernière. Une recombinaise Cre fusionnée à une version mutée du récepteur aux estrogènes humain est activée spécifiquement par un anti-estrogène, le tamoxifène, et non par l'estradiol endogène [236]. La recombinaison par Cre peut ainsi être induite ponctuellement au cours du développement embryonnaire par du tamoxifène injecté dans une femelle gestante, ou ajouté au milieu de culture des embryons étudiés [226].

Perturbations somatiques Sans recourir aux techniques «lourdes» exigées par la génération de lignées d’animaux transgéniques et pour atteindre une sous-population de cellules, la lipofection a été implémentée pour modifier localement l’expression génétique chez des embryons individuels de souris. Cette technique a été développée par une seule équipe sur des embryons de souris précoces et a permis de mettre en évidence, en micro-injectant des liposomes (ADN/lipofectamine), des mécanismes cellulaires opérant lors de la migration du DVE à E5.5 [243]. Ce mélange ADN et lipofectamine se compose de grandes particules polaires sphériques dont le centre encapsule l’ADN à transférer et dont l’enveloppe est constituée de phospholipides agencés en bicouche. Ces vésicules, capables de fusionner avec les membranes cellulaires, permettent la libération du matériel génétique dans la cellule.

Enfin, une dernière méthode expérimentalement employée pour la perturbation génétique localisée d’embryons de souris, est l’électroporation. Une déstabilisation de la membrane plasmique de cellules est provoquée par l’intermédiaire de stimulations électriques permettant aux acides nucléiques de pénétrer dans le cytoplasme [246]. Cette alternative est actuellement utilisée par différentes équipes [295, 286, 285] pour l’étude du développement embryonnaire précoce de la souris.

1.2 L’électroporation : une technique robuste, courante et efficace

1.2.1 Présentation de la technique pour des cellules en culture

L’électroporation utilise l’effet de chocs électriques pour déstabiliser la membrane cellulaire pendant de courtes périodes, permettant ainsi la pénétration de molécules ou de principes actifs peu perméables. Les premières études *in vitro* sur les effets de champs électriques pulsés sur des cellules vivantes dans les années 1960-1970 ont décrit une cassure réversible et/ou irréversible des membranes plasmiques cellulaires appelée «*dielectric breakdown*» [256, 257, 258, 262, 263, 54]. Ce phénomène physique a ensuite été nommé électroporation ou électroperméabilisation car des macromolécules qui normalement ne diffusaient pas au travers de la membrane plasmique étaient capables de diffuser. En 1982, le premier essai d’électrotransfert de gènes *in vitro* est réalisé sur des cellules de mammifère en suspension. Des cellules L de souris (mouse lyoma cells) déficientes pour la thymidine kinase (tk) sont exposées à un champ électrique de 8 kV.cm^{-1} provoquant la circulation d’un courant continu permettant la transfection du plasmide contenant le gène tk et la transformation du phénotype de

ces cellules en tk positif [264, 269]. Ces chocs électriques provoquent donc la déstabilisation et la perméabilisation de la membrane de cellules de souris en suspension, favorisant ainsi l'entrée d'ADN exogène dans la cellule.

Les modèles actuels

Le processus multi-étapes de l'électroperméabilisation L'électroperméabilisation de cellules individuelles est actuellement décrit en quatre étapes : création, expansion, stabilisation et disparition de structures transitoires créées au niveau de la membrane cellulaire. [315, 316].

- (i) Le champ électrique appliqué crée, en quelques nanosecondes, une augmentation de la différence de potentiel à travers la membrane de la cellule jusqu'à un seuil de perméabilisation définissant ainsi la zone perméabilisée.
- (ii) tant que le champ est maintenu au-dessus d'une valeur critique, il y a expansion du phénomène d'électroperméabilisation. Le nombre et la durée des impulsions ont un rôle important quant à l'efficacité de la perméabilisation [351]
- (iii) Dès que le champ électrique devient inférieur à cette valeur critique, une réorganisation en quelques microsecondes/millisecondes de la membrane se produit.
- (iv) La membrane se restructure lentement et reste dans un état semi-perméabilisé pendant plusieurs secondes avant de revenir à son état initial. Ce retour à l'état initial, se traduit par la réorganisation de la matrice lipidique et protéique de la membrane et du cytosquelette et n'intervient qu'après plusieurs heures [270].

Des hypothèses avancées A ce jour, les mécanismes relatifs à ces étapes restent spéculatifs [299]. L'état actuel des connaissances ne permet pas de décrire la structure membranaire responsable de la perméabilité membranaire électro-induite.

Pour certains, le modèle des pores¹ est valable pour expliquer les résultats expérimentaux [300]. Des simulations montrent que la pénétration de molécules d'eau dans les couches lipidiques pourrait provoquer l'hydratation de la membrane induisant la formation de canaux d'eau dans les couches lipidiques. Toutefois, dans le cadre de ces simulations, les conditions de champs électriques fixées sont bien trop intenses (jusqu'à 0,4 V. nm⁻¹) pour garantir la viabilité cellulaire [303, 304, 305]. Des travaux basés sur des mesures de conductance, sur l'étude de la pénétration de molécules dans les cellules ou sur des simulations de dynamique moléculaire ont estimé que le diamètre des pores putatifs varie entre 1 et 10 nanomètres [265, 266, 299, 267, 305]. Une observation en cryo-microscopie

1. qui donnent son nom à la technique

électronique d'érythrocytes électroperméabilisés montre l'apparition de structures ouvertes en forme de cratère [268]. Ces structures apparaissent seulement dix secondes après l'application du champ et elles semblent dues à un effet secondaire de la perméabilisation : l'hémolyse des globules. Aucune évidence expérimentale directe ne confirme actuellement l'existence de pores membranaires sur des cellules vivantes.

Des équipes recherchent d'autres structures membranaires responsables du passage de molécules au travers de la membrane [299]. Afin d'expliquer le transport de molécules à travers une membrane cellulaire, de nombreuses hypothèses modélisent les effets d'un champ électrique intense sur une telle structure. Ainsi, en fixant le potentiel transmembranaire seuil à 200 mV sur une membrane lipidique de 5 nm, le champ électrique exercé atteint une valeur de 10 MV.m^{-1} . Ceci provoque une électro-compression de la double couche de lipides favorisant l'apparition de défauts dans la membrane. Un modèle théorique, baptisé flip-flop, propose une réorientation des lipides. Des résultats issus de simulations [301] et d'expériences [302] rapportent une augmentation significative du passage d'un lipide d'une couche à une autre suite à l'électroporation. Cette réorganisation lipidique entraînerait alors des molécules à travers la membrane. Enfin, divers modèles explicatifs reposent respectivement sur la formation de micelles [306] ou sur l'intervention de protéines membranaires.

Il est clair que les lipides membranaires sont impliqués dans le processus d'électroperméabilisation [271]. Une réorientation des têtes polaires des phospholipides de la membrane plasmique de cellule CHO a été observée par résonance magnétique nucléaire du phosphore 31 [273]. Cette étude montre que tous les phospholipides de la zone perméabilisée sont affectés.

Pour conclure, si des pores de taille nanométrique se forment, leur taille semble difficilement compatible avec le passage de macromolécules telles que l'ADN plasmidique (de plusieurs millions de daltons) à travers la membrane. De plus, l'observation de l'entrée de petites molécules comme l'iodure de propidium montre qu'elles traversent librement la membrane électroperméabilisée alors qu'une macromolécule comme de l'ADN plasmidique subit tout d'abord une étape d'interaction avec la membrane (Fig 1.4). Ceci semble indiquer qu'un mécanisme spécifique d'électroperméabilisation est impliqué dans le cas de l'ADN.

Le cas particulier de l'électrotransfection L'électrotransfection ou transfert d'acides nucléiques par électroperméabilisation de la membrane cellulaire est un processus complexe. Nous nous concentrerons ici sur l'électrotransfection d'ADN communément décomposé en cinq étapes comprenant [246, 247, 248] :

- (i) La membrane est perméabilisée par l'application d'un champ électrique

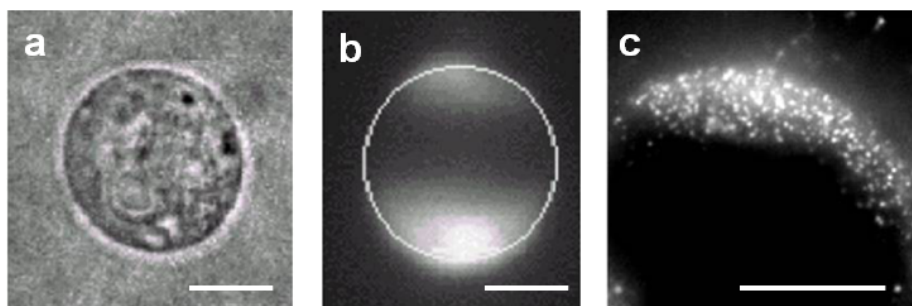


FIGURE 1.4 – Entrée de diverses molécules par application d'un champ électrique (a) au sein d'une cellule CHO (chinese hamster ovary). Electroperméabilisation de la membrane cellulaire avec (b) de l'iodure de propidium et (c) de l'ADN plasmidique. Images réalisées à $t_0 + 10$ secondes. Barres d'échelles égales à $5 \mu\text{m}$. Réalisé d'après [272].

comme décrit dans le paragraphe précédent. Sous l'action de la force électrophorétique, l'ADN chargé négativement migre vers l'anode. Plus précisément, la longueur électrophorétique L parcourue par l'ADN est proportionnelle à sa mobilité électrophorétique μ , à l'intensité du champ électrique appliqué E et à la durée cumulée des impulsions T : $L = \mu \cdot E \cdot T$ [248]. L'ADN est alors adsorbé à la surface de la membrane qui fait face à la cathode [248]. Des résultats expérimentaux indiquent que ce dernier doit être présent avant l'application du champ électrique. Aucune transfection n'est détectée lorsque l'ADN est ajouté après les impulsions [244, 245].

-(ii) L'ADN interagit avec la membrane perméabilisée. Des amas locaux d'ADN de 100 à 500 nm de diamètre [248, 249] se forment au contact de la membrane. Ces agrégats restent accessibles aux DNAses au cours de la minute suivant la fin des impulsions [324]. La formation de ces «spots» discrets est corrélée avec l'efficacité de la transfection [248]. Deux types d'interaction ADN/membrane ont été mis en évidence : les complexes de faible stabilité (le plasmide peut être libéré après extinction du champ électrique) et ceux de forte stabilité qui conduisent à une électrotransfection efficace [249]. Cependant, la nature précise de cette interaction n'est toujours pas élucidée. Est-elle causée par les propriétés diélectriques des lipides ? Par certains types de protéines ? La cohésion membranaire apparaît notamment comme un paramètre essentiel à cette interaction ADN/membrane [250].

-(iii) L'ADN traverse la membrane cellulaire. Dix minutes après extinction du champ électrique, les «spots» observés au voisinage de la membrane cellulaire sont détectés au sein de la membrane [248]. L'ADN est en cours de translocation à travers la membrane plasmique. Des résultats suggèrent l'importance du

métabolisme énergétique de la cellule quant à ce processus [359]. D'autres ont montré que l'ADN est capté par endocytose [332]².

-(iv) L'ADN migre dans le cytoplasme. L'ADN est observé sous forme d'agrégats de quelques centaines de nanomètres de diamètre dans le cytoplasme environ 30 minutes après le début de l'électrotransfection [248, 247]. Une fois dans la cellule, l'ADN doit migrer dans le cytoplasme vers le noyau. Les mécanismes de passage de l'ADN depuis la membrane plasmique vers le noyau sont mal connus. L'encombrement du cytoplasme constitue un frein pour la diffusion de macromolécules tels les plasmides. Des plasmides de taille supérieure à 2000 pb sont incapables de diffuser librement dans le cytoplasme [251]. Dans ces conditions, l'intervention de la machinerie cellulaire semble essentielle pour le transport de l'ADN transfecté jusqu'au noyau de la cellule. Il a ainsi été suggéré que la circulation des plasmides vers le noyau pourrait être favorisée par un désassemblage du cytosquelette [333] au cours de l'électroperméabilisation et par une association des plasmides électrotransfectés avec des microtubules et des moteurs moléculaires [335, 252, 253].

-(v) Le plasmide franchit l'enveloppe nucléaire et est exprimé par la cellule. La membrane nucléaire constitue une barrière importante à l'entrée d'ADN dans le noyau, et ce, malgré l'existence de pores nucléaires. L'efficacité de transfection est augmentée lorsque les cellules sont électrotransfectées en phase G2/M, c'est-à-dire lorsque la membrane nucléaire est disjointe [321].

Le début de l'expression est observable environ 2 h 30 au minimum après l'électrotransfection [359]. Suivant la molécule transférée et la cible de l'électroperméabilisation (cellule, tissu, ou organisme entier), diverses considérations sur le champ électrique doivent être envisagées afin de déterminer les conditions optimales pour atteindre une expérience efficiente et viable.

1.2.2 Effets d'un champ électrique sur des cellules

La membrane d'une cellule est comparable au diélectrique d'un condensateur. Le «circuit» formé par le milieu extérieur, la membrane isolante et le cytoplasme, place en série ce condensateur entre deux résistances. Au repos, la distribution des différentes charges présentes dans la membrane ainsi que la distribution des ions de part et d'autre de cette dernière entraînent une différence

2. Des études effectuées avec de petits ARN interférents ont montré que les impulsions électriques «électro-injectent» sans interaction avec la membrane plasmique de petits ARN dans le cytoplasme de cellules [334]. Cette étude souligne la diversité de mécanismes impliqués dans l'électrotransfert d'acides nucléiques.

de potentiel entre la membrane externe et la membrane interne de la cellule. Ce potentiel de repos d'une cellule, noté $\Delta\Psi_0$, se situe entre -20 et -150 mV, selon le type de cellules [322].

Potentiel transmembranaire induit

Lorsqu'un champ électrique externe est appliqué à une cellule, une accumulation de charges électriques se produit au niveau de la membrane cellulaire modulant le potentiel transmembranaire de la cellule. En première approximation, la cellule est considérée comme un volume sphérique creux, sa membrane présentant une épaisseur négligeable par rapport à son rayon. La différence de potentiel transmembranaire induite $\Delta\Psi_i$ par un champ électrique E sur une cellule est alors décrite par l'équation de Foster et Schwann [323] :

$$\Delta\Psi_i = F.g(\lambda).E.\cos\theta.(1 - e^{-t/\tau}) \quad (1.1)$$

où, F est un facteur dépendant de la forme de la cellule (égal à 1,5 fois le rayon de la cellule pour des cellules sphériques), $g(\lambda)$ est un paramètre dépendant de la conductivité λ de la membrane et des milieux interne et externe. $g(\lambda)$ est égal à 1 lorsque la membrane de la cellule est considérée comme un diélectrique pur, E est le champ électrique appliqué, θ l'angle entre la direction du champ électrique et la normale à la tangente à un point M donné de la membrane, t le temps et τ le temps de charge de la capacité membranaire (Fig.1.5).

Généralement, l'électroporéabilisation de cellules implique le recours à des impulsions dont la durée (de plusieurs centaines de microsecondes à quelques millisecondes) est très supérieure au temps de charge de la cellule qui est de l'ordre de quelques microsecondes. Pour une cellule sphérique l'équation peut donc être simplifiée.

$$\Delta\Psi_i = 1,5.r.E.\cos\theta \quad (1.2)$$

$\Delta\Psi_i$ n'est pas uniforme sur toute la surface de la cellule : le potentiel transmembranaire induit est maximum au point de la cellule face aux électrodes ($\theta = 0$ et π). La différence de potentiel induite est directement proportionnelle à la taille de la cellule et à l'intensité du champ électrique appliqué. Lors de l'application d'un champ électrique, la différence de potentiel induite se surajoute au potentiel de repos de la membrane cellulaire. La membrane est mise hors équilibre et devient transitoirement perméable lorsque la somme $\Delta\Psi_0(\text{cellule}) + \Delta\Psi_i(\text{induite})$ atteint une valeur seuil $\Delta\Psi_s$ comprise entre 200 mV et 250 mV pour la plupart des bactéries ou des cellules animales et végétales [258, 350, 354, 314, 352]. Cette valeur seuil atteint jusqu'à 1 V pour les érythrocytes [261].

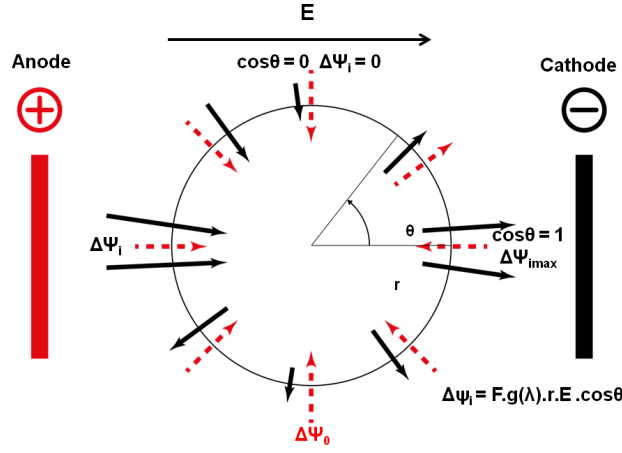


FIGURE 1.5 – Effets des impulsions électriques sur une cellule. Avec, r le rayon de la cellule, E l'intensité du champ électrique, θ l'angle entre la direction du champ électrique et la normale à la tangente de la membrane de la cellule au point considéré, F le facteur de forme de la cellule, $g(\lambda)$ le paramètre dépendant de la conductivité de la membrane. Les flèches noires représentent le potentiel induit par le champ électrique et les flèches rouges, le potentiel transmembranaire au repos. Réalisé d'après [349].

Réversibilité

L'électroperméabilisation est un processus réversible [258]. Des mesures de conductance membranaire ont montré que ce processus était déclenché dès l'arrêt de l'application du champ électrique dans le cas de bicouches lipidiques planes [355]. Pour des cellules animales, quelques minutes sont nécessaires, après application du champ électrique, pour que l'état de perméabilisation de la membrane disparaisse et qu'elle retrouve son intégrité initiale. C'est le phénomène de «resealing» [356, 359, 357, 358].

L'application de champs électriques très supérieurs à une valeur seuil provoque une perméabilisation irréversible de la cellule [360]. Dans ce cas, la mort cellulaire consécutive à l'application du champ électrique peut être rapide (dans les 15 minutes) ou intervenir 24 à 48 h plus tard [308]. En outre, l'augmentation de la durée et du nombre d'impulsions au-delà de valeurs optimales déterminées pour un type cellulaire donné peut-être à l'origine d'une mort cellulaire [308, 361]. Enfin, lorsque la membrane est électroperméabilisée, un gonflement peut apparaître conduisant à la rupture irréversible de la membrane plasmique lorsque le déséquilibre osmotique entre le cytoplasme et le milieu extérieur est trop important [261, 259, 260].

Optimisations électriques

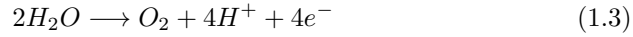
D'après l'équation 1.2, il apparaît que plus le diamètre de la cellule est petit, plus le champ extérieur appliqué devra être élevé. Les conditions électriques doivent alors être adaptées aux cellules ciblées. Ainsi, les cellules CHO ont un diamètre d'environ $10\ \mu\text{m}$ et possèdent une valeur seuil de potentiel transmembranaire égale environ à $0,5\ \text{V}$ [270]. En revanche, pour les érythrocytes humains qui présentent un diamètre moyen égal à $7\ \mu\text{m}$, la valeur seuil de potentiel transmembranaire est estimée à environ $1\ \text{V}$ [261].

En outre, du fait de cette différence de diamètre, des cellules CHO adhérentes sont perméabilisées pour des champs électriques appliqués de $300\ \text{V.cm}^{-1}$ alors que ces mêmes cellules en suspension sont électroperméabilisées avec des champs électriques d'une valeur égale à $700\ \text{V.cm}^{-1}$ [350, 246]. Enfin, les fibres musculaires étant de longues cellules d'un diamètre de 10 à $100\ \mu\text{m}$, il s'agit de recourir à des champs électriques peu intenses (entre 100 et $500\ \text{V.cm}^{-1}$) afin d'atteindre des électroperméabilisations efficaces [274]. Afin de déterminer les conditions électriques optimales pour une électroperméabilisation efficace, il est nécessaire d'évaluer les valeurs de champ électrique adaptées à chaque type de cellules, de tissus et d'espèces étudiées.

Certaines équipes ont mis en évidence l'importance des conditions appliquées à savoir la forme, l'intensité, la durée ainsi que la fréquence des impulsions pour atteindre une électroporation viable et efficace [338, 339, 350, 359]. L'efficacité de cette technique a été notablement améliorée par le recours aux impulsions électriques de différentes formes : exponentielles, carrées unipolaires ou bipolaires. A ce titre, *in vivo*, des impulsions de forme carrée permettent de fixer l'intensité du champ électrique et la durée des impulsions indépendamment de la résistance électrique du tissu alors que, *in vitro*, ce sont des impulsions de forme exponentielle dont la constante de temps est dépendante de la résistance électrique du milieu de culture qui sont principalement utilisées [275]. La forme de l'impulsion détermine la durée pendant laquelle le champ électrique reste au-dessus de la valeur seuil d'électroporation [336]. Des optimisations quant au nombre et à la durée des impulsions sont nécessaires. Les effets liés au nombre d'impulsions appliqué étant difficilement dissociable de ceux liés à la durée de la stimulation, il est généralement admis que l'utilisation d'impulsions longues et répétées conduit à une augmentation de la perméabilisation cellulaire [337, 359]. Toutefois, d'autres travaux ont souligné le comportement stochastique de la technique : deux cellules identiques semblent détenir des seuils d'électroporation distincts [307].

Effets «indésirables»

Effet électrochimique La circulation d'un courant électrique lors de l'application d'impulsions électriques provoque des réactions d'oxydoréductions. Il peut alors y avoir production d'espèces chimiques réactives. L'effet électrochimique est localisé au niveau des électrodes du fait de la présence d'un milieu conducteur. Plus précisément, les réactions chimiques engagées à l'anode sont :



et à la cathode



Cet effet dépend aussi de la nature chimique de ces dernières (platine, or,...) de la composition du milieu et des paramètres électriques imposés. En particulier, la durée des impulsions influe sur la production d'espèces réactives. Pour des impulsions supérieures à 100 μs , un changement de pH localisé au niveau des électrodes est ainsi détecté [346]. De plus, les composés générés au niveau des électrodes peuvent avoir des conséquences néfastes sur la viabilité cellulaire et entraîner des modifications des conditions électriques pendant l'impulsion par variation des propriétés physiques du milieu [311].

Effet Joule Lorsqu'un courant I circule au sein d'une solution conductrice durant une impulsion d'une largeur ΔT , il se produit une dissipation de chaleur donnée par la loi de Joule

$$\frac{\Delta Q}{\Delta T} = R.I^2 \quad (1.6)$$

Plus exactement, au sein d'une solution homogène sans cellule, toute l'énergie électrique appliquée est convertie en chaleur. [311]. L'incrément de température $\Delta\theta$ induit est [258, 259] :

$$\Delta\theta = \frac{\sigma E^2 \Delta T}{\rho C_p} \quad (1.7)$$

où, E est l'intensité du champ électrique appliqué, σ la conductivité de l'échantillon, ρ sa densité et C_p , sa chaleur spécifique. $\Delta\theta$ est induit par une seule impulsion. L'élévation globale de température est donc fortement corrélée au nombre d'impulsions appliqué. Une dissipation thermique a lieu entre chaque impulsion. Cette dernière est d'autant plus importante que la fréquence des impulsions est basse.

1.2.3 Applications de la méthode

L'électroperméabilisation, préalablement développée pour la transfection de cellules en culture, a été développée avec succès *in vivo* en ayant recours à des impulsions électriques dont l'amplitude, la durée, le nombre et la fréquence sont spécialement modulés pour électroperméabiliser la membrane plasmique efficacement en garantissant la viabilité ainsi que l'intégrité cellulaire. La meilleure compréhension des paramètres essentiels impliqués lors de l'électroperméabilisation ainsi que l'introduction d'une instrumentation dédiée permettant de délivrer des impulsions électriques adaptées ont conduit aux premières applications médicales.

Applications cliniques

Une des principales applications thérapeutiques actuelle *in vivo* est l'électrochimiothérapie. Cette technique repose sur l'électroperméabilisation de la membrane plasmique pour favoriser la pénétration d'une drogue antitumorale comme la bléomycine [276]. Par ailleurs, une autre application est l'électrogénothérapie qui consiste à l'électrotransfert de gènes opéré *in vivo* au sein de divers tissus : le muscle, la peau, les tumeurs [277]. Les procédures d'électrotransfert de gènes *in vivo* utilisent des impulsions de forme carrée qui font migrer électrophorétiquement l'ADN dans les cellules des tissus cibles. La séquence d'impulsions délivrée lors de ces expériences est décisive. De courtes impulsions (μ s) de haut voltage agissent sur la perméabilisation membranaire alors que des impulsions longues (ms) de bas voltage assurent la migration électrophorétique de l'ADN [338, 339].

L'électroporation appliquée à la biologie du développement

En biologie de développement, l'accès à des séquences d'impulsions carrées [278, 280] a permis l'application de la technique d'électroperméabilisation à l'étude d'embryons. Bien que les termes d'électroperméabilisation ou d'électrotransfection soient plus appropriés au vue des connaissances actuelles, l'électroporation est le terme utilisé par les embryologistes pour désigner cette technique et c'est par ce terme que nous la nommerons par la suite.

Tout d'abord, l'électroporation a été implémentée chez l'embryon de poulet, modèle de choix pour l'étude de l'embryologie des vertébrés. Des plasmides et des ARN interférents ont ainsi été électroporés *in ovo*, et ce notamment dans le tube neural d'embryons au cours de leur 2^{ème} jour de développement, révélant la fonction et l'activité de certains gènes à ce stade précoce [289, 278]. Par la suite, la technique d'électroporation en tant que formidable outil de perturbation génétique localisée a été étendue avec succès aux autres organismes

modèles vertébrés tels que le xénope [293] et le poisson zèbre [283, 282]. Chez la souris, cette technique a été employée *in utero* [279] nécessitant le recours à des manipulations chirurgicales délicates mais aussi sur des embryons cultivés *in vitro* [296]. Les embryons de souris sont électroporés par l'intermédiaire de chambres d'électroporation [279, 286, 285] ou en utilisant des électrodes commerciales en forme de pinces [297]. Enfin, selon l'application et le tissu visé, certaines équipes ont développé leur propre matériel d'électroporation [295].

Cependant, cette approche puissante demeure difficile à implémenter pour des stades précoces d'embryons de souris. En effet, entre E5.0 et E7.0, les embryons sont longs de 125 à 900 μm et ont un diamètre compris entre 80 et 500 μm . Les équipements commerciaux actuels tels que les chambres d'électroporation ou les électrodes-pincettes, sont peu adaptés à ces tailles réduites et conduisent à des électroporations peu précises, peu prédictibles et peu reproductibles [297, 286, 295]. Enfin, la précocité des stades ciblés rend les embryons particulièrement vulnérables à toute perturbation environnementale. Dans ces conditions, le ciblage d'une sous population cellulaire d'un embryon de souris entre E5.0 et E7.0 demeure problématique.

Les solutions actuellement dédiées pour l'embryon de souris aux stades précoces Lorsque la morphologie de l'embryon le permet, il est possible de combiner les techniques de micro-injection et d'électroporation (Fig.1.6a). Il s'agit d'appliquer la solution d'acides nucléiques à proximité du tissu cible et de recourir à un champ électrique non localisé (Fig.1.6a). Après micro-injection d'acides nucléiques dans la cavité amniotique de l'embryon, les acides nucléiques migrent vers les cellules ciblées grâce à un champ électrique uniforme généré par une chambre d'électroporation composée de deux électrodes de 1 cm de largeur, espacées de 1 à 5 mm. Le champ électrique étant homogène, le choix de la zone électroporée se fait empiriquement en modifiant légèrement la position de l'embryon par rapport aux électrodes [286, 285].

L'autre alternative repose sur l'application d'un champ électrique localisé en jouant sur la position et la taille des électrodes afin de restreindre la zone de l'embryon soumise au champ électrique. L'embryon baigne alors dans une solution homogène d'acides nucléiques et afin de localiser les effets du champ électrique, il suffit de remplacer l'une des électrodes planes par un fil de tungstène et de placer, à l'aide d'un micro-manipulateur, l'embryon à proximité de cette électrode aiguille, les cellules ciblées lui faisant face [298] (Fig.1.6b). Par l'intermédiaire de cette méthode, des expériences de lignage sur des embryons E7.5 ont été effectuées et ont permis l'observation des déplacements de sous-populations de cellules transfectées par des plasmides codant pour une protéine fluorescente. Ces protéines sont exprimées dès 3 h après l'électroporation [295, 317, 318].

Toutefois, si le confinement du champ électrique est efficace pour transférer de manière ciblée des molécules exogènes au sein de cellules, cette stratégie peut s'avérer létale suivant la valeur du champ électrique appliqué [295]. En outre, lorsque le même protocole d'électroporation est appliqué à des embryons E6.5, leur survie est très compromise et seulement 2 à 12 cellules par embryon expriment la GFP [295].

Ces deux stratégies conduisent donc à des électroporations ciblées, mais sont malheureusement peu prédictibles, peu reproductibles et la mortalité est importante chez les embryons les plus jeunes [285, 286, 298, 295]. Les difficultés rencontrées avec l'électroporation localisée d'embryons précoces semblent dues, d'une part, à l'utilisation d'un matériel assez inadapté et d'autre part, à un manque de compréhension des phénomènes physico-chimiques entrant en jeu lors de l'application du champ électrique et de la pénétration des acides nucléiques dans les cellules. Ainsi, l'objectif de ce travail est de concevoir des outils tant technologiques que conceptuels qui permettront d'établir des protocoles d'électroporations prévisibles, reproductibles, quantitatifs et viables.

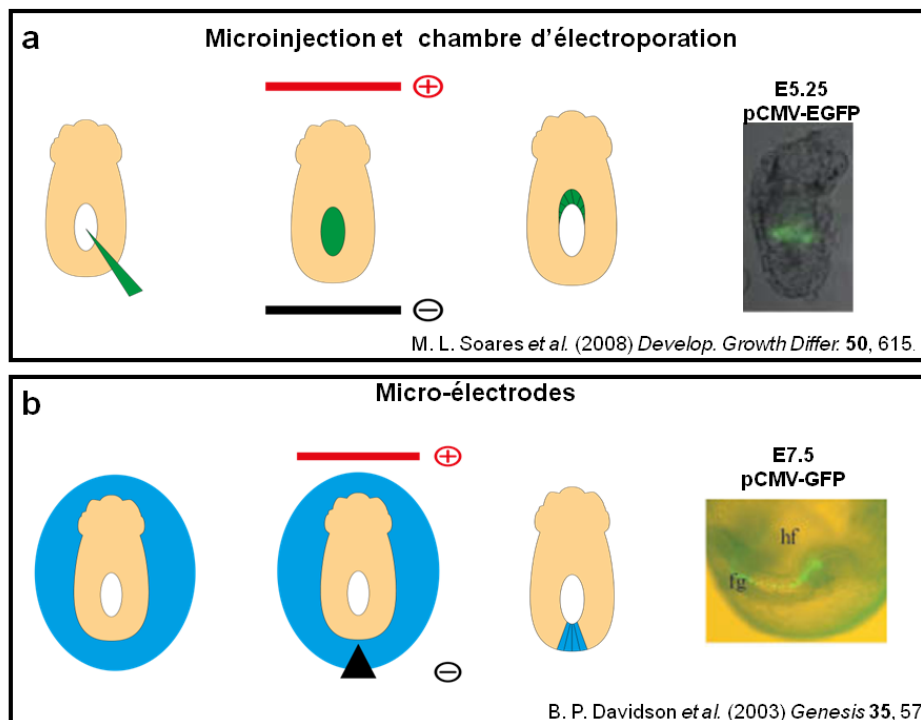


FIGURE 1.6 – Les différentes solutions implémentées pour la transgénèse localisée d'embryons de souris aux stades post-implantatoires. (a) La technique de micro-injection permet la localisation de la solution d'acides nucléiques et est combinée à l'application d'un champ électrique uniforme. (b) L'approche «microélectrodes» consiste à plonger l'embryon dans une solution homogène d'ADN et de localiser les effets du champ électrique grâce à une électrode-aiguille.

1.3 Méthodologie implémentée

Le micro-dispositif d'électroporation doit remplir un cahier des charges ambitieux, à savoir permettre des électroporations localisées, reproductibles et garantissant la survie et l'intégrité des cellules des embryons. En parallèle, nous avons développé un modèle physique relativement simple et robuste rendant compte des performances atteintes par les microsystèmes électriques et ce, pour des conditions de différence de potentiel et de forme des électrodes données. Ce modèle biophysique s'appuie notamment sur les résultats analytiques déjà publiés et sur des simulations par éléments finis. Ces modélisations indiquent les zones de l'embryon pour lesquelles, lors de l'application du champ électrique, le potentiel transmembranaire atteint la valeur critique nécessaire à la perméabilisation de la membrane. Enfin, il s'agit de tester expérimentalement les prédictions envisagées grâce à des marqueurs fluorescents *ad hoc*. Les résultats obtenus peuvent alors être utilisés pour à la fois améliorer le modèle physique et optimiser le design des micro-dispositifs. Ce processus d'optimisation par apports continus des différentes tâches sus-décrites se doit de pallier les difficultés de modélisation dûes au manque de données physico-chimiques ainsi qu'aux difficultés liées à la reproductibilité des expériences, parfois délicate à obtenir du fait de la variabilité intrinsèque induite par l'étude du vivant.

Chapitre 2

Résultats

2.1 Optimisation de la conception

2.1.1 Génération d'un champ électrique localisé adapté aux embryons à stade précoce

Aux stades visés, la petite taille des embryons implique qu'une expérience de modification génétique locale ne sera pertinente que si elle ne touche au maximum que 20 cellules, représentant une zone d'environ $60\text{ }\mu\text{m}$ de rayon. Le design des dispositifs requiert donc l'accès à une résolution spatiale de quelques microns. Nous nous sommes donc appuyés sur diverses technologies de microfabrication que nous avons optimisées afin d'assurer une totale biocompatibilité. A ce propos les protocoles de fabrication détaillés pour chacun des microsystèmes sont disponibles en Annexe 3. Enfin, l'excellente reproductibilité de ces procédés assure l'obtention d'une carte de champ électrique identique d'une expérience à l'autre.

2.1.2 Les microsystèmes successifs

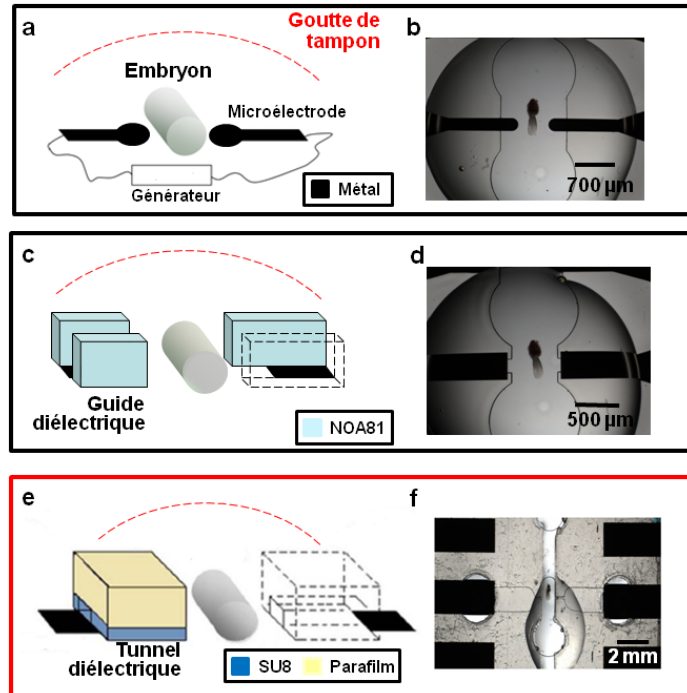


FIGURE 2.1 – Les différents microdispositifs électriques réalisés pour l'électroporation d'embryons de souris post-implantatoires. (a-b) Le microsystème de première génération. (c-d) Le microsystème de deuxième génération. (e-f) Le microsystème de troisième génération. Avec en (a), (c) et (e) des représentations schématiques en trois dimensions de chaque microdispositif, en (b), (d) et (f), des images à la loupe binoculaire des microsystèmes en cours d'expérience avec des embryons E6.5.

Première génération : microélectrodes

Le microsystème de première génération (Fig. 2.1a-b) comporte différentes paires de microélectrodes se terminant par des disques, d'un diamètre variant de 50 à 300 μm et d'écartement compris entre 200 et 1100 μm . En outre, des piscines isolantes destinées à recevoir la goutte de tampon contenant l'embryon sont intégrées au centre du microdispositif. La stratégie développée avec ce premier microdispositif s'est avérée efficace pour introduire des molécules exogènes au sein d'embryons post-implantatoires. Cependant, le recours aux microélectrodes est inadéquat quant à la localisation de la transfection. De plus, une telle stratégie compromet la survie cellulaire et même la reproductibilité de l'expérience.

En fait, les résultats expérimentaux et ceux issus de simulations recueillis avec ce type de dispositif montrent qu'une précision maximale du ciblage est atteinte en réduisant le plus possible la taille et l'écartement des électrodes. Technologiquement, l'obtention de motifs de taille inférieure à 10 μm est une étape limitante du fait des méthodes de lithographie optique utilisées pour produire les microélectrodes. Bien plus, en diminuant l'écartement des électrodes, la proximité embryon-électrode augmente, et par là même, le risque de nécrose en cas de contact fortuit entre le tissu embryonnaire et le métal.

Dès lors, les électroporations doivent être entreprises en utilisant des paires d'électrodes présentant des écartements plus importants induisant des zones perméabilisées plus larges (de l'ordre de la centaine de micromètres) et provoquant encore de nombreux cas de mortalité cellulaire. En outre, l'électrochimie libère à proximité des électrodes des espèces chimiques réactives produisant un changement de pH localisé [346]. Ceci induit une variabilité importante des conditions appliquées lors de l'électroporation et peut aussi avoir des conséquences néfastes sur la viabilité cellulaire [311].

Deuxième génération : guides

Une deuxième génération de dispositif propose une localisation optimisée de la zone perméabilisée tout en garantissant la viabilité cellulaire. Des modélisations ont suggéré une approche reposant sur l'intégration sur les électrodes d'un canal diélectrique de largeur égale à la zone «cible» de l'embryon. Le champ électrique est guidé sans dispersion latérale vers le tissu à électroporer ce qui provoque une déstabilisation localisée de la membrane des cellules externes de l'embryon (Fig. 2.1c). De plus, la présence du guide empêche tout contact entre l'embryon et l'électrode améliorant grandement la survie cellulaire.

Ce microsystème comprend donc des guides fabriqués en résine isolante de quelques dizaines de micromètres de largeur (entre 20 μm et 100 μm) (Fig.2.1d). Des piscines profondes (80 μm) adaptées à la taille des embryons sont intégrées au niveau du centre du microdispositif. Les embryons sont ainsi stockés sur le microdispositif en attente d'être électroporés ce qui facilite grandement le travail de l'expérimentateur.

Des expériences menées avec ce microsystème ont montré l'efficacité des guides diélectriques. D'une part, le champ étant plus directionnel, les électrodes utilisées possèdent des rayons plus importants et sont donc technologiquement plus faciles à obtenir. D'autre part, ce guidage du champ permet une localisation précise de la zone électroporée de l'embryon. Enfin, le champ électrique ne se dispersant pas, les embryons peuvent être placés loin des électrodes, évitant toute interaction fatale pour ces derniers.

Toutefois, pour cette stratégie, les réactions électrochimiques restent problé-

matiques. En cours d'expérience, il y a génération de bulles qui peuvent être piégées dans les guides diélectriques ce qui conduit à des électroporations peu reproductibles. Bien plus, dans certains cas, les canaux de résine isolante agissent comme de véritables accélérateurs de bulles qui sont propulsées vers l'embryon impactant directement sur la survie cellulaire.

Troisième génération : tunnels

La garantie de la survie des cellules de l'embryon étant cruciale et ne pouvant pas nous affranchir des conséquences de l'électrochimie, une solution est de déplacer les électrodes au plus loin de l'embryon. Afin de localiser les effets du champ électrique, la troisième génération de micro-dispositifs intègre des tunnels diélectriques d'une largeur comprise entre $40\ \mu\text{m}$ et $60\ \mu\text{m}$ et d'une hauteur variant de $60\ \mu\text{m}$ à $110\ \mu\text{m}$ (Fig. 2.1e-f). Ces structures permettent de confiner et de guider le champ électrique généré au niveau des électrodes vers l'embryon. De plus, ces tunnels permettent d'immobiliser les embryons prévenant tout mouvement de ces derniers lors de l'application des impulsions électriques.

En déterminant, de manière empirique et théorique, les conditions électriques optimales, nous avons ainsi produit, grâce à notre microsystème de troisième génération, des électroporations localisées, reproductibles et compatibles avec la survie de l'embryon. Pour élaborer de tels microsystèmes, nous avons eu recours à des matériaux optimisés pour permettre l'assemblage de structures en 3 dimensions à l'échelle micrométrique .

2.1.3 Les divers matériaux employés

Polymères hydrophobes

Nous employons des techniques reposant sur l'assemblage de polymères. Exposés à un rayonnement ultra-violet, ces polymères se structurent ce qui permet d'atteindre les motifs désirés, à l'échelle micrométrique.

Plus exactement, nous utilisons une résine epoxy photosensible appelée SU-8 (Microchem). Elle est connue pour avoir une excellente résistance aux produits chimiques (acide et basique), être translucide et biocompatible [325, 326, 327]. Cependant, lorsque les structures fabriquées sont 5 fois plus hautes que larges, l'utilisation de la SU-8 est délicate et aboutit à des résultats peu reproductibles. En outre, en employant par exemple une technique de laminage, la SU-8 peut former des structures multi-niveaux par collage d'une couche SU-8 sur une autre [329]. Toutefois, cette méthode produit des films «secs» de SU-8 et il est très difficile de coller ces films sur un substrat dur comme une lame de verre ce qui limite considérablement leur intérêt .

Une alternative est l'utilisation d'un polymère photoréticulable, la NOA81 (Northland Optical Adhesive). En effet, une fois réticulée sous rayonnement ultra-violet, cette colle produit des «micro-stickers» transparents qui peuvent être assemblés pour former des structures en 3 dimensions [86]. L'élaboration de tels «micro-stickers» trouvent des applications en biologie et notamment pour former des canaux de culture de neurones [328]. Un simple traitement thermique après réticulation de la NOA est nécessaire pour obtenir des structures biocompatibles pour accueillir des embryons de souris précoces (Fig.2.2). En revanche, des motifs avec des formes complexes sont difficilement obtenus avec cette technique.

Pour pallier ce problème, nous avons donc choisi d'employer du parafilm (Pechiney). En effet, ce matériau est très malléable, transparent et biocompatible étant un matériel de base dans un laboratoire de biologie. De plus, il a l'avantage de coller très facilement sur des surfaces de natures différentes : verre, silicium ou SU-8.

Toutefois, ces trois polymères une fois structurés sont hydrophobes. Il faut par conséquent procéder à une modification de leur état de surface afin qu'ils deviennent hydrophiles. Cette action peut être effectuée par exemple grâce à un traitement plasma [330]. Cependant, cette modification d'état de surface n'est que temporaire. Les micro-dispositifs ont donc une durée d'utilisation comprise entre 24 et 48 h. De plus, ce procédé étant effectué avant le montage du couvercle de parafilm, les dispositifs sont non recyclables.

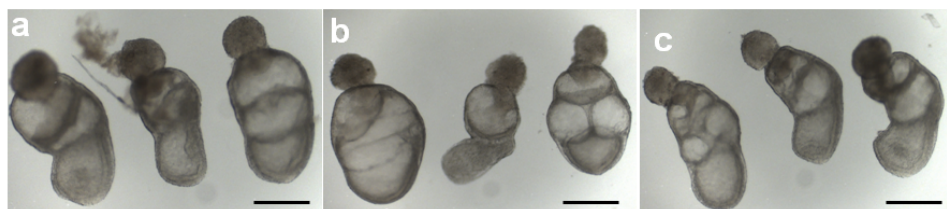


FIGURE 2.2 – Test de biocompatibilité de la colle photoréticulable NOA81. (a) Embryons contrôle. (b) Embryons en culture avec de la NOA81 réticulée (4 à 5 gouttes de 2 μL). (c) Embryons en culture avec de la NOA81 réticulée traitée thermiquement (4 à 5 gouttes de 2 μL). Les embryons sont placés 24 h dans un milieu de culture contenant du DMEM complétement au GlutaMAX, de la streptomycine à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et de la pénicilline à 100 U. mL^{-1} (antibiotiques antibactériens), ainsi que 75 % de sérum de rat inactivé. Barres d'échelle égales à 300 μm .

Verre

Afin de produire un prototype réutilisable, nous avons travaillé à la réalisation de motifs en verre. Notre choix s'est porté sur ce matériau du fait de son caractère très hydrophile. Cependant, une telle réalisation demande des méthodes de fabrication et des savoir-faire auxquels nous n'avons pas accès. La limitation

majeure se trouve dans la fermeture des tunnels, le collage étanche d’une couche de verre sur une autre restant technique à mettre en œuvre (Fig. 2.3a). Outre l’aspect non étanche de notre collage (qui pourra être amélioré), l’épaisseur des deux couches de verre assemblées (≈ 1 mm) pose problème. En effet, cela produit une chambre d’électroporation profonde impliquant une manipulation délicate des embryons de souris au cours des expériences (Fig. 2.3b).

Pour lever une partie de ces limitations, nous avons décidé d’utiliser une couche de parafilm pour sceller les tunnels gravés dans le verre. Des résultats préliminaires ont montré que ce nouveau dispositif présentait des performances identiques que ceux réalisés en polymères hydrophobes. Ils permettent en effet d’atteindre des électroporations localisées, efficaces pour la transfection de plasmides et caractérisées par une viabilité cellulaire satisfaisante. Comme attendu, ils ont en plus l’avantage d’être réutilisables d’une expérience à l’autre après une simple étape de nettoyage (cf. 2.4).

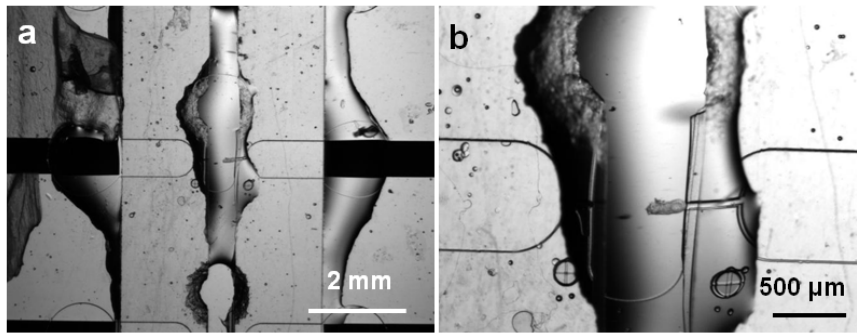


FIGURE 2.3 – Images à la loupe sous divers grossissements du microsystème «verre». (a) Vue globale. (b) Vue de la chambre d’électroporation.

2.2 Optimisation du design

2.2.1 Modèle électrique utilisé et indicateur de performances

Au cours du processus de conception de nos microsystèmes, l’évaluation prédictive de leurs performances lors des électroporations est une tâche cruciale. Une modélisation pertinente repose sur la compréhension des mécanismes impliqués lors de la perméabilisation de la membrane afin de déterminer les paramètres essentiels à l’obtention d’une électroporation efficace. Devant la variabilité de théories (cf. Paragraphe «Des hypothèses avancées» de la section 1.2.1), nous avons choisi d’établir la prédictibilité de la transfection en évaluant le potentiel transmembranaire induit sur le contour de l’embryon. Pour construire

notre modèle électrique, nous nous sommes donc largement inspirés des travaux issus de la communauté de biologistes qui ont étudié la transfection de cellules isolées (cf. Section 1.2.2).

Peu d'informations sont disponibles pour modéliser les propriétés électriques au sein de tissus embryonnaires et la modélisation des amas pluricellulaires est extrêmement complexe [312]. La construction d'un modèle exige de formuler quelques hypothèses quant à l'embryon. A ce titre, l'étude du développement précoce de la souris apporte une certaine connaissance quant aux caractéristiques morphologiques et physiologiques des embryons d'intérêt (Section 1.1.3). Aux stades visés, ces derniers sont décrits comme des cylindres formés par des tissus de type épithélial concentriques. En outre, la résistance élevée des bicouches phospholipidiques du feuillet formant les cellules externes de l'embryon «écran» l'intérieur de l'organisme [313]. Les embryons peuvent donc être considérés en première approximation comme des cellules géantes de forme ellipsoïdale qui sont entourées par une membrane isolante unique.

Dans ces conditions, l'application d'un champ électrique va induire une redistribution de charges au niveau de la surface membranaire produisant une différence de potentiel transmembranaire sur le contour de l'embryon. La membrane «géante» des embryons est altérée par des défauts ponctuels ce qui la rend perméable lorsqu'une valeur seuil de potentiel transmembranaire comprise entre 0,2 V et 1 V est atteinte.

2.2.2 Simulations numériques

L'électro-neutralité étant conservée en chaque point du tampon conducteur d'électroporation, le potentiel électrique produit par les électrodes dans la chambre d'électroporation est modélisé en résolvant l'équation de Laplace : $\Delta V = 0$, le champ électrique E étant lié à V par la relation $E = -\nabla V$. Afin de résoudre l'équation de Laplace, nous avons eu recours aux simulations par éléments finis par l'intermédiaire du programme Comsol Multiphysics.

Les données prédictives issues des modélisations des microsystèmes électriques constituent un excellent cadre formel comparatif des performances électriques de nos microsystèmes et même de systèmes d'électroporation existants (cf. 2.4). Mais surtout, elles sont indispensables pour converger vers une fabrication de dispositifs produisant des électroporations localisées. Enfin, en confrontant les résultats issus de ces modélisations à ceux obtenus expérimentalement, des informations intéressantes pourraient être recueillies, notamment quant à la valeur caractéristique de potentiel transmembranaire perméabilisant les cellules du feuillet externe d'embryons de souris .

Comparaison des stratégies microélectrodes et guides/tunnels diélectriques

En reproduisant en deux dimensions la géométrie des divers dispositifs, ces méthodes nous permettent d'évaluer leurs performances. Plus précisément, l'obtention du potentiel transmembranaire atteint sur le contour de l'embryon nous permet de comparer la taille des zones perméabilisées par nos différents micro-systèmes. Ceci nous a permis de montrer l'efficacité des guides dans le confinement du champ électrique et le ciblage de la zone à électroporer (Fig.2.4).

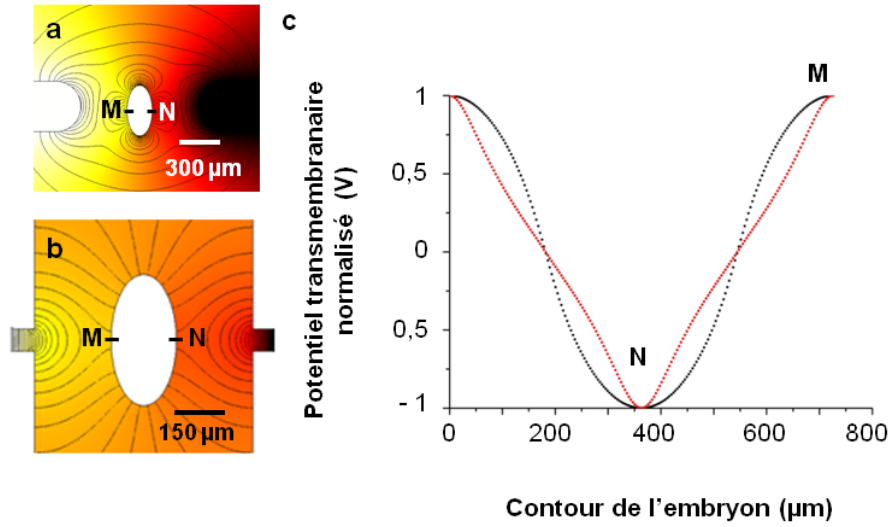


FIGURE 2.4 – Simulations effectuées dans l'environnement Comsol en deux dimensions des divers microdispositifs électriques réalisés. (a) Le microsystème de première génération. (b) Les microsystèmes comprenant des guides diélectriques (deuxième et troisième génération). (c) Comparaison des potentiels transmembranaires induits sur le contour de l'embryon en fixant aux bornes des électrodes des dispositifs des conditions électriques identiques. Les résultats obtenus avec le modèle du premier microdispositif sont représentés par des carrés noirs, ceux des microdispositifs de deuxième et de troisième génération par des carrés rouges.

Microsystèmes de troisième génération

Une fois la pertinence des microdispositifs intégrant des guides ou des tunnels diélectriques démontrée, des modélisations du microsystème de troisième génération en trois dimensions ont été réalisées. Ces modèles en 3D dimensions nous ont permis de mener trois types d'analyses.

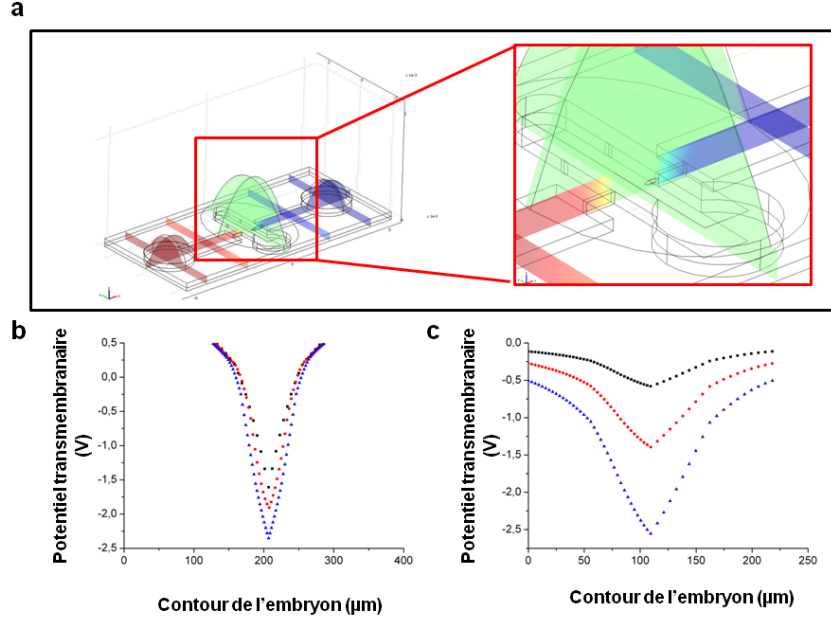


FIGURE 2.5 – Simulations effectuées dans l'environnement Comsol en trois dimensions du microsystème de troisième génération pour l'électroporation d'un embryon E5.5. (a) Différentes vues du modèle 3D au sein de l'environnement Comsol. (b) Comparaison des différents profils de potentiel transmembranaire induit sur des embryons E5.5 de taille distincte en fixant la tension électrique à 40 V aux bornes des électrodes. La courbe composée de carrés noirs représente le potentiel transmembranaire atteint sur le contour d'un embryon E5.5 de grande taille dont le demi grand axe est égal à $200 \mu\text{m}$ et le demi petit axe est égal à $45 \mu\text{m}$, la courbe composée de triangles bleus celui d'un embryon E5.5 de taille moyenne dont le demi grand axe est égal à $100 \mu\text{m}$ et le demi petit axe est égal à $30 \mu\text{m}$ et la courbe composée de ronds rouges celui d'un embryon E5.5 de petite taille dont le demi grand axe est égal à $75 \mu\text{m}$ le demi petit axe est égal à $20 \mu\text{m}$. (c) Comparaison des différents profils de potentiel transmembranaire induit sur des embryons E5.5 à différents voltages, la courbe représentée par des carrés noirs correspond à une tension électrique égale à 10 V imposée au niveau des électrodes, la courbe avec des ronds rouges correspond à une tension électrique égale à 20 V imposée au niveau des électrodes et la courbe avec des triangles bleus correspond à une tension électrique égale à 40 V imposée au niveau des électrodes.

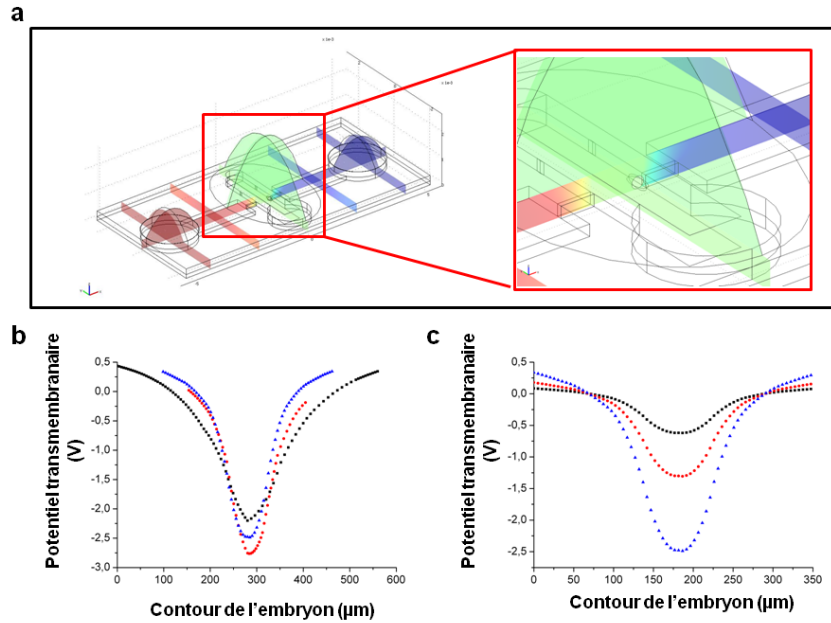


FIGURE 2.6 – Simulations effectuées dans l’environnement Comsol en trois dimensions du microsysteme de troisième génération pour l’électroporation d’un embryon E6.5. (a) Différentes vues du modèle 3D au sein de l’environnement Comsol. (b) Comparaison des différents profils de potentiel transmembranaire induit sur des embryons à E6.5 de taille distincte en fixant la tension électrique à 40 V aux bornes des électrodes. La courbe composée de carrés noirs représente le potentiel transmembranaire atteint sur le contour d’un embryon à E6.5 de grande taille dont le demi grand axe est égal à 250 μm et le demi petit axe est égal à 90 μm , la courbe composée de ronds rouges celui d’un embryon E6.5 de taille moyenne dont le demi grand axe est égal à 150 μm et le demi petit axe est égal à 75 μm et la courbe composée de triangles bleus celui d’un embryon E6.5 de petite taille dont le demi grand axe est égal à 100 μm le demi petit axe est égal à 60 μm . (c) Comparaison des différents profils de potentiel transmembranaire induit sur des embryons E6.5 à différents voltages, la courbe représentée par des carrés noirs correspond à une tension électrique égale à 10 V imposée au niveau des électrodes, la courbe avec des ronds rouges correspond à une tension électrique égale à 20 V imposée au niveau des électrodes et la courbe avec des triangles bleus correspond à une tension électrique égale à 40 V imposée au niveau des électrodes.

Nous avons partiellement convergé quant aux dimensions appropriées de guides adaptés à la morphologie des embryons aux stades post-implantatoires. En faisant varier la taille des embryons à l’entrée du tunnel diélectrique du microdispositif, nous avons pu obtenir des informations pertinentes (Fig.2.5b et Fig.2.6b) quant aux dimensions optimales à imposer afin d’obtenir une zone perméabilisée restreinte à environ 60 μm .

De la même manière, les modélisations 3D ont permis d’estimer la gamme de valeurs de tension électrique applicable afin d’obtenir des électroporations générant un potentiel transmembranaire adapté sur les zones ciblées (Fig.2.5c et Fig.2.6c).

En revanche, il est nécessaire d'indiquer que ces données recueillies par simulations 3D ont un caractère uniquement prédictif : la validation finale quant aux dimensions des microdispositifs et aux conditions électriques optimales est principalement conduite au cours des électroporations.

En outre, ce type de simulations 3D permet de formellement comparer les performances de ciblage du dispositif de troisième génération par rapport à d'autres systèmes utilisés pour l'électroporation d'embryons de souris aux stades post-implantatoires (cf. 2.4).

Enfin, la confrontation de l'étendue des zones perméabilisées obtenues expérimentalement à celles prédites par le modèle 3D du microsystème de troisième génération confirme que l'électroporation du feuillet cellulaire extérieur de l'embryon est conditionnée par une valeur seuil de potentiel transmembranaire. Plus exactement, à partir d'expériences d'électroporations effectuées grâce à un marqueur Dextran marqué à la fluorescéine de poids moléculaire égal à 4 kDa (Dextran-FITC) rapportant les zones perméabilisées par le microsystème de troisième génération, nous avons mesuré les rapports entre longueur de zone électroporée et longueur totale de l'embryon (Tab.2.1). Ceci a été effectué pour deux conditions électriques distinctes : 20 V et 15 V (Tab.2.1).

TABLE 2.1 – Longueur de zone électroporée rapportée à la longueur de l'embryon (exprimée en %) en fonction de l'intensité des impulsions électriques appliquées et du stade de l'embryon. n indique le nombre d'embryons pour lequel la mesure a été effectuée.

	20 V	15 V
E6.5	11%	8%
	n=10	n=18
E5.5	13,5%	13%
	n=6	n=6

Nous avons alors reporté les valeurs de rapports moyens expérimentalement obtenus sur les profils prédictifs issus de nos modèles électriques respectivement pour des embryons E6.5 (Fig. 2.7a) et E5.5 (Fig. 2.7b). Nous avons ainsi relevé une valeur égale à environ 500 mV pour le potentiel transmembranaire requis pour rendre perméable les membranes de cellules de l'endoderme viscéral d'embryons de souris (Fig. 2.7). Cette valeur est bien cohérente avec les valeurs seuils de potentiel transmembranaire comprises entre 200 mV et 1000 mV relevées pour la plupart des membranes biologiques.

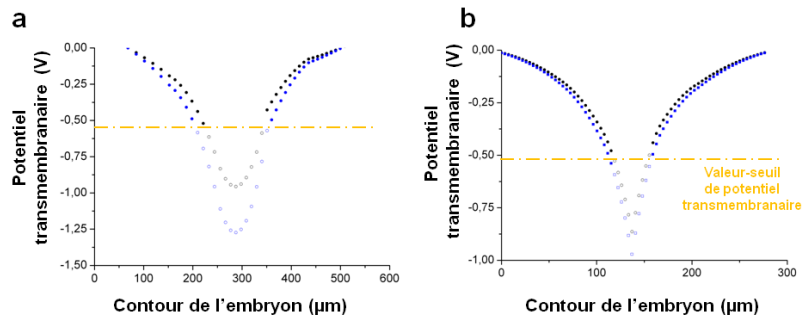


FIGURE 2.7 – Profils prédictifs issus de simulations 3D du dispositif de troisième génération (cercles pleins). Sur ces profils, les zones moyennes perméabilisées produites expérimentalement (cf. Tab.2.1) par ce même microsystème ont été reportées (cercles vides) afin d'estimer la valeur seuil de potentiel transmembranaire à atteindre pour électroporer les cellules de l'endoderme viscéral d'embryons de souris entre E5.0 et E7.0 (ligne orange tracée en pointillée). Cette opération a été effectuée pour deux valeurs de potentiels électriques imposées aux électrodes. Les courbes de couleur bleue figurent une différence de potentiel fixée à 20 V et celles de couleur noire, égale à 15 V. (a) Résultats obtenus pour des embryons aux stades E6.5. (b) Résultats obtenus pour des embryons aux stades E5.5.

2.3 Optimisation des protocoles

2.3.1 Utilisation de marqueurs fluorescents

Il s'agit de visualiser les zones perméabilisées par nos microsystèmes ainsi que de tester les prédictions envisagées par le modèle électrique.

ADN marqués

L'efficacité et la localisation de l'électroporation sont souvent testées en transfectant un plasmide portant un gène codant pour une protéine fluorescente puis en imageant la concentration de cette dernière. Cependant, il s'écoule généralement 3 à 6 h entre la pénétration des acides nucléiques dans l'embryon et la synthèse en quantité suffisante de protéines fluorescentes [318] : toute information sur la localisation initiale des cellules transfectées est alors perdue. Cet intervalle de temps rend donc difficile le ciblage spécifique requis pour les expériences de lignage. De plus, la localisation précise du phénomène d'électroporation, nécessaire à l'établissement et à la validation de notre modèle physique, devient impossible. En conséquence, il est nécessaire d'avoir recours à des marqueurs fluorescents informatifs dès le temps $t = 0$.

Nous avons choisi, dans un premier temps, de co-électroporer le plasmide d'intérêt avec de courts fragments d'ADN fluorescents produits par PCR (Polymerase Chain Reaction). Plus exactement, la matrice utilisée pour la duplication est de l'ADN de phage λ , un substrat assez générique en biophysique. La portion d'ADN à recopier est définie par des amorces que nous sélectionnons afin d'obtenir des brins de 438 paires de bases. L'ADN est synthétisé à l'aide des quatre bases classiques auxquelles on ajoute de l'uracile marquée avec un fluorophore (par exemple l'alexa488 ou la tétraméthylrhodamine). Des informations détaillées quant à ces constructions sont disponibles en [353]. Les produits issus de la PCR sont ensuite purifiés afin d'éliminer les surplus d'amorces et de bases. Toutefois, l'efficacité de ces marqueurs à $t = 0$ est peu convaincante. Ils sont en effet peu ou pas incorporés par les cellules de l'embryon et la faiblesse du signal fluorescent ne permet pas de déterminer explicitement la zone par laquelle ils ont pénétré (Fig.2.8).

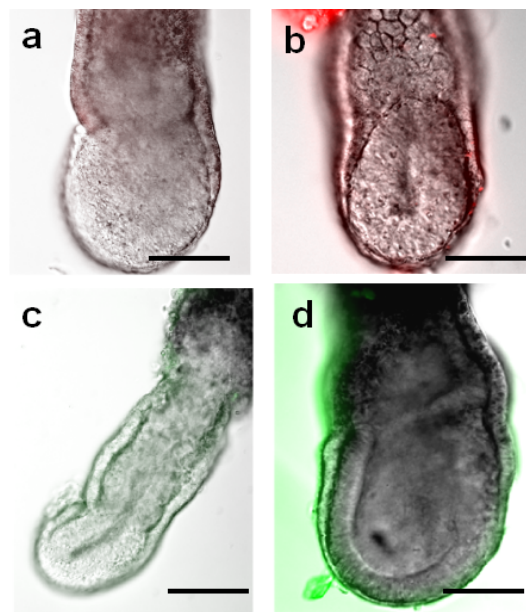


FIGURE 2.8 – Embryons E6.5 électroporés par un microsystème de première génération à $t = 0$. (a-b) Dans une solution d'ADN marqué à la tétraméthyl-rhodamine à $100 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$. Avec, comme conditions électriques (a) 30 V, 3 pulses, 10 ms, séparés d'1 seconde et (b) 25 V, 6 pulses, 10 ms, séparés d'1 seconde. (c-d) Au sein d'une solution d'ADN marqué à l'alexa488 à $100 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$. Avec, pour conditions électriques (c) 45V, 3 pulses, 10 ms, espacés d'1 seconde et (d) 25 V, 3 pulses, 10 ms, espacés d'1 seconde. Barres d'échelle égales à $100 \mu\text{m}$.

En revanche, une technique qui repose sur le marquage de plasmides avec un fluorophore tel que la fluorescéine ou la cyanine, par l'intermédiaire de kits commerciaux (kit LabelIT), a prouvé son efficacité au sein de cellules [340]. Nous nous sommes alors concentrés sur cette méthode. Nous avons ainsi pu obtenir la cartographie des cellules de l'embryon de souris qui ont internalisé le plasmide dès le temps $t = 0$ (cf. 2.4). La limitation principale de telles expériences réside cependant dans leur coût (≈ 50 euros pour une série de trois embryons).

Dextrans

Pour déterminer la localisation des zones où le potentiel transmembranaire est supérieur au seuil d'électroporation, nous avons donc utilisé des solutions de Dextrans marqués à la fluorescéine. En effet, ces derniers permettent de révéler l'existence des pores en venant teindre le cytoplasme des cellules électroporées[319]. Ils renseignent ainsi quant aux prédictions fournies par nos modèles. L'analyse des embryons électroporés est faite par des approches classiques, en épifluorescence plein champ et notamment par vidéo-microscopie.

2.3.2 Recherche de conditions électriques satisfaisantes

Définir un protocole permettant d'atteindre des électroporations efficaces et viables pour des embryons de souris repose sur l'application d'une séquence d'impulsions optimisées. La séquence d'impulsions imposée consiste en un compromis délicat entre perméabilisation de la zone cible et préservation de l'intégrité des cellules visées. Comme déjà évoqué dans le paragraphe 1.2.2, plusieurs facteurs souvent corrélés sont à considérer (champ électrique/potentiel transmembranaire induit ou encore durée des impulsions/nombre d'impulsions) ce qui ne permet pas une lecture facile et intuitive des résultats.

S'il nous semble indispensable d'acquérir expérimentalement une certaine compréhension des effets de l'application d'un champ électrique, certains travaux [286, 285, 295] nous orientent vers des conditions électriques à utiliser. Il s'agit d'impulsions de forme carrée, d'une durée de quelques millisecondes, dont le nombre varie entre 1 et 10, et espacées d'une seconde. Nous présentons ci-dessous les expériences préliminaires ayant exploré diverses séquences d'impulsions avec des solutions de Dextrans marqués à la fluorescéine.

Microsystème de première génération

Le Tableau 2.2 récapitule l'ensemble des conditions appliquées lors des électroporations en vue d'extraire les valeurs de paramètres les plus appropriées. Les séquences optimales appliquent des impulsions de 20 V d'une durée de 10 ms espacées d'une seconde. Pour les embryons de grande taille, 6 impulsions sont

TABLE 2.2 – Ensemble des conditions tests appliquées avec le dispositif de première génération en utilisant la paire d'électrodes de $300\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre et écartées de 1 mm .

Tension appliquée (en V)	Nombre de pulses	Durée des pulses (en ms)	Nombre d'embryons électroporés	Fluorescence	Décollements cellulaires
45	3	10	6	+	+
40	3	10	3	+	+
35	3	10	3	+	+
30	3	10	9	+	+
25	3	10	12	+	+
20	3	10	3	+	-
20	6	10	3	+	-
15	3	10	3	-	-
15	6	10	3	+/-	-

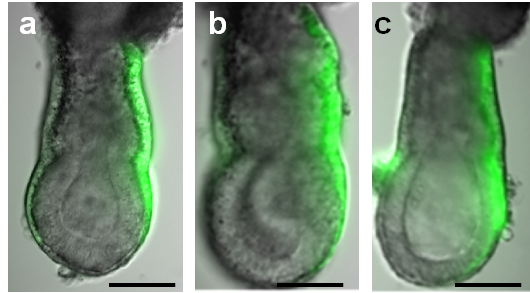


FIGURE 2.9 – Embryons E6.5 électroporés avec une solution de Dextran FD4 à 2 mg.mL^{-1} par le microsystème de première génération. Images réalisées à $t = 0$ au vidéo-microscope. La séquence d'impulsions imposée est (a) 20 V , 6 pulses de 10 ms espacés d'une seconde, (b) 25 V , 3 pulses de 10 ms espacés d'une seconde et (c) 30 V , 3 pulses de 10 ms espacés d'une seconde. Barres d'échelles égales à $100\text{ }\mu\text{m}$.

nécessaires alors que pour les embryons de petite taille, 3 impulsions suffisent (Fig.2.9).

Ces résultats montrent toutefois que les microélectrodes ne permettent pas une localisation précise de la zone électroporée de l'embryon.

Microsystème de deuxième génération

Les connaissances expérimentales acquises grâce au microsystème de première génération appuyées par les recommandations issues des simulations effectuées par le logiciel Comsol nous montrent qu'il est nécessaire d'accéder à des électroporations plus localisées. Nous avons donc par la suite procédé à la caractérisation des électrodes du microsystème de deuxième génération.

Le récapitulatif des conditions appliquées lors des tests est exposé sur le Tableau 2.3. Plus exactement, nous avons travaillé à la caractérisation des électrodes présentant un écartement égal à 700 μm . Quant aux guides, ils sont distants d'une longueur égale à 350 μm et ils ont une largeur de 35 μm .

TABLE 2.3 – Ensemble des conditions tests appliquées avec le microsystème de deuxième génération. La paire d'électrodes caractérisée présente un écartement bord à bord égal à 700 μm . Les guides sont écartés de 350 μm bord à bord et ont une largeur égale à 35 μm .

Tension appliquée (en V)	Nombre de pulses	Durée des pulses (en ms)	Nombre d'embryons électroporés	Fluorescence	Décollements cellulaires
25	3	10	3	+	+
20	3	10	3	+	+
15	6	10	3	+	+
15	3	10	3	+	+
10	6	10	3	+	+
10	3	10	3	+	+/-
10	3	50	3	+	+/-

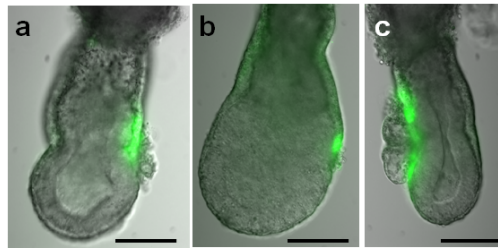


FIGURE 2.10 – Embryons E6.5 électroporés avec une solution de Dextran FD4 à 2mg.mL⁻¹ par le microsystème de deuxième génération. Images réalisées à $t = 0$ au vidéo-microscope. La séquence d'impulsions imposée est (a) 15 V, 3 pulses de 10 ms espacés d'une seconde, (b) 10 V, 3 pulses de 10 ms espacés d'une seconde et (c) 25 V, 3 pulses de 10 ms espacés d'une seconde. Barres d'échelle égales à 100 μm .

Par rapport au microsystème de première génération, les amplitudes des signaux électriques appliquées sont bien moins importantes, le champ électrique étant ici concentré par les guides. Ainsi, pour ce type de microdispositifs, les conditions électriques optimales qui permettent d'atteindre des électroporations efficaces et garantissant l'intégrité des cellules cibles correspondent à des séquences de 3 impulsions d'une intensité égale à 10 V et d'une durée de 10 ms, espacées d'une seconde (Tab. 2.3 et Fig. 2.10).

Microsystème de troisième génération

Une fois l'efficacité des guides du microsystème de deuxième génération validée, nous avons recherché la gamme de conditions électriques conduisant à des électroporations efficaces pour le microsystème de troisième génération intégrant des tunnels. De plus, nous avons eu recours à des marqueurs (iodure de propidium) rendant compte du maintien de l'intégrité cellulaire en cours d'expérience afin d'atteindre des électroporations viables. Les séquences sélectionnées sont alors validées par la transfection de plasmides codant pour une protéine fluorescente qui démontrent simultanément l'efficacité et la viabilité de l'électroporation (cf. Section 2.4).

En s'appuyant sur un processus d'optimisations continues intégrant les résultats fournis par les simulations et les expériences biologiques, nous avons créé un dispositif produisant des électroporations ciblées, reproductibles et viables pour des embryons de souris aux stades post-implantatoires. En outre, ce processus itératif nous a permis de relever empiriquement l'influence de deux paramètres majeurs au cours des expériences (Fig. 2.11) :

- (i) le paramètre «électrique» qui dépend de la séquence générée par le générateur d'impulsions
- (ii) le paramètre «physique» qui dépend des dimensions du microsystème d'électroporation

	Validation modèle 3D	Sens de la variation	Paramètres "électriques"	
			Etendue des zones électroporées des embryons	Aspect des zones électroporées à t_0
Voltage/ Courant	✓	↗	+	—
Durée du pulse	✓	↗	+	—
Nombre de pulses	✓	↗	=	=/—
	Validation modèle 3D	Sens de la variation	Paramètres "dispositif"	
			Etendue des zones électroporées des embryons	Aspect des zones électroporées à t_0
Largeur du canal	✓	↗	+	—
Hauteur du canal	✓	↗	+	—
Distance tunnel- embryon	✓	↗	—	+

FIGURE 2.11 – Evolution empirique de la contribution des différents paramètres décisifs au cours d'une électroporation. Deux facteurs fondamentaux sont relevés : d'une part, la longueur de la zone ciblée lors de l'électroporation et d'autre part, la conservation de l'intégrité cellulaire des zones ciblées après électroporation. Selon l'évolution de divers paramètres, le symbole «+» indique une augmentation du facteur de contrôle alors que le signe «-» signale une diminution du phénomène. Le signe «=» signifie que le paramètre n'influe à priori pas expérimentalement sur le facteur considéré. La virgule verte indique la concordance entre résultats expérimentaux et résultats prédits par les simulations par éléments finis.

2.4 A new microsystem for efficient and reproducible local electroporation of early post-implantation mouse embryos

Pour soumission à *Development*

Résumé de la méthodologie implémentée

Nous avons développé un microdispositif électrique intégrant des tunnels diélectriques qui permet d'atteindre des électroporations localisées, reproductibles et garantissant la survie et l'intégrité des cellules des embryons aux stades post-implantatoires précoces. Nous comparons, dans un premier temps, à l'aide d'un modèle électrique issu de simulations par éléments finis, les performances de notre microsystème électrique par rapport à celles atteintes par les méthodes actuellement proposées pour l'électroporation d'embryons aux mêmes stades.

Les résultats de ces simulations étant concluants, nous avons ensuite caractérisé selon diverses séquences électriques et grâce à différents marqueurs (solution de Dextrans marqués à la fluorescéine, Iodure de Propidium, ADN marqués en fluorescence) la taille des zones électroporées expérimentalement par notre micro-dispositif ainsi que la conservation de l'intégrité cellulaire des zones ciblées. Cette opération a été effectuée pour deux tissus distincts (Endoderme viscéral distal et respectivement endoderme viscéral antérieur) à deux stades de développement (E5.5 et respectivement E6.5). De plus, afin d'illustrer les diverses possibilités offertes par notre micro-dispositif en terme d'applications, nous avons procédé à des expériences de modifications génétiques ciblant divers tissus cellulaires. Plus précisément, nous avons électroporé, grâce à des solutions de Dextrans marqués ou des solutions de plasmides codant pour une protéine fluorescente, le trophoctoderme mural ou polaire d'embryons de souris à E3.5 ou encore des explants pulmonaires d'embryons de souris à E11.5.

Puis, nous avons réalisé des expériences d'électroporation de plasmides codant pour une protéine fluorescente suivies par des techniques d'imagerie *in vivo* visant des cellules de l'endoderme viscéral d'embryons de souris à E5.0. Ceci nous a plus particulièrement permis d'imager le devenir de seulement quelques cellules (4 à 5) de cette sous-population particulière, démontrant que notre méthode renseigne quant à des mécanismes biologiques fins inatteignables par d'autres voies.

Enfin, nous avons travaillé à l'optimisation des matériaux composant notre système d'électroporation afin qu'il soit plus largement diffusable et utilisable par le plus grand nombre d'embryologistes.

Ma contribution aux résultats présentés dans cet article

Pour cet article, j'ai conçu et fabriqué le microsystème électrique d'électroporation. J'ai par la suite élaboré le modèle électrique permettant de simuler ses performances. En parallèle, j'ai réalisé les modèles rendant compte des zones électroporées par les deux autres techniques actuellement proposés pour l'électroporation d'embryons entre les stades E5.0 et E7.0 ce qui a permis de les comparer à celles atteintes par notre microdispositif.

J'ai aussi participé à la totalité des expériences d'électroporations mises en œuvre pour tester le microsystème électrique. J'ai analysé les résultats de ces expériences en terme de localisation de la zone électroporée, d'efficacité de la transfection, ainsi que de conservation de l'intégrité cellulaire, et ce, pour diverses conditions électriques.

J'ai enfin pris part à la quasi-totalité des expériences d'électroporation de plasmides codant pour une protéine fluorescente pour suivre des sous-populations cellulaires précises de l'endoderme viscéral d'embryons au stade E5.5.

A microdevice to locally electroporate embryos with high efficiency and reduced cell damage

Elsa Mazari[†], Xuan Zhao[†], Isabelle Migeotte*, Jérôme Collignon[#], Charlie Gosse^{†,§}, and Aitana Perea-Gomez^{#,§}

[†] Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, LPN-CNRS, route de Nozay, 91460 Marcoussis, France

[#] Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Institut Jacques Monod, CNRS UMR7592, F-75205 Paris, France.

* Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

[§] **Corresponding authors:**

Aitana Perea-Gomez. Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Institut Jacques Monod, CNRS UMR7592 15 rue Hélène Brion, F-75205 Paris, France. E-mail: pereagomez.aitana@ijm.univ-paris-diderot.fr; Phone: +33 157 27 81 09; Fax: +33 127 27 80 87

Charlie Gosse. Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, LPN-CNRS, route de Nozay, 91460 Marcoussis, France. E-mail: charlie.gosse@lpn.cnrs.fr; Phone: +33 169 63 61 55; Fax : +33 169 63 60 06

Short title: Local electroporation microdevice

Keywords: localised electroporation, embryo, visceral endoderm

Introduction

During embryonic development, morphogenesis is the result of dynamic and complex cellular events controlled by signalling networks finely regulated in space and time. Understanding these processes requires the ability to label discrete cell populations in order to characterise their lineage and fate as well as tools to control gene expression with precise spatiotemporal resolution.

Electroporation consists in delivering exogenous molecules into cells via the electric permeabilisation of the plasma membrane. It has been widely used to introduce nucleic acids in model organisms (Calegari et al., 2004; Escoffre et al., 2009; Nakamura and Funahashi, 2012; Swartz et al., 2001). Unlike viral infection and lipofection, electroporation does not require specific sample preparation. Moreover, spatial and temporal control of gene expression is achieved without the obligatory identification of tissue specific regulatory sequences nor the time- and resource-consuming production of genetically modified animals.

Targeting electroporation to specific tissues often involves local application of the exogenous molecule and electric field generation with large electrodes, either commercially available or home made. This approach has been implemented most successfully when the tissue of interest surrounds a natural body cavity in which microinjection is possible, for example the neural tube lumen or the proamniotic cavity of vertebrate embryos (Itasaki et al., 1999; Soares et al., 2008). In other situations, such as epithelial tissues laying at the periphery of embryos or organs, the geometry and the position of the targeted area do not allow local concentration of the exogenous molecule. The latter compound is then homogeneously distributed, and localised electroporation can only be achieved if the electric field is constrained in space, for instance by using needle shaped electrodes placed close to the targeted area (Davidson et al., 2003; Momose et al., 1999). The main limitation of this strategy is that electrolysis at the needles surface leads to pH variations and gas bubbles generation that can be detrimental to the adjacent cells (Kim et al., 2008; Wang et al., 2010; Wang and Lee, 2013). This problem can be circumvented by using electrodes placed away from the organism while locally focusing the electric field through dielectric guides filled with an electrolyte, a technique notably applied to label single neurons with electroporation micropipettes (Haas et al., 2001; Nolkrantz et al., 2001; Wang et al., 2010). Recently, dielectric guide-based electroporation has also been adapted to the on-chip format, with microfabricated electrodes and fluidic channels (Fox et al., 2006; Wang et al., 2010; Wang and Lee, 2013). Although the use of such devices has so far been restricted to single cells in

culture, one could in principle devise similar microsystems to target small embryos or organ explants that face poor survival in traditional electroporation experiments. This is the case for mouse embryos at early post-implantation stages, a critical time window for anterior-posterior axis formation (Rossant and Tam, 2009; Takaoka and Hamada, 2012).

Shortly after implantation, at embryonic day 5 of development (E5), the mouse embryo has the shape of an elongated cylinder, less than 200 μm long, and displays radial symmetry around the proximo-distal axis. The pluripotent epiblast (Epi) in the distal region is associated to two extra-embryonic tissues, the extraembryonic ectoderm (ExE) which abuts the epiblast proximally, and the visceral endoderm (VE), an absorptive epithelium essential for nutrient exchange that forms the outer layer of the conceptus. Dynamic reciprocal signalling between the epiblast and the extra-embryonic tissues results in radial symmetry breaking, specification of the anterior-posterior axis, gastrulation initiation, and formation of the definitive germ layers. Central to these processes is a VE subpopulation identified at E5.5 by a specific morphology and the expression of a distinct gene repertoire: the distal visceral endoderm (DVE). These cells will move proximally towards one side of the embryo where they will define the future anterior pole and hence take the name of anterior visceral endoderm (AVE) at E6.5 (Rossant and Tam, 2009; Takaoka and Hamada, 2012).

DVE migration has been followed by live imaging of transgenic embryos where this cell population is selectively marked by the expression of fluorescent proteins, e.g. Hex-GFP (Rodriguez et al., 2001). This approach has demonstrated that DVE cells migrate while keeping epithelial integrity by intercalating among other VE cells (Migeotte et al., 2010; Srinivas et al., 2004; Trichas et al., 2011; Trichas et al., 2012). Moreover cell tracking has shown that the whole VE layer is involved in a global reorganization initiated by DVE motion (Rivera-Perez et al., 2003; Takaoka et al., 2011; Trichas et al., 2011). Detailed observation of DVE cells at the migration front revealed that they send long actin dependent projections, which possibly sense the environment for orientation cues (Migeotte et al., 2010; Srinivas et al., 2004). Ablation experiments during the initial phase of migration indicated that front row cells act as leading cells and are essential for subsequent movements in the VE (Morris et al., 2012; Takaoka et al., 2011). In contrast, it has been difficult to scrutinize the shape and behaviour of DVE cells located in the bulk of the migrating fluorescent population or of other non-labelled VE cells. It is thus currently unknown whether they also send long extensions and intercalate or whether they are dragged by the leading DVE cells. Answering these questions requires new tools to specifically target chosen populations and create cell mosaics in the VE layer.

We here describe an on-chip approach based on dielectric guides that makes localised electroporation efficient, reproducible, and safe. As a proof of principle we have chosen to target small cell populations in the VE of mouse embryos at E5.5-E6.5, a critical stage for which existing electroporation procedures face poor reproducibility and poor embryo survival. By combining our new electroporation strategy with live imaging in transgenic embryos, we provide evidence that, during anterior-posterior axis formation, active migration and intercalation are not restricted to leading DVE cells. Finally, we demonstrate that the microdevice we designed can be used to electroporate tissues in a wide range of embryonic contexts.

Materials and Methods

Simulations

Early post-implantation embryos were modelled as two concentric prolate ellipsoids, the outer one representing the organism external boundary and the inner one the periphery of the proamniotic cavity – sizes are given in Figs 1,S1. Cells were not considered individually since they are electrically connected by GAP junctions (Pucihar et al., 2009), present in all tissues at the considered developmental stages (Kalimi and Lo, 1988; Viotti et al., 2012). No data being available for the electrical properties of mouse embryos, values reported for various cells types were used (Gowrishankar and Weaver, 2003; Hibino et al., 1993; Pucihar et al., 2006; Sudsiri et al., 2007). The two ellipsoids were described as resistive membranes having a $3 \cdot 10^{-7}$ S/m conductivity and a 5 nm thickness. The conductivity of the proamniotic fluid was assumed identical to that of the cytoplasm and fixed at 0.3 S/m. For the electroporation buffer a 1.5 S/m value was measured using a CDM210 conductimeter (Radiometer analytical). The glass, polymer, and air boundaries were insulating. The cathode surface was grounded and the anode one had its potential corresponding to the pulse amplitude.

The electric potential outside and inside the embryo was computed relying on the finite element method (FEM) software Comsol Multiphysics 4.2a (Comsol) working in the “Stationary” “Electric Currents” mode (Pucihar et al., 2006) – the geometry of the 3D domains is described in Figs S2,S3. As pulses were here longer than 10 ms, simpler DC modelling was indeed relevant (Valic et al., 2003). The induced transmembrane voltage (ITV)

was calculated by subtracting the extra-cellular potential at the embryo surface to its cytoplasmic counterpart (Figs 1,S1) and these results were directly utilized to account for the electroporated areas. The contribution of the resting potential to the total transmembrane voltage was neglected because its -20 to -60 mV value (Valic et al., 2003; Wang et al., 2010) was smaller than the uncertainty on the permeation threshold.

Microfabrication

Devices were realized on D263 glass substrates, 50 mm in diameter and 550 μm thick (Opticad). The single-use SU-8/Parafilm chips were produced according to a four-step protocol (Figs 2,S4). Gold thin-film electrodes, spaced by 5.8 mm, were first obtained using a standard lift-off procedure. Then, the walls of the 650 μm wide embryo chamber and of the 415 μm long dielectric guides were patterned in SU-8 2050 (MicroChem). The thickness H of the epoxy-resist layer and the width W of the dielectric guides were adjusted to the size of the electroporated organism, varying from 60 to 110 μm and from 50 to 60 μm , respectively. Next, the polymer surface was hydrophilized by plasma treatment and, finally, the fluidic system was closed by thermal bonding of a 130 μm thick ceiling made of Parafilm “M” (Pechiney) including the necessary access holes.

Fabrication of the reusable glass/Parafilm device involved five steps (Figs 7,S5). A chromium mask was first patterned by optical lithography followed by ion beam etching. Hydrofluoric acid was subsequently used to selectively etch the fluidic network in the wafer bulk up to $H=70$ μm , which resulted in guides with a rounder profile. After electrodes had been deposited as above, the glass surface was hydrophilized in a basic solution. Eventually, the Parafilm lid was assembled. Following electroporation, glass substrate recycling was performed by peeling off the Parafilm, cleaning the organic traces in trichloroethylene and the mineral ones in a caustic soda solution. A new surface activation and the bonding of a new lid could then be undertaken.

Scanning electron microscopy images were recorded on a Magellan 400 L (FEI) after the devices had been rendered conductive with a thin gold coating.

Mouse strains, embryo collection, in vitro culture of whole embryos and explants

Embryos were obtained from natural matings of wild-type Swiss females with either Swiss males or transgenic Hex-GFP males maintained on a mixed C57Bl/6 CBA/J and Swiss background (embryos obtained from males of the C57Bl/6 CBA/J background alone were less

resistant to the electroporation procedure, data not shown). E5.5 and E6.5 embryos were dissected in DMEM, 10% foetal calf serum, 25 mM Hepes buffer pH 7.0 (Gibco). They were cultured by groups of 3 at 37°C and 5% CO₂ in 200 µL of DMEM/F12, respectively 50% or 75% heat-inactivated rat serum in DMEM/F12, 100 µg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin. E3.5 blastocysts were flushed from uterine horns in M2 medium (Sigma), depellucidated in acid Tyrode's solution and cultured in 10 µL of G2 medium (Vitrolife) covered with mineral oil (Sigma). Embryonic lungs were dissected from E11.5 embryos, the mesenchyme was removed with tungsten needles after pancreatin/trypsin treatment, and endodermal buds were cultured in Matrigel (Becton Dickinson) as previously described (Weaver et al., 2000). Experiments were performed in accordance with French Agricultural Ministry and European guidelines for the care and use of laboratory animals.

Markers for electroporation

Fluorescein-labelled dextran (FITC-Dextran, 4 kDa, Sigma) was dissolved at 2 mg/mL in HBS (150 mM NaCl, 20 mM Hepes buffer pH 7.0). Endotoxin-free preparations of the CAG-mCherry, CAG-nls-mCherry, and CAG-nls-Venus plasmids were diluted at 1 µg/µL in HBS. Concentrations were selected according to literature (Davidson et al., 2003; Khoo et al., 2007; Rols and Teissie, 1998). For immediate visualization of DNA electroporation, plasmids were labelled with either Cy3 or fluorescein using the Label IT Tracker kit (Mirus) (Boukany et al., 2011). Incubating the embryos in FITC-Dextran or in fluorescently labelled plasmids for 5 minutes did not result in any fluorescence above background (data not shown), ruling out any significant endocytic uptake of these markers by VE cells during the electroporation procedure. Furthermore, marker molecular weights were above 1 kDa, which ensured they could not diffuse from cell to cell through GAP junctions (Kalimi and Lo, 1988).

Embryo electroporation

For each electroporation, 15 µL of solution containing the exogenous molecule were applied to the device, starting with the electrodes reservoirs in order to easily achieve dielectric guide filling. Individual embryos or explants were briefly rinsed in HBS before being transferred to the central open chamber, with the target cell population in front of the cathodic channel (Fig. 2D-F). A small residual flow directed towards the electrode kept the organism steady during all the process (2 to 3 minutes per sample). A train of 3 square pulses of duration 10 to 50 ms and amplitude 10 to 20 V, spaced by 1 second, was immediately applied using a TSS20 Ovodyne electroporator (Intracel).

When addressing cell death, embryos were electroporated in HBS, allowed to recover for 30 minutes in culture, and stained for 20 minutes at 37°C in dissection medium containing 25 µg/mL of propidium iodide (PI, Sigma). Control embryos submitted to the whole protocol with the exception of the pulse application did not show any PI incorporation (data not shown).

Wide field and confocal microscopy

To document FITC-Dextran and PI incorporation, live electroporated embryos were imaged after 1 to 3 hours of in vitro culture using a DMI6000B inverted microscope (Leica) equipped with 20x/0.7NA and 10x/0.4NA lenses. For detailed investigations on the position and number of electroporated cells, embryos were fixed in PBS/paraformaldehyde 4% at 4°C for 1 hour, rinsed in PBS/Tween-20 0.02%, and stained with 10 µg/mL Hoechst 33342 (Molecular Probes). Confocal images were obtained using a LSM 710 confocal microscope (Zeiss) equipped with 25x/0.8NA and 40x/1.3NA lenses.

Time-lapse microscopy

Individual E5.5 electroporated embryos were transferred into wells of angiogenesis µ-slides (Ibidi) containing 30 µL of pre-equilibrated culture medium and imaged for up to 16 hours on an inverted LSM 710 confocal microscope (Zeiss) equipped with a 40x/1.3NA lens and an environmental chamber which maintained 37°C and 5% CO₂ conditions. Images were analysed with Imaris 7.6.4 (Bitplane). At each time point the length of cell projections was measured on 3D images by manually selecting their tip and basis and using the software “Filament tracer” function.

Results

FEM simulations validate a design based on dielectric guides to locally permeate the outer epithelium of embryos

Electroporation of early post-implantation mouse embryos has been achieved in a chamber with parallel plate electrodes (Fig. 1B) (Mellitzer et al., 2002; Soares et al., 2008). However, it can be inferred from computations of the electric potential at the surface of an ellipsoid model that permeation localisation is optimal when the longer axis of the embryo is perpendicular to both electrodes but it degrades as soon as a tilt angle exists, becoming very

difficult to achieve for values close to 90° (Valic et al., 2003). This limitation has been overcome by replacing one of the plates by a needle (Fig. 1C), thereby creating important spatial variations of the electric potential (Davidson et al., 2003; Khoo et al., 2007). However, localised electroporation can only be obtained with a needle close to the targeted tissue, which may result in adverse effects. To circumvent this problem we have implemented an alternative approach where the electric field generated by large electrodes is conveyed to the targeted zone by dielectric guides (Fig. 1D).

In order to compare the three strategies, a simple electrical model of the embryo was conceived (Fig. 1A) and FEM simulations were undertaken to evaluate the extent of membrane permeation. It was here assumed that exogenous molecules could enter the cells of the outer epithelium only if the absolute value of the ITV exceeded a given threshold (Escoffre et al., 2009; Rols and Teissie, 1998). The ITV value on the anterior surface of E6.5 embryos was first plotted in the dielectric guide case (Fig. 1D') and these numerical results were analysed with respect to experimental data on FITC-Dextran incorporation. As the latter measurements provided an electroporated length corresponding to 8% of the total proximo-distal length (see below, Fig. 4A), the permeation threshold was fixed at 0.65 V in order to achieve consistency. Incidentally, this figure falls in the range of the ones reported for isolated cells (Escoffre et al., 2009; Hibino et al., 1993; Valic et al., 2003; Wang et al., 2010). Next, the parallel plates and the plate and needle setups were simulated. The pulse amplitudes were chosen to yield maximum ITV values identical to the 0.72 V obtained with the dielectric guides, thereby allowing a comparison of localisation abilities. When targeting the AVE at E6.5 with parallel plates electrodes, up to 14% of the cells of the embryo anterior half displayed an ITV beyond the permeation threshold (Fig. 1B'). As expected, the extent of the electroporated area was reduced to 4% when the plate and needle electrodes employed (Fig. 1C'). Further improvement, down to 2%, was achieved with the dielectric guides (Fig. 1D').

Keeping the same threshold, similar results were obtained when targeting the DVE at E5.5: parallel plate electrodes, plate and needle electrodes, and dielectric guides respectively yielded permeation of 7, 4, and 2% of the embryo distal half (Figs S1,S3).

Microfabrication techniques enable to easily and reproductively fabricate dielectric guides

Single-use SU-8/Parafilm devices, as well as the subsequent glass/Parafilm ones, were designed following a similar layout (Fig. 2A,B). A keyhole shaped open chamber at the centre enables easy embryo manipulation. At both extremities, large electrodes are located at the

bottom of open circular reservoirs that allow the evacuation of gas bubbles produced by electrolysis, thus preventing these insulating objects from disrupting current flow and hindering membrane permeation. Each reservoir is connected to the chamber by a fluidic system including a narrow dielectric guide and a wider connection channel. The shape of the aperture in front of which the embryo is placed is the most important parameter affecting electroporation localisation. Geometry was here adjusted to the size of the developing organism (Fig. 2C-E). On the other hand, the dielectric guide length was set so as to achieve ITV in the order of - 0.5 to -1 V while applying voltage pulses with amplitudes remaining in the electroporator working range, i.e. 10 to 90 V.

Materials were first selected according to considerations related to microfabrication: Glass is cheap and widely used in microfluidics; SU-8 is a well-known high aspect-ratio epoxy photoresist which can provide up to 200 μm high features; Parafilm is easy to pattern with cutters and punchers, it can also be straightforwardly bond under moderate heating. Regarding biocompatibility, SU-8 and gold were favoured since their innocuousness has been demonstrated for numerous cell and tissue types (Ereifej et al., 2011; Kotzar et al., 2002).

Dielectric guide based devices allow efficient electroporation with reduced cell damage

Validation of the design and usage of our chips was performed by electroporating the VE of E6.5 and E5.5 mouse embryos. Efficient membrane permeabilisation upon voltage application was assessed relying on FITC-Dextran penetration (Fig. 3A,F). Cell transfection by nucleic acids was evaluated by the expression of fluorescent proteins 22 to 24 hours after electroporation of plasmids encoding Venus or mCherry (Fig. 3B,G). Finally, in order to visualize electrically induced cell damage, PI incorporation and morphological alterations were monitored shortly after pulse application (Fig. 3C,D).

E6.5 early to mid-streak stage embryos were electroporated with their AVE facing a 110 μm high and 60 μm wide dielectric guide (Fig. 2F), using a range of electrical conditions close to those predicted by FEM simulations (Fig. 3E). Efficient pore opening occurred in all cases as revealed by FITC-Dextran incorporation into a discrete subpopulation of AVE cells. Moreover, electroporation with the microsystem did not impair embryo survival as 100% of the electroporated embryos reached the late bud to head fold stage after 24 hours of in vitro culture irrespective of the presence of local cell damages ($n=190$). The most efficient DNA transfection associated with the best cell viability was obtained when 3 pulses of 15 V, 50 or 30 ms long and spaced by 1 second, were applied. For 20 V pulses, local cell death was induced in the majority of the embryos as evidenced by PI incorporation. Reducing pulse

duration at this voltage did not improve cell viability while DNA transfection was dramatically reduced. This effect is most likely due to insufficient electrophoretical transport of the plasmids to the permeabilised membrane (Escoffre et al., 2009; Rols and Teissie, 1998). On the other hand, 10 V pulses preserved cell viability but did not allow efficient DNA transfection.

For electroporation of DVE cells at E5.5, the height of the dielectric guides was reduced to 70 μm , so as to maintain localisation in these smaller organisms (Fig. 2E). All the processed E5.5 embryos survived in culture and reached the pre-streak to mid-streak stage after 24 hours ($n=107$). When using 3 pulses of amplitude 15 V and duration 50 ms, spaced by 1 second, the yields of fluorescent protein expression and cell survival were even improved when compared to those obtained at E6.5 (Fig. 3F-H).

In conclusion, we have here implemented a methodology that successfully determined the optimal electrical conditions to obtain efficient electroporation with reduced cell damage in early post-implantation mouse embryos.

Dielectric guide based devices allow reproducible localised electroporation

Two approaches were undertaken to address the size of the electroporated area with the previously established 15 V and 50 ms conditions. First, the size of the zone showing FITC-Dextran fluorescence along the proximo-distal axis was measured in a subset of E6.5 embryos shortly after electroporation (Fig. 4A). The signal extended over 33 ± 7 μm ($n=13$), representing 3-4 cell diameters and $8\pm2\%$ of the total embryo length. Second, FITC or Cy3 labelled plasmids were used to electroporate the DVE at E5.5. These molecules were visible as spots at the surface of the targeted cells just after pulse application and up to 4 hours later (Fig. 4B,C). Such fluorescent spots, which have previously been observed when electroporating isolated cells, most likely correspond to plasmids that first form a stable complex with the plasma membrane and that will be subsequently internalised into the cytoplasm (Escoffre et al., 2009; Golzio et al., 2002). Confocal imaging indicated that in all cases 4 cells had been marked under these conditions ($n=6$, Fig. 4B,C). Together these observations demonstrate that the present microdevices confine the electric field, so that membrane permeabilisation affects less than 5 cells.

Next, to determine the size of the population effectively transfected, cells expressing Venus or mCherry upon plasmid electroporation were counted. As assessed by examination of a subset of embryos electroporated at E5.5 and E6.5 ($n=8$ and $n=6$ respectively, Fig. 4D), between 1 and 4 fluorescent VE cells were observed 4 hours after electroporation, a timing in

agreement with previous observations (Davidson et al., 2003; Khoo et al., 2007). The transfected cells showed similar characteristics to unmanipulated ones, as exemplified by the prominent apical vacuoles outlined when cytoplasmic fluorescent proteins were used (Fig. 4E) (Rivera-Perez et al., 2003; Wada et al., 2013).

After 22 to 24 hours of whole embryo culture, the spatial distribution of the fluorescent VE cells was consistent with the morphogenetic displacements reported for each subpopulation. DVE cells targeted at E5.5 had migrated anteriorly and laterally (Fig. 4F) while AVE cells targeted at E6.5 were found in proximal anterior positions (Fig. 4D) (Lawson and Pedersen, 1987; Perea-Gomez et al., 2001; Rivera-Perez et al., 2003; Srinivas et al., 2004; Takaoka et al., 2011). Transfection of E5.5 DVE and E6.5 AVE respectively yielded 9 ± 5 and 12 ± 7 fluorescent cells after 24 hours ($n=26$ and 14 , respectively). These results indicate that the electroporated cells have divided once or twice during culture, in agreement with a VE population doubling time previously estimated to 10-12 hours by clonal analysis (Lawson and Pedersen, 1987; Perea-Gomez et al., 2001).

These results demonstrate that electroporation with the dielectric guide based microsystems allows reproducible local targeting of gene expression in less than 5 cells, and that this procedure does not alter major characteristics of cell behaviour.

Local electroporation reveals the behaviour of VE cells in the mouse embryo

The analysis of transgenic embryos in which DVE cells specifically express a fluorescent protein has shed light on the behaviour of cells at the migration front. However, these studies only dealt with the initial phase of DVE movement and did not address in detail the characteristics of DVE cells located in the bulk of the GFP expressing population where individual contours were hidden by the signal issued from neighbours (Migeotte et al., 2010; Srinivas et al., 2004; Takaoka et al., 2011; Trichas et al., 2011). The combined use of local electroporation, transgenic lines, and live imaging allowed us to overcome these limitations.

E5.5-E5.75 Hex-GFP transgenic embryos were electroporated distally with a plasmid encoding cytoplasmic mCherry and imaged by live confocal microscopy from 10 to 20 hours after electroporation (Fig. 5, Movies S1,S2). All embryos developed normally ($n=5$), as assessed by the stereotyped anterior/lateral movement of Hex-GFP expressing cells. When electroporated cells divided, they did so only once during the 10 hours imaging, in agreement with the cell cycle length in the VE at this stage. In all cases, divisions were characterised by rounding of cells that completed mitosis in less than 30 minutes ($n=9$ divisions observed in 3 embryos, Fig. 5B-C”). Moreover, nearby cells divided synchronously, indicating that clonally

related cells may maintain coordination in their cell cycles (Fig. 5B''-C'').

We focused our analysis on the behaviour of electroporated cells found in the anterior region of the VE, once Hex-GFP expressing cells at the migration front had reached the embryonic/extra-embryonic (Emb-Xemb) border (Fig. 5, Movies S1, S2). As previously shown (Migeotte et al., 2010; Srinivas et al., 2004), the anterior VE region is composed of both Hex-GFP and Hex-GFP negative clusters of cells, and both cell types could be targeted. Labelled cells expressing mCherry showed a net distal to proximal displacement corresponding to 2 to 4 cell diameters ($38 \pm 16 \mu\text{m}$, $n=5$ cells measured in 2 embryos) during the 10 hours culture period (Fig. 5, Movies S1, S2). This observation is in agreement with the finding that VE cells in the anterior region continue to undergo a proximal movement after leading DVE cells have reached the Emb-Xemb border at E5.75 (Takaoka et al., 2011).

Prominent basal projections were observed in both Hex-GFP positive and negative mCherry expressing cells as they moved forward and intercalated between other cells (Fig.5). These projections were oriented towards the proximal region, had an average length of $13 \pm 7 \mu\text{m}$, and lasted from 15 minutes to 1.5 hours ($n=30$ measurements performed on 11 cells in the embryos shown in Fig. 5 and Movie S2). The longer and more stable projections (up to $30 \mu\text{m}$) were observed in cells reaching the proximity of the Emb-Xemb border. Thin extensions, longer than two cell diameters appeared to contact the first or second row of Hex-GFP positive cells in the proximal region, through filopodial like tips (Fig. 5E,E'',F,F'', Movies S1, S2).

Previous studies had shown that when DVE cells reach the Emb-Xemb border during the initial phase of migration they make an abrupt halt, become elongated with their long axis parallel to the border and spread on the anterior surface of the embryo (Migeotte et al., 2010; Srinivas et al., 2004; Trichas et al., 2011). Non leading Hex-GFP positive cells also ceased forward movement and adopted elongated shapes, but they did so before reaching the Emb-Xemb border and stopped just distally to the first rows of leading Hex-GFP positive cells (Fig. 5G-J'', Movie S1). In addition to the reported shape changes, lateral spreading of the non-leading cells also involved intercalation and junction remodelling (Fig. 5G-J'').

Together these observations demonstrate that DVE cells continue their proximal migration after the leading cells have reached the Emb/Xemb border, and that this process involves the production of basal projections as cells move forward through intercalation.

Dielectric guide based devices allow localised electroporation of external epithelia in embryos and explants

By adapting the dimensions of the dielectric guides, smaller or larger samples could also be targeted with the new microsystem. E3.5 blastocysts were electroporated using 60 μm high and 50 μm wide guides, and upon appropriate orientation mural or polar trophoctoderm cells could always be selectively labelled with FITC-Dextran ($n=9$, Fig.6A,B). Venus expression was observed in 83% of the cases 6 hours after electroporation ($n=10/12$, 3 ± 1 labelled cells, Fig. 6D,E and Movie S3). Similarly, distal endoderm cells of E11.5 lung bud explants devoid of mesenchyme were electroporated using dielectric guides 110 μm high and 60 μm wide. For both FITC-Dextran incorporation and Venus expression a 100% efficiency was observed ($n=4$, Fig.6C and $n=8$, Fig.6F respectively).

Dielectric guide based devices fabricated in glass can be reused

The above results demonstrate that the proposed design including dielectric guides allows an efficient, and reproducible localised electroporation without detrimental effects. The performance optimization was achieved by sequential improvements involving prototypes in which the microfluidic system was patterned in SU-8. Ease of fabrication had then been favoured over robustness. Indeed, the photoresist surface cannot be cleaned and regenerated after use. In order to overcome this limitation, an alternative glass-based fabrication protocol was implemented (Figs 7A,B,S5). Despite some differences in the geometry due to the use of a wet etching technique, a comparable design yielded similar electroporation results when E5.5 DVE cells were targeted. All the treated embryos reached the early streak stage after one day of in vitro culture ($n=20$). Localised FITC-Dextran incorporation was each time successful ($n=11$, Fig. 7C). Upon plasmid electroporation, 67% of the embryos expressed nuclear Venus and showed 9 ± 2 fluorescent cells after 18 to 20 hours in culture ($n=9$, Fig. 7D). Importantly, no difference in results was noticed when the glass wafer was reused after being cleaned.

Discussion

We have produced a chip to locally electroporate small embryos and explants in an efficient, reproducible, and safe way. While the advantages of miniaturization have been widely recognised when dealing with single cells (Boukany et al., 2011; Fox et al., 2006; Wang et al., 2010; Wang and Lee, 2013), microfabrication techniques have only rarely been

adopted for the electroporation of developing organisms (Bansal et al., 2009; Huang et al., 2007). To our knowledge this work validates for the first time the superiority of dielectric guide based designs when targeting small cell populations in embryos. When applied to early post-implantation stages in the mouse, the new microsystem offers important benefits over the traditional approaches relying on plate and/or needle electrodes (Davidson et al., 2003; Khoo et al., 2007): embryo survival is always assured and small populations of less than 5 cells can be transfected without noticeable modification of their behaviour. Moreover, selecting the targeted region and immobilising the sample by suction in front of the dielectric guide can be performed under a conventional dissecting microscope with no need for micromanipulation skills, unlike lipofection or microinjection approaches (Lawson and Pedersen, 1987; Yamamoto et al., 2004).

The pertinence of the present instrumental developments was demonstrated by combining localised electroporation with the use of transgenic mouse lines and live imaging, in order to reveal new behaviours of VE cells during anterior-posterior axis formation. We thus could tackle a biologically relevant question difficult to address with existing techniques. Previous studies had reported that DVE cells at the migration front produce long and stable basal projections and are required to initiate DVE movement, therefore acting as a leading population (Morris et al., 2012; Takaoka et al., 2011). Our results indicate that non-leading DVE cells are not simply dragged by the leading cells, we showed that they intercalate and produce long basal projections potentially involved in sensing external cues to regulate their progression. Leading DVE cells halt abruptly at the Emb/Xemb border as the VE covering the Xemb region displays molecular and cellular properties non permissive for cell intercalation (Trichas et al., 2011). Intriguingly, non-leading DVE cells reaching the proximity of the Emb/Xemb border extended very long cell projections that appeared to contact the first or second row of immobilised leading DVE cells. It is tempting to speculate that these long extensions are involved in sensing a signal produced by the most proximal DVE cells to stop the migration of more distally located Emb VE cells .

The optimization process leading to the design of the new electroporation microsystem first involved soft-lithography (Mazari et al., 2011), before a fabrication protocol based on the SU-8 photoresist could yield effective prototypes. However, at this stage chips remained single-use. In order to make our transfection technique accessible to a wide community of users, we have developed, as an intermediate milestone, a reusable hybrid device composed of a removable Parafilm lid and of a glass wafer in which the dielectric guides have been etched. The latter part, the sole including features realized thanks to microtechnologies, can now be

recycled following washing and hydrophilisation procedures easy to perform on any wet bench. Future work will aim at obtaining a complete glass-based chip, for which no assembly will be necessary and only simple cleaning will be required before use.

The present comprehensive strategy coupling FEM simulations, prototype microfabrication, and in vivo testing, provides a framework that will be useful for the realisation of electroporation devices tailor-made for a variety of samples; whole embryos from different species, e.g. xenopus (Chernet and Levin, 2012; Falk et al., 2007), chick (Nakamura et al., 2004; Voiculescu et al., 2008), zebrafish (Bansal et al., 2009; Huang et al., 2007), insects (Ando and Fujiwara, 2013); organ explants, e.g. brain (Barker et al., 2009; del Rio and Soriano, 2010), retina (Matsuda and Cepko, 2004), cochlea (Driver and Kelley, 2010), gut (Abud et al., 2008), gonads (Gao et al., 2011); or in vitro reconstituted tissues, e.g. spheroids (Chopinet et al., 2011; Mellor et al., 2006). Here, by adjusting the dimensions of the dielectric guides, the microsystem dedicated to early post-implantation mouse embryos was straightforwardly adapted to blastocysts and lung explants which had different sizes and shapes. Future implementations at either smaller or larger scales can thus easily be foreseen (Bansal et al., 2009; Boukany et al., 2011; Falk et al., 2007; Voiculescu et al., 2008). Similarly, the size of the targeted region could be modulated by modifying the dielectric guide geometry. In the present design, efficient electric field focusing ensures excellent electroporation localisation for external tissues. However, one drawback is anticipated from preliminary results issued from FEM simulations: our localization strategy cannot be applied to inner tissues, located further away from the dielectric guides. Indeed, the pulse amplitude required to reach the permeabilisation threshold would be deleterious for outer cells. An alternative approach combining local injection of DNA and the use of very large dielectric apertures would be interesting to achieve local electroporation of inner tissues while preserving high viability rates (Falk et al., 2007).

A variety of molecules can be efficiently introduced into cells by electroporation, among which DNA but also mRNA (Cerdeira et al., 2006; Chernet and Levin, 2012), dsRNA (Mellitzer et al., 2002; Soares et al., 2008), morpholinos (Falk et al., 2007; Mellitzer et al., 2002; Voiculescu et al., 2008), siRNA (Calegari et al., 2004; Paganin-Gioanni et al., 2011), proteins (Rols et al., 1998; Rols and Teissie, 1998) and drugs (Teissie et al., 2012). In this work we concentrated on DNA electroporation to provide a readout for transfection. Incidentally, we confirmed for the first time in a live organism the formation of transient DNA aggregates at the plasma membrane. This observation highlights the interest of coupling our safe electroporation protocol with live imaging to investigate the mechanistic aspects of DNA

electrotransfer in complex in vivo environments, such as the ones faced in clinical applications of electromediated nucleic acids delivery (Andre and Mir, 2010; Chabot et al., 2013; Mir et al., 1999; Rols et al., 1998).

Combining efficient local electroporation with the rapidly evolving fluorescent protein based tools for optogenetics (Nowotschin and Hadjantonakis, 2009; Tang et al., 2013; Yin and Wu, 2013), will provide new powerful approaches for the investigation of the cellular bases of morphogenesis.

Figure legends

Figure 1. Finite element method simulations for the electroporation of the outer epithelial cells located on the anterior half of E6.5 embryos. (A) The embryo is approximated by two concentric prolate ellipsoids of respective length and width 400 and 200 μm for the buffer/VE interface and 300 and 100 μm for the PAC/Epi+ExE one, dimensions which have been established according to our observations (Figs 3A,3C,3D,4A). Those two liquid/tissue interfaces are represented by solid lines whereas dashed lines account for tissue/tissue junctions that were not considered in computations. Techniques relying on (B-B') parallel plate electrodes, (C-C') plate and needle electrodes, and (D-D') dielectric guides are compared. The geometries used to simulate the experimental situations schematised in (B), (C), and (D) are detailed in Fig. S2. The (B'), (C'), and (D') ITV maps have been calculated using 34, 2, and 15 V pulse amplitudes, respectively. The same 0.72 V maximal ITV value is then reached in all three cases. Dielectric guides were 110 μm high and 60 μm wide. Black lines delimitate the areas where the ITV is superior to the 0.65 V permeation threshold. Epi: epiblast, EPC: ectoplacental cone, ExE: extraembryonic ectoderm, PAC: proamniotic cavity, VE: visceral endoderm.

Figure 2. Layout and use of the dielectric guide based electroporation device. (A) Global view of the microsystem, one pair of channels is filled with bromophenol blue to highlight the connectivity. (B) Diagram showing a pair of electrodes with the corresponding connecting channels, dielectric guides, and embryo chamber. (C) Scanning electron microscopy view of a dielectric guide of height $H=110\text{ }\mu\text{m}$ and width $W=60\text{ }\mu\text{m}$, as observed from the embryo chamber. (D) Close up view of the whole system included between the electrodes and the embryo chamber. An E5.5 embryo (white arrow) is positioned so as to target its DVE, this tissue facing the dielectric guide connected to the cathode. (E) Zoom on the E5.5 embryo. (F) Similar enlarged view of an E6.5 embryo positioned so as to target its AVE.

Figure 3. Electroporation outcome for E6.5 and E5.5 embryos submitted to voltage pulses of various amplitude and duration. Examples of criteria to define electrical conditions for the electroporation of AVE cells at E6.5: (A) FITC-Dextran incorporation (black arrow), (B) Nuclear mCherry expression, (C) PI incorporation (black arrow), (D)

Abnormal morphology such as cell swelling or destruction (black arrow). **(E)** Results for E6.5 embryos electroporated using 110 μm high and 60 μm wide dielectric guides. Coloured sectors report on the percentage of embryos where at least one cell of the VE displays the following characteristics: (green) FITC-Dextran incorporation; (red) Venus or mCherry expression; (orange) PI incorporation; (black) Abnormal morphology (e.g. cell swelling or cell destruction). The p/n fraction indicated below each pie chart corresponds to the number of positive results, p , over the total number of electroporated embryos, n . PI, FITC-Dextran, and plasmid expression tests were mutually exclusive while morphological abnormalities were scored in all cases. Examples of criteria to define electrical conditions for the electroporation of DVE cells at E5.5: **(F)** FITC-Dextran incorporation, **(G)** Nuclear mCherry expression. **(H)** Results for E5.5 embryos electroporated using 70 μm high and 60 μm wide dielectric guides. Anterior is to the left in A-D and G.

Figure 4. Localised VE electroporation of E6.5 and E5.5 embryos with 15 V and 50 ms pulses, using 110 x 60 μm^2 and 70 x 60 μm^2 dielectric guides, respectively. **(A)** FITC-Dextran incorporation after AVE electroporation at E6.5. The fluorescent signal extends over a length L_E and the total embryo length L_T is measured from the basis of the ectoplacental cone to the distal tip. **(B)** FITC-labelled pCAG-nls-mCherry plasmid interacting with the plasma membrane 45 minutes after DVE electroporation at E5.5. Superposition of the maximum intensity projection of a confocal stack comprising 19 slices spaced by 2 μm and of a single transmission plane. **(C)** Close up single plane view of the DVE region indicated by the white arrow in (B). **(D)** Nuclear Venus distribution 24 hours after AVE electroporation at E6.5. Maximum intensity projection of a confocal stack comprising 81 slices spaced by 3 μm . **(E)** Cytoplasmic mCherry expression 4 hours after DVE electroporation at E5.5. Single confocal plane. The insert shows a close up view. **(F)** Nuclear mCherry distribution 24 hours after DVE electroporation. Superposition of the maximum intensity projection of a confocal stack comprising 29 slices spaced by 5 μm . Hoechst stained nuclei are shown in blue. White dashed lines show the embryonic/extraembryonic boundary in D and F. A: Anterior, D: Distal, P: Posterior, Pr: Proximal.

Figure 5. Confocal live imaging of a Hex-GFP E5.5 embryo electroporated in the VE with pCAG-mCherry with 15 V and 50 ms pulses, using 70 x 60 μm^2 dielectric guides. Images were acquired every 15 minutes for 10 hours. **(A-J)** Superpositions of a single transmission plane with the maximum intensity projection of mCherry and GFP fluorescence

from a stack comprising 25 slices spaced by 4 μm . (A'-J'') Close up views at each time point of the distal Hex-GFP negative (A'-J') and proximal Hex-GFP positive (A''-J'') mCherry expressing cells. White arrows show cell projections. In the lower panels, maximal intensity projections and individual confocal sections were used to determine the outline of the electroporated cells (coloured) and of some Hex-GFP expressing cells (black outlines) in order to highlight cellular projections, cell intercalation, and junction remodelling events.

Figure 6. Electroporation of E3.5 blastocysts and E11.5 lung endodermal buds with 20 V and 50 ms pulses, using $60 \times 50 \mu\text{m}^2$ and $110 \times 60 \mu\text{m}^2$ dielectric guides, respectively. (A-C) FITC-Dextran incorporation. (D-E) Nuclear Venus expression after 6 hours. The targeted area were: (A,D) E3.5 mural trophectoderm; (B,E) E3.5 polar trophectoderm; (C,F) E11.5 endodermal buds. In (C), FITC-Dextran has passively diffused in the bud lumen.

Figure 7. Electroporation experiments performed with the reusable glass microdevice, using 15 V and 50 ms pulses. (A) Close up view of a chip with an E5.5 embryo positioned so as to target its DVE. (B) Scanning electron microscopy view of the dielectric guide of height $H=70 \mu\text{m}$, as observed from the embryo chamber. (C) Example of an E5.5 embryo showing FITC-Dextran incorporation in the DVE immediately after electroporation. (D) Nuclear Venus distribution after 18 hours. Superposition of the maximum intensity projection of a confocal stack comprising 56 slices spaced by 3 μm . Hoechst stained nuclei are shown in blue.

Acknowledgments

We are indebted to the LPN clean room, the ImagoSeine platform, and the IJM animal facility staffs for excellent technical assistance. We thank L. Couraud, C. Dupuis, and L. Leroy for performing metallization and electron microscopy, A.-C. Louër for discussions on glass etching, C. Papanayotou for gift of plasmids, G. Duval for help with embryo culture, G. Dubois, J. Laniel, M. Mantelet and J. Iranzo for participating in initial experiments, A. Camus, H. Berthoumieux, C. Papanayotou, P.-H. Puech and D. Sabéran-Djoneidi for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the ANR PNANO 2009, CNRS PI 2008, and C'nano IdF 2011 calls. E.M. was recipient of PhD scholarships from the FRM and from the RTRA “Triangle de la Physique”. IM is a research associate of the FNRS.

Supplementary data

Figure S1. Finite element method computations for the electroporation of the outer epithelial cells located on the distal half of E5.5 embryos. (A) The embryo is approximated by two concentric prolate ellipsoids of respective length and width 200 and 100 μm for the buffer/VE interface and 140 and 40 μm for the PAC/Epi+ExE one, dimensions which have been established according to our own observations (Figs 3F,4B). Those two liquid/tissue interfaces are represented by solid lines whereas dashed lines account for tissue/tissue junctions that were not considered in computations. Techniques relying on (B-B') parallel plate electrodes, (C-C') plate and needle electrodes, and (D-D') dielectric guides are compared. The geometries used to simulate the experimental situations schematised in (B), (C), and (D) are detailed in Fig. S3. The (B'), (C'), and (D') ITV maps have been calculated using 52, 3, and 15 V pulse amplitudes, respectively. The same 0.72 V maximal ITV value is then reached in all three cases. In (D') dielectric guides were 70 μm high and 60 μm wide. Black lines delimitate the areas where the ITV is superior to the 0.65 V permeation threshold. Epi: epiblast, EPC: ectoplacental cone, ExE: extraembryonic ectoderm, PAC: proamniotic cavity, VE: visceral endoderm.

Figure S2. Snapshots of the conducting domains used to evaluate by FEM simulations the permeated area at the surface of E6.5 embryos. The three geometries correspond to the three schemes of Fig. 1B-D. Anodes are coloured in red whereas cathodes are in blue. Embryos, in green, rest on the setup bottom surfaces, inside droplets of electroporation buffer. They are also laterally centred with respect to the electrode axis and their angular positioning is defined in order to transfect the AVE cells (the targeted area faces either an electrode or a dielectric guide, depending on the technique). The semi-axis values of the prolate ellipsoids are 200 and 100 μm long for the buffer/VE interface and 150 and 50 μm for the PAC/VE+ExE one. (A-A') The parallel plates design is based on the one of the commercial "5 mm Petri dish platinum electrode chamber" (BTX Harvard Apparatus) where the cathode and the anode are spaced by 5 mm. The embryo is placed in the middle of a 15 μL liquid droplet making a 40° contact angle with the glass surface (as measured by ourselves), This domain was represented by a spherical cap which other characteristics could be easily computed: it had a 1.07 mm height and a 5.86 mm base diameter. The latter dimension being slightly larger

than the inter-electrode spacing, it consequently yielded to two additional vertical truncations (the variation in final buffer volume was negligible). **(B-B')** The geometry implemented for localized electroporation with plate and needle electrodes has been established relying on the experimental details given by Khoo and collaborators (Khoo et al., 2007). The embryo is contained in a 15 μL droplet similar to the above one, modelled as 1.07 mm high and 5.86 mm diameter spherical cap. The platinum plate is 750 μm long, 250 μm high, and 100 μm thick. It is connected to the macro-world by a rod, 100 μm in diameter. The tungsten needle has the shape of a 100 μm diameter cylinder which ends by a truncated cone. The corresponding tip half-angle is 5° and the radius of the final discoid section is 8.75 μm . Both the plate handle and the needle penetrate the buffer droplet with a 5° angle with respect to the dish surface. The plate is set vertical at 150 μm from the embryo surface while the needle tip extremity is at 100 μm from the glass surface and at 50 μm from the targeted cells (volume variation due to the presence of the electrodes was negligible). **(C-C')** The dimensions of the dielectric guide microdevice are as follow. The keyhole-shaped embryo chamber was obtained by merging a 650 μm large rectangular parallelepiped with two cylinders of diameter 750 and 325 μm , respectively located at 150 and 570 μm from the dielectric guide axis (Fig. 2B). The two electrode reservoirs are cylinders of diameter 2 mm which are 7.43 mm apart. Each of the three preceding features is open to the exterior and has a depth of 240 μm . They are joined by two 110 μm high microfluidic tunnels including the dielectric guide per se, 60 μm wide and 415 μm long, and a larger connecting channel, 1 mm wide and ~ 2 mm long. The Parafilm ceiling thickness is 130 μm . The volume defined by the latter ensemble of structures is ~ 2.6 μL , which leaves ~ 12.4 μL for the three droplets emerging from the embryo chamber and from the electrode reservoirs. According to our observations, the two spherical caps covering the electrodes reservoirs are 2 mm in diameter and make a 50° contact angle with the Parafilm layer. Consequently, they have a height of 0.46 mm (Fig. 2A,D). For the central electroporation buffer volume the contact angle is nearly 90° and we depicted it with a half-ellipsoid 4.50 mm and 2.46 mm large, 1.80 mm high. Finally, the embryo was positioned with its anterior surface at 15 μm from the cathodic dielectric guide opening (Fig. 2F).

Figure S3. Snapshots of the conducting domains used to evaluate by FEM simulations the permeated area at the surface of E5.5 embryos. The three configurations correspond to the three schemes of Fig. S1B-D. The red and blue surfaces correspond to the anode and to

the cathode, respectively. The embryo is in green and its angular positioning is set in order to target the DVE cells. The semi-axis values of the prolate ellipsoids are 100 and 50 μm long for the buffer/VE interface and 70 and 20 μm for the PAC/VE+ExE one. **(A-A')** The device with parallel plate electrodes is identical to the one used at E6.5 and the embryo is resting half-way from the cathode and from the anode. **(B-B')** The plate and the needle electrodes have the same dimension than at E6.5. They have not been displaced in order to maintain the same 150 μm and 50 μm respective spacing with the embryo surface. **(C-C')** Although the dielectric guide width has been kept at 60 μm , its height has been adjusted to 70 μm . Consequently, the embryo chamber and the electrode reservoir depths are now 200 μm . Moreover, the distal tip of the developing organism is now entering by 8 μm inside the guide opening (Fig. 2E).

Figure S4. Fabrication of a single-use SU-8/Parafilm microdevice such as the one displayed in Fig. 2. Wafers of D263 glass (Opticad), 50 mm in diameter and 550 μm thick, are first cleaned by soaking in a fresh piranha mixture (H_2SO_4 95% / H_2O_2 30%, 2:1) for 3 hours and then thorough rinsing with water. Then, starts a four-step protocol: **(A)** The electrodes are obtained by patterning a nLOF 2070 (MicroChemicals) layer by optical lithography, depositing by e-beam evaporation a metal film composed of 10 nm Ti / 120 nm Au, and dissolving the resist in acetone. The resulting features consist in paired 1 mm large and 12 mm long stripes that are separated by a 5.8 mm gap; **(B)** The dielectric guides (415 μm long for their narrowest section), the embryo chamber (650 μm wide), and the electrode reservoirs (2 mm in diameter) are photolithographed in SU-8 2050 (MicroChem), the thickness of the epoxy-resist and the width of the dielectric guides being adjusted to 60 and 50 μm for E3.5 blastocysts, 70 and 60 μm for E5.5 embryos, and 110 and 60 μm for E6.5 embryos and lung buds; **(C)** The polymer surface is rendered hydrophilic using an ambient air plasma treatment for 50 s and at 300 mTorr in the Expanded Plasma Cleaner (Harrick); **(D)** The fluidic channels and guides are closed by thermal bonding of a thin film ceiling in which appropriate access holes have been punched. More precisely, the latter lid is made of Parafilm “M” (Pechiney), it is assembled on a hot plate set at 60°C and its final thickness is 130 μm . Finally, electrical connectors are welded to the electrodes.

Figure S5. Fabrication and recycling procedure for a reusable glass/Parafilm microdevice such as the one displayed in Fig. 7. The starting glass wafers are the same than

for the single-use chips, they are cleaned similarly in the piranha mixture. Then, begins a five-step protocol: **(A)** A mask is prepared by depositing by e-beam evaporation a 200 nm thin Cr film, patterning a nLOF 2070 layer by optical lithography, and attacking by ion beam etching the metal where it is unprotected. Patterns here obtained are identical to the previous SU-8 ones, except that the open trenches that will yield the dielectric guide are only 15 μm large. **(B)** Glass is next etched in a hydrofluoric acid solution (HF 40% / HCl 37% / H₂O, 10:3:20) for 40 minutes before thorough rinsing with water. Features are now 70 μm deep and they have significantly widened since wet etching is isotropic. The resist is next dissolved in acetone and the metal mask is removed in Chrome-Etch 3144 (Honeywell). **(C)** After a new piranha clean, metal electrodes are obtained thanks to a lift-off procedure identical to the one use for the SU-8/Parafilm devices; **(D)** The glass surface is then hydrophilised by dipping in a RCA1 mixture (NH₄OH 28% / H₂O₂ 30% / H₂O, 1:1:1) for 5 minutes and rinsing with water; **(E)** The Parafilm with all the necessary openings is finally thermally bonded, the connectors are welded, and the channels are filled with water within 5 minutes. Once the electroporation experiments performed, the glass part of the microsystem can be recycled according to the following four-step procedure: **(F)** the Parafilm is pilled off and the connectors are dismantled; **(G)** the wafer is soaked in trichloroethylene for 2 hours at 95°C, rinsed with acetone and isopropanol, dried under nitrogen, wiped in a 1 M NaOH solution, rinsed with water; steps **(D)** and **(E)** are realized once more.

Movie S1. Confocal live imaging on the Hex-GFP E5.5 embryo shown in Fig. 5. It was electroporated in the VE with pCAG-mCherry with 15 V and 50 ms pulses, using a 70 μm high and a 60 μm wide dielectric guide. Images were acquired every 15 minutes for 10 hours, starting 10 hours after electroporation. The movie shows the superposition of maximum intensity projections of mCherry and GFP fluorescence from a stack comprising 25 slices spaced by 4 μm .

Movie S2. Confocal live imaging on a Hex-GFP E5.5 embryo electroporated in the VE with pCAG-mCherry with 15 V and 50 ms pulses, using a 70 μm high and a 60 μm wide dielectric guide. Images were acquired every 15 minutes for 10 hours, starting 9 hours 30 minutes after electroporation. The movie shows the superposition of maximum intensity projections of mCherry and GFP fluorescence from a stack comprising 23 slices spaced by 5 μm .

Movie S3. Confocal live imaging on a E3.5 blastocyst electroporated in the TE with pCAG-

nls-Venus with 20 V and 50 ms pulses, using a 60 μm high and a 50 μm wide dielectric guide. Images were acquired every 20 minutes for 18 hours, starting 6 hours after electroporation. The movie shows the superposition of the maximum intensity projection of Venus fluorescence with a single transmission plane from a stack comprising 14 slices spaced by 4 μm .

References

- Abud, H. E., Young, H. M. and Newgreen, D. F.** (2008). Analysing tissue and gene function in intestinal organ culture. *Methods Mol Biol* **468**, 275-86.
- Ando, T. and Fujiwara, H.** (2013). Electroporation-mediated somatic transgenesis for rapid functional analysis in insects. *Development* **140**, 454-8.
- Andre, F. M. and Mir, L. M.** (2010). Nucleic acids electrotransfer in vivo: mechanisms and practical aspects. *Curr Gene Ther* **10**, 267-80.
- Bansal, T., Lenhart, J., Kim, T., Duan, C. and Maharbiz, M. M.** (2009). Patterned delivery and expression of gene constructs into zebrafish embryos using microfabricated interfaces. *Biomed Microdevices* **11**, 633-41.
- Barker, M., Billups, B. and Hamann, M.** (2009). Focal macromolecule delivery in neuronal tissue using simultaneous pressure ejection and local electroporation. *J Neurosci Methods* **177**, 273-84.
- Boukany, P. E., Morss, A., Liao, W. C., Henslee, B., Jung, H., Zhang, X., Yu, B., Wang, X., Wu, Y., Li, L. et al.** (2011). Nanochannel electroporation delivers precise amounts of biomolecules into living cells. *Nat Nanotechnol* **6**, 747-54.
- Calegari, F., Marzesco, A. M., Kittler, R., Buchholz, F. and Huttner, W. B.** (2004). Tissue-specific RNA interference in post-implantation mouse embryos using directional electroporation and whole embryo culture. *Differentiation* **72**, 92-102.
- Cerda, G. A., Thomas, J. E., Allende, M. L., Karlstrom, R. O. and Palma, V.** (2006). Electroporation of DNA, RNA, and morpholinos into zebrafish embryos. *Methods* **39**, 207-11.
- Chabot, S., Rosazza, C., Golzio, M., Zumbusch, A., Teissie, J. and Rols, M. P.** (2013). Nucleic acids electro-transfer: from bench to bedside. *Curr Drug Metab* **14**, 300-8.
- Chernet, B. T. and Levin, M.** (2012). A versatile protocol for mRNA electroporation of *Xenopus laevis* embryos. *Cold Spring Harb Protoc* **2012**, 447-52.
- Chopinnet, L., Wasungu, L. and Rols, M. P.** (2011). First explanations for differences in electrotransfection efficiency in vitro and in vivo using spheroid model. *Int J Pharm* **423**, 7-15.
- Davidson, B. P., Tsang, T. E., Khoo, P. L., Gad, J. M. and Tam, P. P.** (2003). Introduction of cell markers into germ layer tissues of the mouse gastrula by whole embryo electroporation. *Genesis* **35**, 57-62.
- del Rio, J. A. and Soriano, E.** (2010). Regenerating cortical connections in a dish: the entorhino-hippocampal organotypic slice co-culture as tool for pharmacological screening of molecules promoting axon regeneration. *Nat Protoc* **5**, 217-26.
- Driver, E. C. and Kelley, M. W.** (2010). Transfection of mouse cochlear explants by electroporation. *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 4**, Unit 4 34 1-10.
- Ereifej, E. S., Khan, S., Newaz, G., Zhang, J., Auner, G. W. and VandeVord, P. J.** (2011). Characterization of astrocyte reactivity and gene expression on biomaterials for neural electrodes. *J Biomed Mater Res A* **99**, 141-50.
- Escoffre, J. M., Portet, T., Wasungu, L., Teissie, J., Dean, D. and Rols, M. P.** (2009). What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Mol Biotechnol* **41**, 286-95.
- Falk, J., Drinjakovic, J., Leung, K. M., Dwivedy, A., Regan, A. G., Piper, M. and Holt, C. E.** (2007). Electroporation of cDNA/Morpholinos to targeted areas of embryonic CNS in *Xenopus*. *BMC Dev Biol* **7**, 107.
- Fox, M. B., Esveld, D. C., Valero, A., Luttge, R., Mastwijk, H. C., Bartels, P. V., van den Berg, A. and Boom, R. M.** (2006). Electroporation of cells in microfluidic devices: a review.

Anal Bioanal Chem **385**, 474-85.

Gao, L., Kim, Y., Kim, B., Lofgren, S. M., Schultz-Norton, J. R., Nardulli, A. M., Heckert, L. L. and Jorgensen, J. S. (2011). Two regions within the proximal steroidogenic factor 1 promoter drive somatic cell-specific activity in developing gonads of the female mouse. *Biol Reprod* **84**, 422-34.

Golzio, M., Teissie, J. and Rols, M. P. (2002). Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1292-7.

Gowrishankar, T. R. and Weaver, J. C. (2003). An approach to electrical modeling of single and multiple cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3203-8.

Haas, K., Sin, W. C., Javaherian, A., Li, Z. and Cline, H. T. (2001). Single-cell electroporation for gene transfer in vivo. *Neuron* **29**, 583-91.

Hibino, M., Itoh, H. and Kinosita, K., Jr. (1993). Time courses of cell electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophys J* **64**, 1789-800.

Huang, K. S., Lin, Y. C., Su, K. C. and Chen, H. Y. (2007). An electroporation microchip system for the transfection of zebrafish embryos using quantum dots and GFP genes for evaluation. *Biomed Microdevices* **9**, 761-8.

Itasaki, N., Bel-Vialar, S. and Krumlauf, R. (1999). 'Shocking' developments in chick embryology: electroporation and in ovo gene expression. *Nat Cell Biol* **1**, E203-7.

Kalimi, G. H. and Lo, C. W. (1988). Communication compartments in the gastrulating mouse embryo. *J Cell Biol* **107**, 241-55.

Khoo, P. L., Franklin, V. J. and Tam, P. P. (2007). Fate-Mapping Technique: Targeted Whole-Embryo Electroporation of DNA Constructs into the Germ Layers of Mouse Embryos 7-7.5 Days Post-coitum. *CSH Protoc* **2007**, pdb prot4893.

Kim, J. A., Cho, K., Shin, M. S., Lee, W. G., Jung, N., Chung, C. and Chang, J. K. (2008). A novel electroporation method using a capillary and wire-type electrode. *Biosens Bioelectron* **23**, 1353-60.

Kotzar, G., Freas, M., Abel, P., Fleischman, A., Roy, S., Zorman, C., Moran, J. M. and Melzak, J. (2002). Evaluation of MEMS materials of construction for implantable medical devices. *Biomaterials* **23**, 2737-50.

Lawson, K. A. and Pedersen, R. A. (1987). Cell fate, morphogenetic movement and population kinetics of embryonic endoderm at the time of germ layer formation in the mouse. *Development* **101**, 627-52.

Matsuda, T. and Cepko, C. L. (2004). Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16-22.

Mazari, E., Mantelet, M., Iranzo, J., Perea-Gomez, A. and Gosse, C. (2011). Localized electroporation of mouse embryo using dielectric guides. *Transducers 2011, Digest of the Technical Papers of the 16th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators, and Microsystems*, 1172-1175.

Mellitzer, G., Hallonet, M., Chen, L. and Ang, S. L. (2002). Spatial and temporal 'knock down' of gene expression by electroporation of double-stranded RNA and morpholinos into early postimplantation mouse embryos. *Mech Dev* **118**, 57-63.

Mellor, H. R., Davies, L. A., Caspar, H., Pringle, C. R., Hyde, S. C., Gill, D. R. and Callaghan, R. (2006). Optimising non-viral gene delivery in a tumour spheroid model. *J Gene Med* **8**, 1160-70.

Migeotte, I., Omelchenko, T., Hall, A. and Anderson, K. V. (2010). Rac1-dependent collective cell migration is required for specification of the anterior-posterior body axis of the mouse. *PLoS Biol* **8**, e1000442.

Mir, L. M., Bureau, M. F., Gehl, J., Rangara, R., Rouy, D., Caillaud, J. M., Delaere, P., Branellec, D., Schwartz, B. and Scherman, D. (1999). High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4262-7.

Momose, T., Tonegawa, A., Takeuchi, J., Ogawa, H., Umesono, K. and Yasuda, K. (1999). Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Dev Growth Differ* **41**, 335-44.

Morris, S. A., Grewal, S., Barrios, F., Patankar, S. N., Strauss, B., Buttery, L., Alexander, M., Shakesheff, K. M. and Zernicka-Goetz, M. (2012). Dynamics of anterior-posterior axis formation in the developing mouse embryo. *Nat Commun* **3**, 673.

Nakamura, H. and Funahashi, J. (2012). Electroporation: past, present and future. *Dev Growth Differ* **55**, 15-9.

Nakamura, H., Katahira, T., Sato, T., Watanabe, Y. and Funahashi, J. (2004). Gain- and loss-of-function in chick embryos by electroporation. *Mech Dev* **121**, 1137-43.

Nolkrantz, K., Farre, C., Brederlau, A., Karlsson, R. I., Brennan, C., Eriksson, P. S., Weber, S. G., Sandberg, M. and Orwar, O. (2001). Electroporation of single cells and tissues with an electrolyte-filled capillary. *Anal Chem* **73**, 4469-77.

Nowotschin, S. and Hadjantonakis, A. K. (2009). Photomodulatable fluorescent proteins for imaging cell dynamics and cell fate. *Organogenesis* **5**, 217-26.

Paganin-Gioanni, A., Bellard, E., Escoffre, J. M., Rols, M. P., Teissie, J. and Golzio, M. (2011). Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 10443-7.

Perea-Gomez, A., Lawson, K. A., Rhinn, M., Zakin, L., Brulet, P., Mazan, S. and Ang, S. L. (2001). Otx2 is required for visceral endoderm movement and for the restriction of posterior signals in the epiblast of the mouse embryo. *Development* **128**, 753-65.

Pucihar, G., Kotnik, T., Valic, B. and Miklavcic, D. (2006). Numerical determination of transmembrane voltage induced on irregularly shaped cells. *Ann Biomed Eng* **34**, 642-52.

Pucihar, G., Miklavcic, D. and Kotnik, T. (2009). A time-dependent numerical model of transmembrane voltage inducement and electroporation of irregularly shaped cells. *IEEE Trans Biomed Eng* **56**, 1491-501.

Rivera-Perez, J. A., Mager, J. and Magnuson, T. (2003). Dynamic morphogenetic events characterize the mouse visceral endoderm. *Dev Biol* **261**, 470-87.

Rodriguez, T. A., Casey, E. S., Harland, R. M., Smith, J. C. and Beddington, R. S. (2001). Distinct enhancer elements control Hex expression during gastrulation and early organogenesis. *Dev Biol* **234**, 304-16.

Rols, M. P., Delteil, C., Golzio, M., Dumond, P., Cros, S. and Teissie, J. (1998). In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol* **16**, 168-71.

Rols, M. P. and Teissie, J. (1998). Electroporabilization of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration. *Biophys J* **75**, 1415-23.

Rossant, J. and Tam, P. P. (2009). Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development* **136**, 701-13.

Soares, M. L., Torres-Padilla, M. E. and Zernicka-Goetz, M. (2008). Bone morphogenetic protein 4 signaling regulates development of the anterior visceral endoderm in the mouse embryo. *Dev Growth Differ* **50**, 615-21.

Srinivas, S., Rodriguez, T., Clements, M., Smith, J. C. and Beddington, R. S. (2004). Active cell migration drives the unilateral movements of the anterior visceral endoderm. *Development* **131**, 1157-64.

Sudsiri, J., Wachner, D. and Gimsa, J. (2007). On the temperature dependence of the dielectric membrane properties of human red blood cells. *Bioelectrochemistry* **70**, 134-40.

Swartz, M., Eberhart, J., Mastick, G. S. and Krull, C. E. (2001). Sparking new frontiers: using in vivo electroporation for genetic manipulations. *Dev Biol* **233**, 13-21.

Takaoka, K. and Hamada, H. (2012). Cell fate decisions and axis determination in the early mouse embryo. *Development* **139**, 3-14.

Takaoka, K., Yamamoto, M. and Hamada, H. (2011). Origin and role of distal visceral endoderm, a group of cells that determines anterior-posterior polarity of the mouse embryo. *Nat Cell Biol* **13**, 743-52.

Tang, J. C., Szikra, T., Kozorovitskiy, Y., Teixeira, M., Sabatini, B. L., Roska, B. and Cepko, C. L. (2013). A nanobody-based system using fluorescent proteins as scaffolds for cell-specific gene manipulation. *Cell* **154**, 928-39.

Teissie, J., Escoffre, J. M., Paganin, A., Chabot, S., Bellard, E., Wasungu, L., Rols, M. P. and Golzio, M. (2012). Drug delivery by electropulsation: Recent developments in oncology. *Int J Pharm* **423**, 3-6.

Trichas, G., Joyce, B., Crompton, L. A., Wilkins, V., Clements, M., Tada, M., Rodriguez, T. A. and Srinivas, S. (2011). Nodal dependent differential localisation of dishevelled-2 demarcates regions of differing cell behaviour in the visceral endoderm. *PLoS Biol* **9**, e1001019.

Trichas, G., Smith, A. M., White, N., Wilkins, V., Watanabe, T., Moore, A., Joyce, B., Sugnaseelan, J., Rodriguez, T. A., Kay, D. et al. (2012). Multi-cellular rosettes in the mouse visceral endoderm facilitate the ordered migration of anterior visceral endoderm cells. *PLoS Biol* **10**, e1001256.

Valic, B., Golzio, M., Pavlin, M., Schatz, A., Faurie, C., Gabriel, B., Teissie, J., Rols, M. P. and Miklavcic, D. (2003). Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment. *Eur Biophys J* **32**, 519-28.

Viotti, M., Niu, L., Shi, S. H. and Hadjantonakis, A. K. (2012). Role of the gut endoderm in relaying left-right patterning in mice. *PLoS Biol* **10**, e1001276.

Voiculescu, O., Papanayotou, C. and Stern, C. D. (2008). Spatially and temporally controlled electroporation of early chick embryos. *Nat Protoc* **3**, 419-26.

Wada, Y., Sun-Wada, G. H. and Kawamura, N. (2013). Microautophagy in the visceral endoderm is essential for mouse early development. *Autophagy* **9**, 252-4.

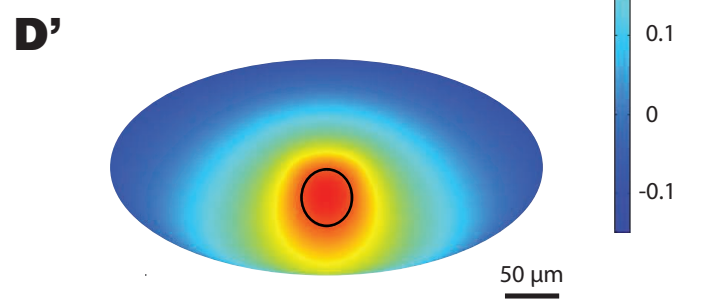
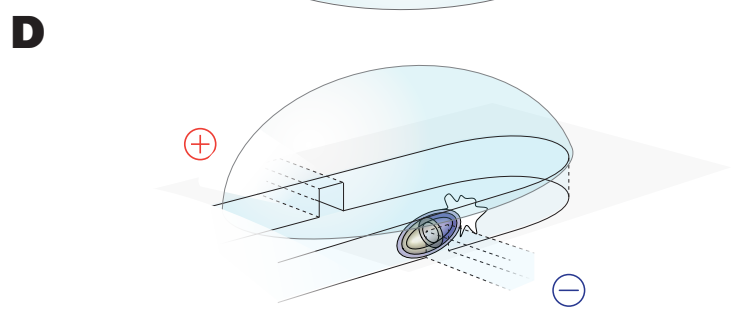
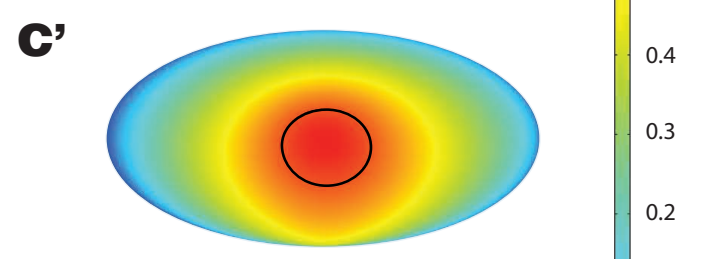
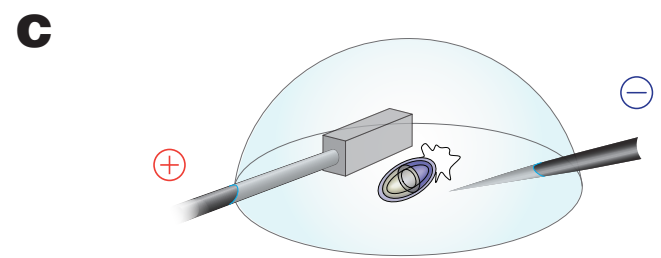
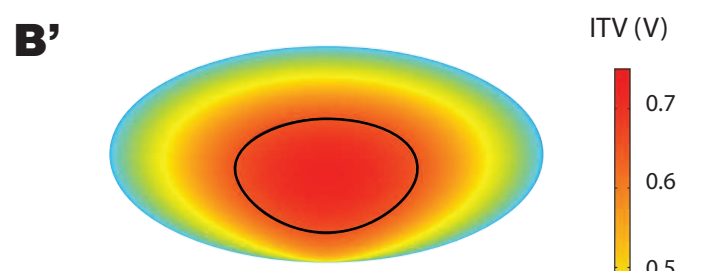
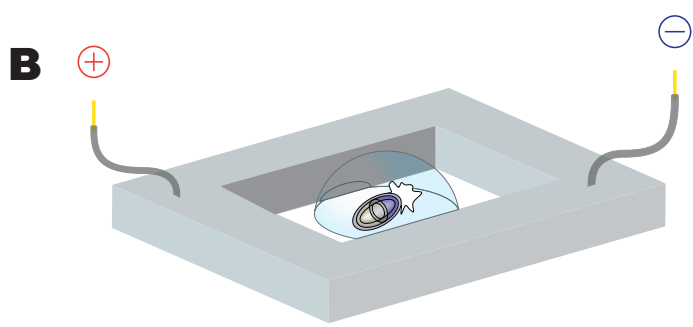
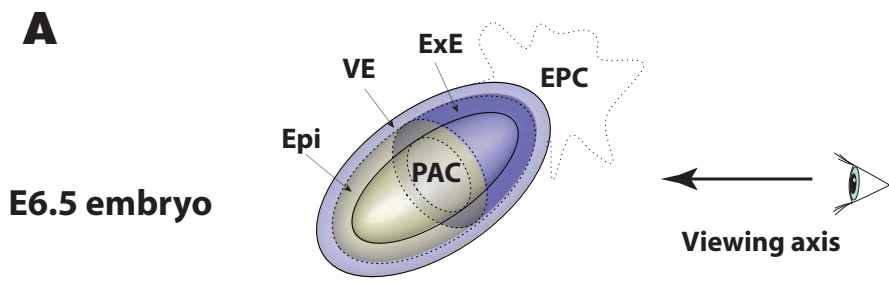
Wang, M., Orwar, O., Olofsson, J. and Weber, S. G. (2010). Single-cell electroporation. *Anal Bioanal Chem* **397**, 3235-48.

Wang, S. and Lee, L. J. (2013). Micro-/nanofluidics based cell electroporation. *Biomicrofluidics* **7**, 11301.

Weaver, M., Dunn, N. R. and Hogan, B. L. (2000). Bmp4 and Fgf10 play opposing roles during lung bud morphogenesis. *Development* **127**, 2695-704.

Yamamoto, M., Saijoh, Y., Perea-Gomez, A., Shawlot, W., Behringer, R. R., Ang, S. L., Hamada, H. and Meno, C. (2004). Nodal antagonists regulate formation of the anteroposterior axis of the mouse embryo. *Nature* **428**, 387-92.

Yin, T. and Wu, Y. I. (2013). Guiding lights: recent developments in optogenetic control of biochemical signals. *Pflugers Arch* **465**, 397-408.



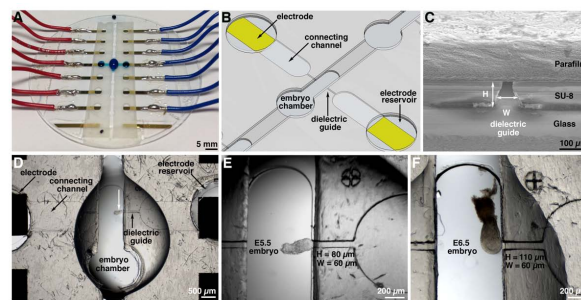


Figure 2

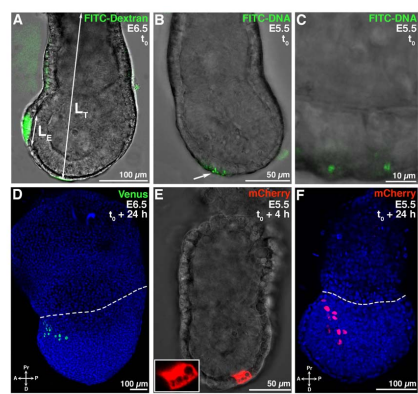


Figure 4

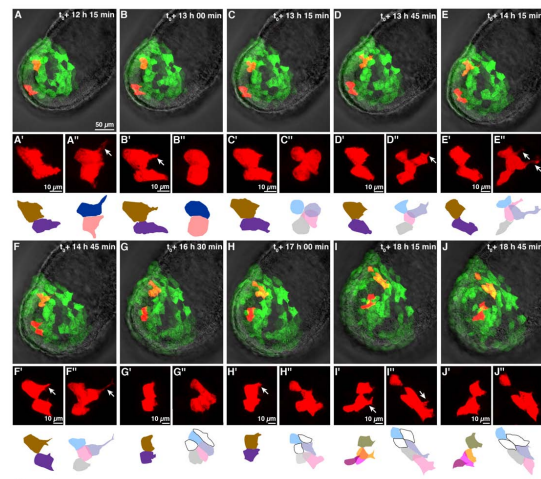


Figure 5

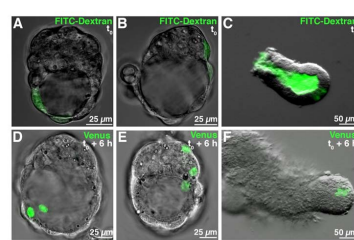


Figure 6

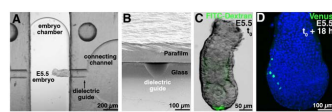
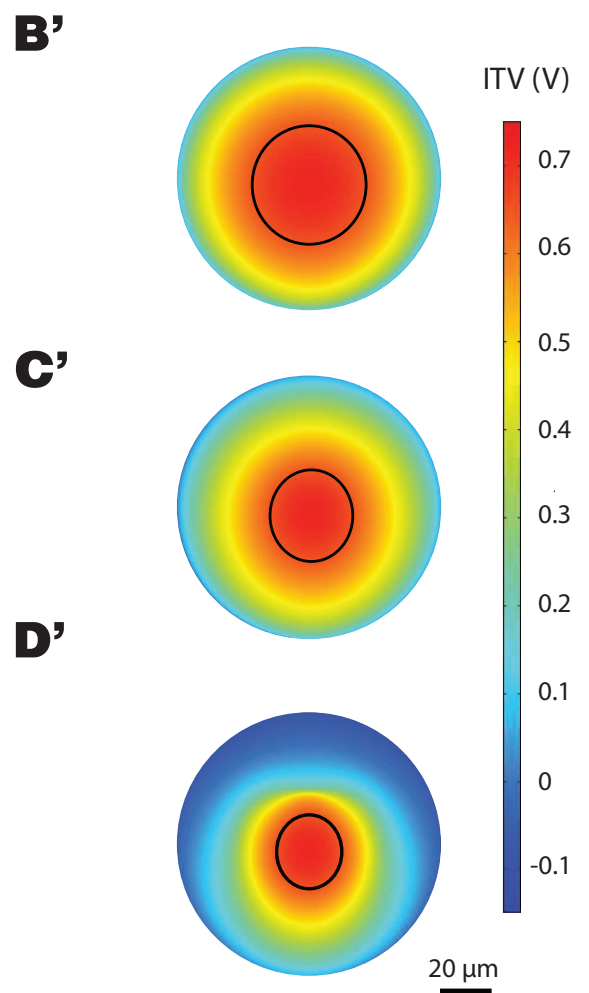
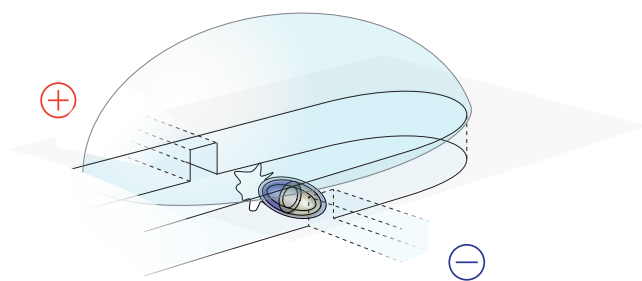
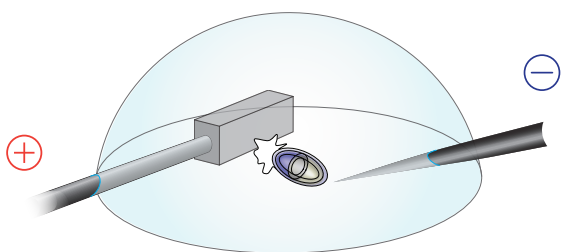
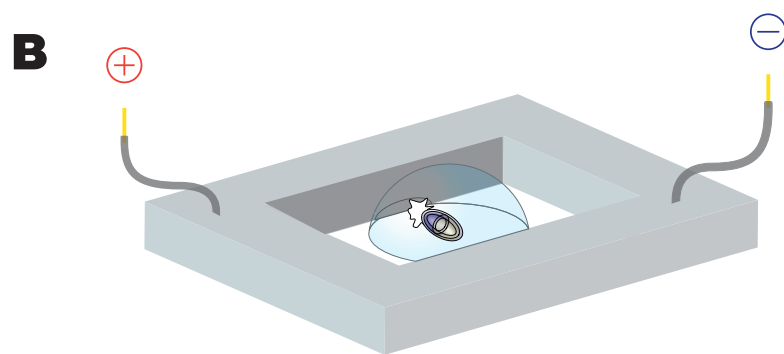
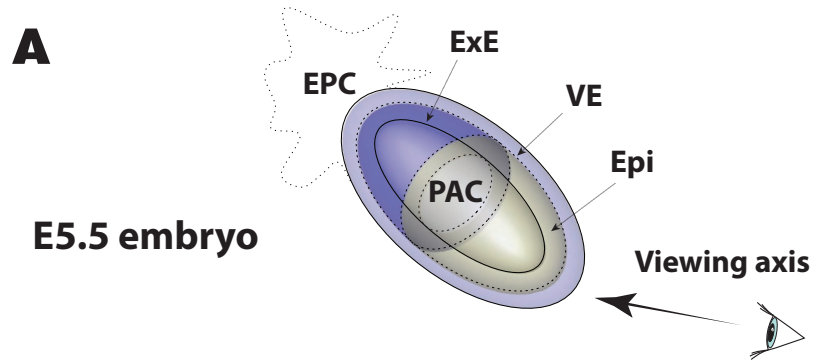


Figure 7



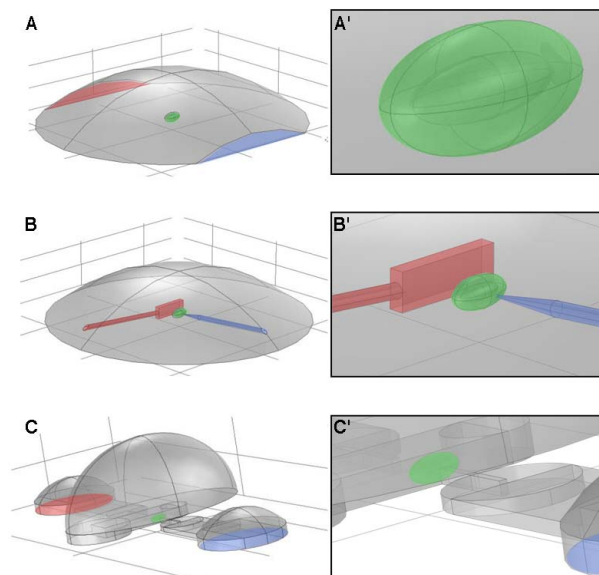


Figure S2

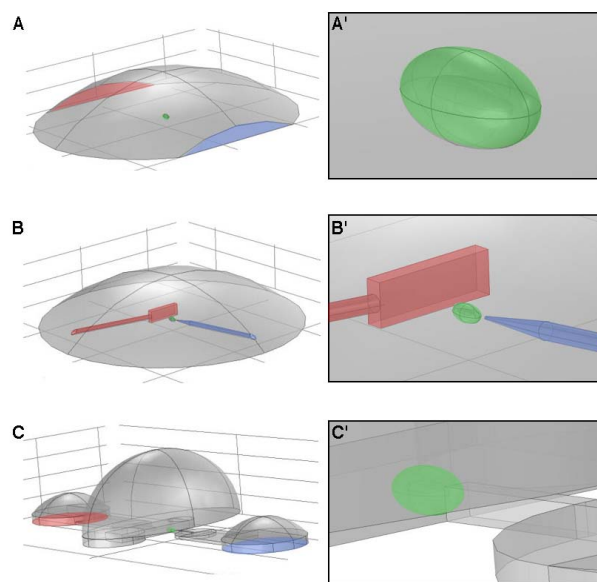
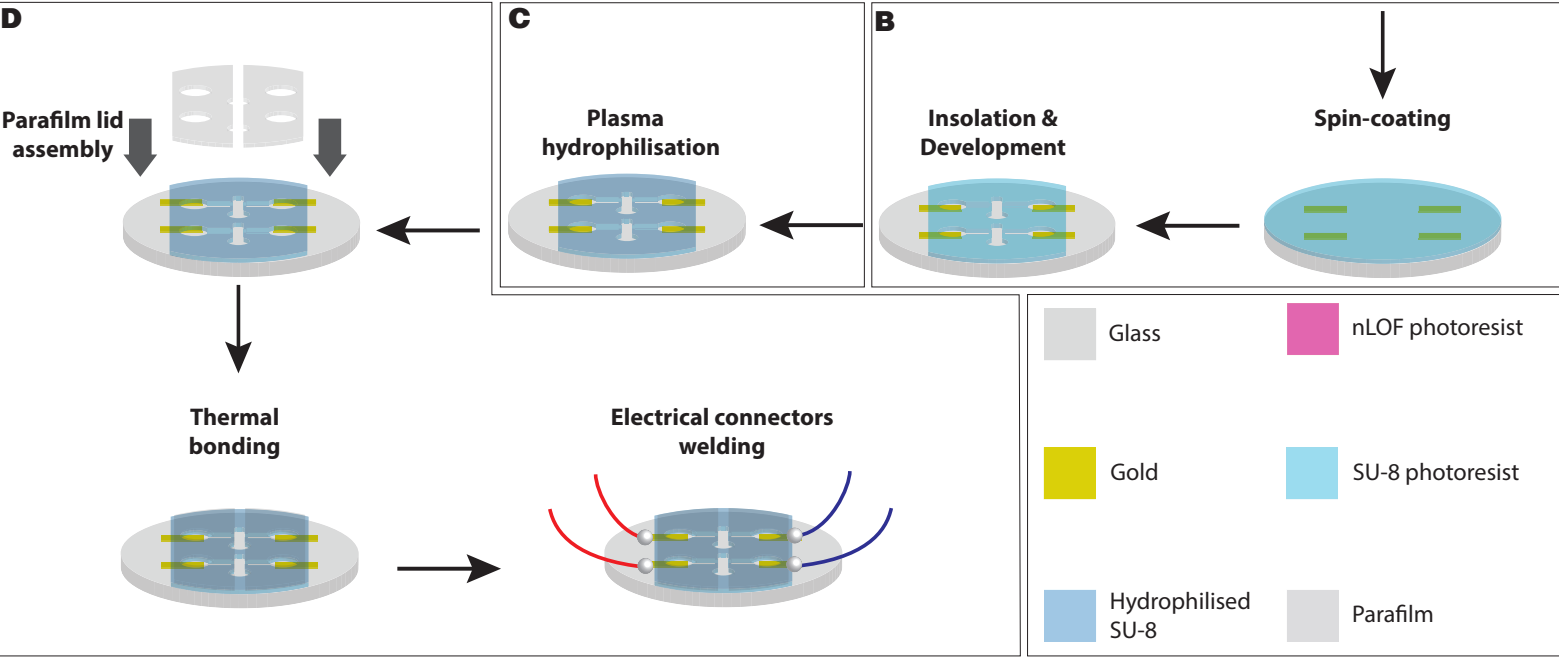
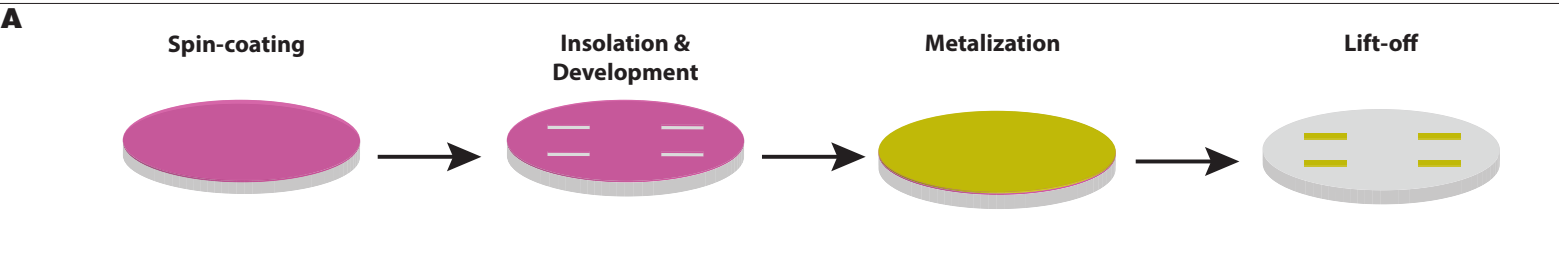
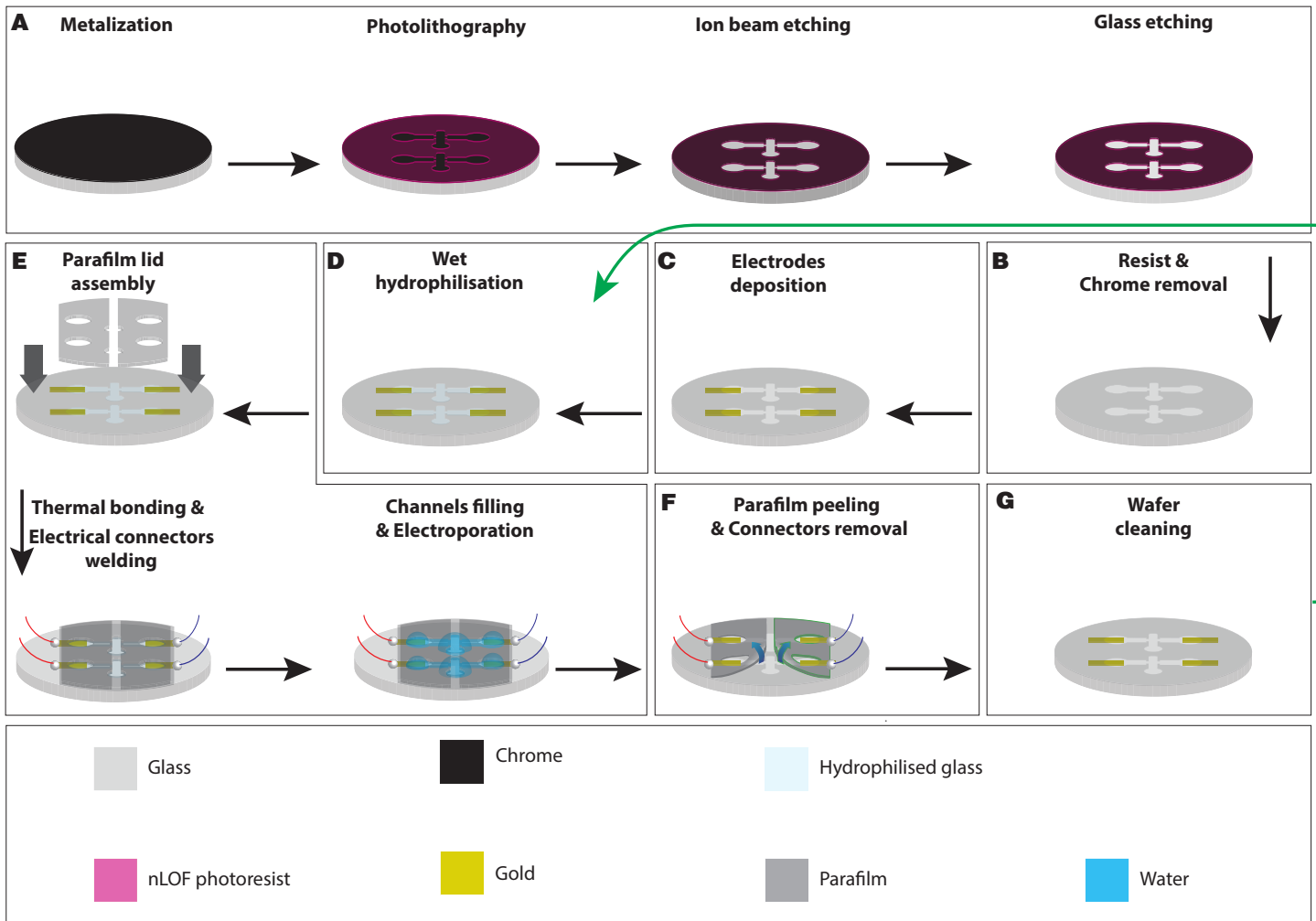


Figure S3



	Glass		nLOF photoresist
	Gold		SU-8 photoresist
	Hydrophilised SU-8		Parafilm



Chapitre 3

Perspectives

3.1 Perspectives technologiques

Nous cherchons à développer un microsystème qui pourrait être diffusé à la communauté de biologistes du développement travaillant sur des embryons de souris post-implantatoires. Des expériences préliminaires montrent qu'un microsystème hydride verre/parafilm apparenté à la troisième génération permet d'obtenir des résultats similaires à celui réalisé en SU8/parafilm. En outre, il est, dans une certaine mesure, possible de le nettoyer et de le réutiliser. Cependant, l'assemblage d'une couche de parafilm nécessaire entre chaque expérience n'en fait pas un outil adapté à la communauté à laquelle il s'adresse.

C'est pourquoi, deux nouvelles stratégies de microfabrication sont envisagées. L'une repose sur la réalisation de quelques centaines de microdispositifs peu coûteux et à usage unique. L'autre propose la fabrication d'une dizaine de microdispositifs plus chers mais réutilisables. Dans le premier cas, la technologie sera le moulage par injection ou impression du plastique par des entreprises comme Dolomite, Microfluidic ChipShop ou encore SIMTech Microfluidics Foundry. Dans le second cas, nous pourrions avoir recours au verre (gravure humide ou Deep Reactive Ion Etching, collage haute température) et nous tournerons alors vers des industriels tels que Micronit, LioniX ou Dolomite.

Quelque soit l'option choisie, notre connaissance des procédés technologiques sera fondamentale pour la définition des spécifications, le choix des matériaux et des options de traitement de surface. Nous travaillerons aussi à la réalisation d'un interfaçage micro/macro pratique. Un socle s'adaptant sur une loupe binoculaire sera mis au point. Il pourra accueillir le microsystème et permettre les connexions électriques par simple pression à l'aide d'un système de verrouillage mécanique. Enfin, si l'option verre est retenue, un outil fluide sera conçu pour la circulation des solutions de nettoyage (NaOH concentré, détergent) dans les tunnels diélectriques.

3.2 Perspectives en biologie du développement

Ultimement, notre microsystème permettra d'effectuer un ensemble d'expériences types d'embryologie.

Au cours de leur déplacement disto-proximal coordonné annonçant les prémices de l'orientation antéro-postérieure, les cellules du DVE, migrent comme un épithélium, sans perte de la cohésion intercellulaire [221, 362]. La migration du DVE s'accompagne d'un changement de forme des cellules et de phénomènes d'intercalation cellulaire qui touchent à la fois le DVE mais aussi l'ensemble des cellules du VE couvrant l'épiblaste [221, 362, 363]

Des images haute résolution obtenues par live imaging d'embryons transgéniques *Hex-GFP* montrent clairement que les cellules à l'avant du DVE, aussi appelées pionnières, produisent des filopodes orientés dans la direction du mouvement dont la présence est dépendante de l'activité d'une petite GTPase nommée Rac1 [221]. Les cellules à l'arrière semblent produire des filopodes plus courts et moins stables [221]. Cependant, la visualisation précise des contours des cellules suiveuses est plus difficile car elles sont entourées d'autres cellules *Hex-GFP* fluorescentes.

3.2.1 Lignage du DVE

Plasmides codant pour une protéine fluorescente

Afin de décrire précisément la dynamique des formes adoptées par les cellules du DVE au cours de leur migration, nous proposons d'électroporer mCherry (forme native cytoplasmique ou farnésylée adressée à la membrane) dans des embryons transgéniques *TgHex-GFP* en ciblant soit le DVE, soit les cellules environnantes. Nous observerons ensuite les embryons par microscopie confocale, à intervalles de 30 minutes pendant toute la période de migration. Nous pourrions alors définir le mouvement global des populations de cellules du VE et du DVE et en particulier la position des cellules dans le groupe ainsi que les phénomènes de changement de voisin. Nous pourrions ainsi comparer les changements de forme respectivement opérés par les cellules pionnières, suiveuses mais aussi les cellules du reste du VE. De plus, grâce à une acquisition optimisée au microscope confocal de la culture des embryons ainsi électroporés, nous pourrions observer en temps réel par quels mécanismes s'effectuent la migration de ces cellules suiveuses : sont-elles entraînées par le mouvement des cellules pionnières ou se déplacent-elles activement ?

Dans ce but, des expériences préliminaires ont été réalisées en électroporant dans le DVE d'embryons à E5.25 un plasmide codant pour la protéine fluorescente rouge mCherry. Les embryons sont ici transgéniques *TgHex-GFP*, leurs cellules du DVE exprimant de façon constitutive la GFP (Fig.3.1a). Après 12

h de culture, nous avons analysé la colocalisation de l'émission dans le rouge et dans le vert, l'étendue et la reproductibilité de la zone électroporée, ainsi que la survie et la migration des cellules marquées (Fig.3.1b). Ces expériences ont permis de définir les paramètres optimaux pour l'électroporation : design des dispositifs, quantité d'ADN, longueur et fréquence des impulsions électriques.

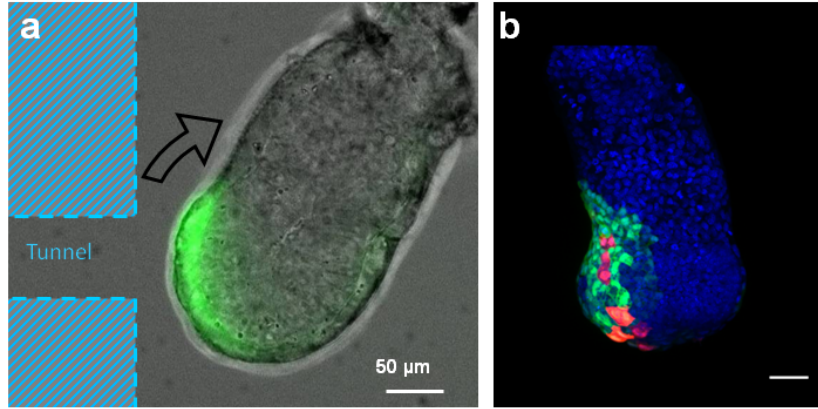


FIGURE 3.1 – Expériences préliminaires d'électroporation sur embryons *TgHex-GFP* au stade E5.5. (a) L'embryon transgénique exprime la GFP au niveau du DVE au stade E5.5 à $t = 0$. Les cellules du DVE en migration sont positionnées face au tunnel du micro-dispositif, figuré en bleu, afin d'être électrotransfectées avec un plasmide *pCAGmCherry*. (b) Expression d'un plasmide *pCAGmCherry* 24 h après électroporation dans le DVE d'un embryon portant le transgène *Hex-GFP* à E5.25. Projection en z de sections confocales, en bleu les noyaux, en rouge le signal mCherry, en vert le signal du transgène *HexGFP* marquant les cellules issues du DVE. Les barres d'échelle sont égales à $50\ \mu\text{m}$.

Cependant, ce type d'embryons transgéniques a révélé une mortalité cellulaire accrue à l'application du champ électrique, et ce dans les mêmes conditions que celle implémentées avec succès pour les embryons sauvages. Constitutivement, les cellules d'embryons *TgHex-GFP* ne présentent pas la même tolérance à la perturbation électrique induite au niveau de leur membrane plasmique ce qui induit une survie cellulaire médiocre se traduisant par une expression de la protéine fluorescente moins importante 24 h après (Fig.3.2). Ces expériences nous ont amené à reconsidérer le fond génétique de ces souris et de nouveaux croisements sont en cours à l'institut Jacques Monod afin de produire des animaux transgéniques exprimant la GFP au sein de leur cellules du DVE avec un fond génétique plus proche de celui de souris sauvages. Si la fragilité accrue observée dans les embryons transgénétiques est bien due au fond génétique de la lignée, les nouveaux animaux devraient produire des embryons plus résistants aux électroporations.

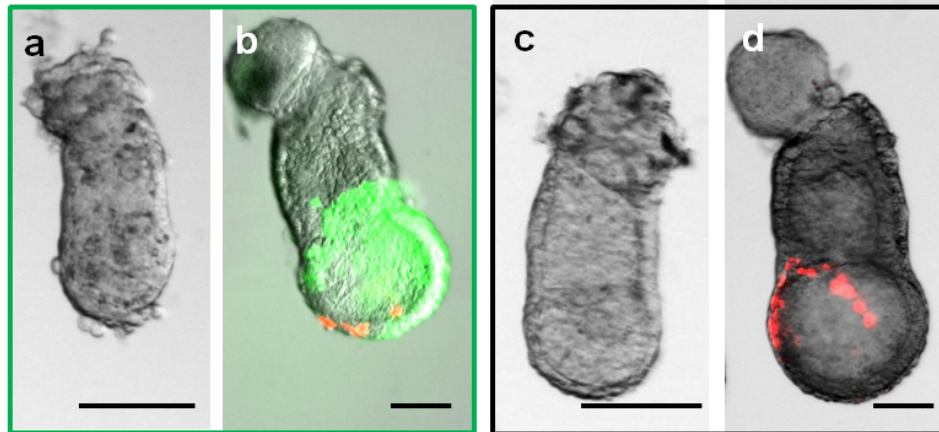


FIGURE 3.2 – Expériences d'électroporation conduites avec 3 impulsions de 15 V d'une durée de 50 ms espacées d'une seconde avec un plasmide *pCAG-mCherry* sur (a-b) un embryon *TgHex-GFP* au stade E5.5 et (c-d) un embryon sauvage au stade E5.5. A $t = 0h$ (a) l'embryon transgénique présente des décollements cellulaires importants alors que (c) l'embryon sauvage est indemne. A $t = 24 h$ (c) l'expression de la protéine fluorescente mCherry est nettement moins importante dans l'embryon *TgHex-GFP* que dans (d) l'embryon sauvage. Les barres d'échelle sont égales à $100 \mu m$.

Quantum Dots

Dans un deuxième temps, nous proposons l'utilisation de QDs comme alternative pour le marquage cellulaire. Leur utilisation comme sondes fluorescentes pour le suivi du développement embryonnaire est prometteuse. Ils présentent en effet de nombreux avantages : grande photostabilité, très bons rendements photophysiques, possibilité de visualisation de plusieurs couleurs avec une même longueur d'onde d'excitation et adressage à tel ou tel compartiment subcellulaire par greffage de peptides *ad hoc* à leur surface. Cependant, le mode d'entrée de ces particules au sein de cellules et leur toxicité sont deux défis auxquels nous prêterons particulièrement attention.

Nous travaillerons avec des QDs synthétisés par l'équipe de V. Marchi de l'Institut des Sciences Chimique de Rennes. Ces derniers possèdent une surface péglée qui les rend stables et biocompatibles. De plus, les chimistes peuvent à façon modifier la charge de surface (afin d'ajuster la mobilité électrophorétique et de les faire ainsi migrer de la même façon que l'ADN) ou greffer des peptides de reconnaissance (afin de favoriser le marquage d'une organelle donnée). Nous proposons des expériences préliminaires d'électroporation où seront étudiés la biocompatibilité et les mécanismes d'entrée (et/ou d'excrétion) des particules dans les différents types cellulaires de l'embryon (endoderme viscéral et épiblaste). Ensuite, en co-électroporant les QDs avec un plasmide codant pour une protéine fluorescente, nous validerons l'utilisation des QDs comme traceurs pour le lignage de cellules du DVE. L'avantage de ces objets est leur visualisation immédiate après l'électroporation. Après avoir validé l'électroporation de QDs non biofonctionnalisés, il sera possible d'envisager l'utilisation de sondes portant des molécules de reconnaissance permettant de marquer spécifiquement certains organelles, tels les mitochondries ou le compartiment endocytaire, et ainsi suivre leur dynamique au cours de la migration des cellules du DVE.

3.2.2 Mécanismes de migration du DVE

Nous envisageons des expériences de modifications génétiques localisées en collaboration avec l'équipe d'I. Migeotte (IRIBHM, Université Libre de Bruxelles). Cette équipe s'intéresse particulièrement à l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires de la migration du DVE.

Nous étudierons la machinerie intracellulaire (jonctions cellulaires, cytosquelette) permettant la migration collective du DVE grâce à l'expression de protéines de fusion. Pour ce faire, nous électroporerons des rapporteurs fluorescents pour les protéines de jonction intercellulaire (E-cadherin, ZO1), les protéines de jonction à la membrane basale (α -V-intégrine, vinculine), et les protéines du cytosquelette (actine, protéines liant l'actine, myosine, tubuline). Les plasmides

codant pour ces protéines de fusion sont décrits dans la littérature et ont été validés par transfection soit dans un modèle *in vivo*, soit dans des cellules en culture. La réalisation de la collection de plasmides est en cours, par contact avec d'autres laboratoires ou acquisition de plasmides commerciaux. Ces expériences montreront comment les cellules remodelent leurs jonctions lorsqu'elles changent de voisin, comment le cytosquelette est réarrangé dans les cellules pionnières et les cellules suiveuses, et comment les adhésions focales à la membrane basale sont modifiées pour permettre le mouvement des cellules sans perte de polarité.

Dans un deuxième temps, il sera envisagé d'électroporer un plasmide codant une version photoactivable du régulateur du cytosquelette Rac1 [364]. Le but de cette expérience sera de suivre le comportement des cellules pionnières et suiveuses du DVE lors de l'activation ectopique de Rac1. Nous pourrions ainsi déterminer si les cellules dites suiveuses changent leur comportement lors de la modification de trajectoire des cellules pionnières, une caractéristique qui démontrerait le caractère collectif de la migration des cellules du DVE.

Quatrième partie

Conclusion générale

1.0 Une approche conceptuelle

La démarche développée au cours de cette thèse conçoit et utilise des micro-systèmes magnétiques dans la première partie de ce travail puis électriques dans la seconde partie. Ces outils miniaturisés visent à perturber de manière directe et locale les mécanismes régulant respectivement : (i) la construction d’une machine moléculaire complexe intervenant lors de la division cellulaire et (ii) la formation de tissus constitués de types cellulaires distincts au sein d’organisme complet.

1.0.1 Des outils dédiés

Appliquer, aux échelles intracellulaire et cellulaire, des stimuli d’une résolution temporelle adéquate et adaptés aux objets étudiés impose le recours à une instrumentation précise et miniaturisée. Plus exactement, la première partie de ce travail repose sur la manipulation contrôlée de nanobilles superparamagnétiques fonctionnalisées par des protéines spécifiques du réseau de signalisation Ran/RCC1. Pour la seconde partie, les microdispositifs sont électriques et doivent être conçus pour accueillir et électroporer des embryons précoces de souris aux stades post-implantatoires. Des considérations conceptuelles guidées en partie par des simulations numériques ont donc été prises pour générer des champs magnétiques ou électriques dédiés à ces applications.

1.0.2 Une méthode générique

De manière intéressante, l’utilisation de ces outils préalablement développés pour des études particulières peut être généralisée à d’autres analyses de mécanismes à l’œuvre au sein de processus cellulaires. Pour les deux approches développées au cours de ce travail, il est en effet possible de faire varier, à un instant donné, la répartition d’espèces moléculaires selon des conditions établies par l’expérimentateur. Ce type de méthodologie peut ainsi inspirer d’autres études de réseaux de régulation. A l’échelle intracellulaire, il serait possible par exemple de contrôler spatialement les protéines régulatrices de la nucléation de l’actine, ces dernières pouvant induire des organisations spécifiques du cytosquelette sous des formes diverses (notamment en réseaux dendritiques) [142, 211]. A l’échelle d’un organisme complet, d’autres pourraient comprendre comment les niveaux de signalisation d’une protéine (par exemple, le TGF β Nodal pour des embryons aux stades E6.0-E6.5) régulent à un stade précis de développement les comportements cellulaires en effectuant des expériences de gain et de perte de fonction.

2.0 Une approche collaborative enrichissante

La mise au point d'une méthodologie pour l'étude de la dynamique spatio-temporelle de réseaux de régulation implique le concours de diverses disciplines scientifiques. Il s'agit de constituer un espace privilégié de travail fédérant les activités de physiciens, chimistes et biologistes.

Plus précisément, en tant qu'étudiante travaillant au sein de deux projets collaboratifs, je soulignerais, suite à cette expérience, l'importance de deux facteurs. D'une part, il s'agit d'intégrer le langage ainsi que certaines techniques développées par nos collaborateurs scientifiques et, d'autre part, une organisation de travail rigoureuse est décisive.

2.0.1 Savoir-faire

Comme attendu, l'élaboration d'expériences pertinentes nécessite l'acquisition de savoir-faire pluridisciplinaires. Issue d'un parcours lié à la physique, j'ai dû principalement assimiler et croiser des techniques en biologie, optique et microfabrication. Ces dernières balayent des applications aussi variées que la photolithographie optique, la microscopie électronique en passant par le développement de modèles numériques jusqu'à la préparation de milieux biologiques pour la culture d'embryons aux stades post-implantatoires précoces.

2.0.2 Organisation

Un autre facteur repose sur une organisation rigoureuse de mon travail. Du fait de la situation géographique des divers laboratoires (situés à Rennes, Marcoussis et Paris) engagés dans ces collaborations, une logistique appropriée s'impose pour chacun des projets. Par exemple, cette gestion devient critique lorsque les dispositifs élaborés doivent être utilisés dans un laps de temps (24 heures) suivant leur conception, comme c'est le cas pour les microsystèmes électriques dans leur version actuelle.

3.0 Récapitulatif

Cette organisation mise en place ainsi que ces savoir-faire acquis conjugués aux techniques propres développées par nos partenaires ont permis les travaux décrits dans ce manuscrit. Pour conclure, nous dresserons une liste des objectifs atteints pour chacun de ces deux projets disponible sur le Tableau 3.1.

TABLE 3.1 – Les objectifs atteints au cours de ce travail.

**Microsystèmes magnétiques pour la modification
spatiotemporelle du réseau de signalisation Ran**

Fonctionnalisation de nanobilles superparamagnétiques avec des protéines Ran/RCC1.

Génération de gradients de nanobilles fonctionnalisées sous champ magnétique.

Modulation des régulateurs spatiaux des microtubules et analyses des changements morphologiques induits sur l'auto-assemblage du fuseau mitotique.

**Microsystèmes électriques pour la modification
spatiotemporelle de la concentration à l'échelle d'un tissu en
développement**

Production de microdispositifs biocompatibles.

Elaboration d'un modèle d'électroporation d'embryons de souris.

Mise au point de protocoles pour l'électroporation reproductible, fiable et locale d'embryons précoces de souris.

Marquage et suivi de sous-populations de cellules dans différentes régions de l'endoderme viscéral.

Cinquième partie

Annexes

Chapitre 1

Annexe 1. Travaux additionnels réalisés avec l'équipe de V. Marchi de l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes

1.1 Three-Dimensional Self-Assembling of Gold Nanorods with Controlled Macroscopic Shape and Local Smectic B Order

Three-Dimensional Self-Assembling of Gold Nanorods with Controlled Macroscopic Shape and Local Smectic B Order

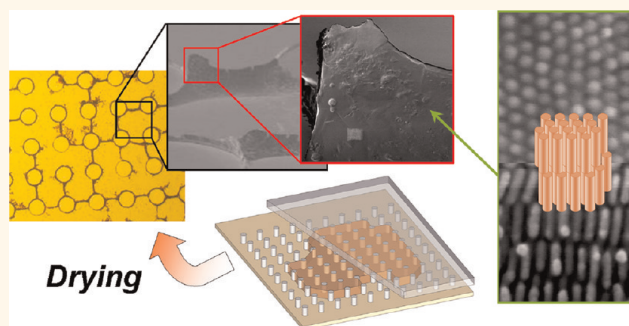
Cyrille Hamon,[†] Marie Postic,[‡] Elsa Mazari,[§] Thomas Bizien,^{†,‡} Christophe Dupuis,[§] Pascale Even-Hernandez,[†] Angela Jimenez,[‡] Laurent Courbin,[‡] Charlie Gosse,[§] Franck Artzner,[‡] and Valérie Marchi-Artzner^{†,*}

[†]Institut des Sciences Chimiques de Rennes, UMR 6226 CNRS, Université Rennes 1, Avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes Cedex, France, [‡]Institut de Physique de Rennes, UMR 6251 CNRS, Université Rennes 1, Avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes Cedex, France, and [§]Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, LPN-CNRS, Route de Nozay, 91460 Marcoussis, France

Gold nanorods (GNRs) are promising components for nanosystems dedicated to applications in fields such as sensing, imaging, and diagnostics.^{1–5} Indeed, they are particularly attractive because of their unique optical properties and their ability to self-organize, both features originating from their shape anisotropy.^{6–12} Ordered assemblies of such metal nanoparticles are for instance used for amplification of optical signals in fluorescence,¹³ Raman,^{14–16} and absorption spectroscopies.^{17,18} Plasmon coupling leads to collective surface plasmon resonances that can be adjusted over a wide spectral domain by tuning the objects' shape and size as well as their interdistance.^{19,20} Different methods have been exploited to prepare three-dimensional (3D) structures made of GNRs,²¹ by either association in solution,^{9,22,23} drying at an interface,^{12,24,25} or templating.^{2,26} Nevertheless, most of these processes yield colloidal crystals having a size limited to a few micrometers, a poorly defined shape, and an inhomogeneous thickness. Furthermore, methods relying on drying generally lack control with respect to spacing between the deposited particles.

The present paper describes a novel drying method where GNR crystallization is managed in order to obtain a macroscopic material having both a predetermined crystalline structure and a predetermined shape. As self-assembling is governed by the balance between van der Waals,²⁷ depletion,^{17,28,29} and electrostatic interactions,³⁰ finely tuning the particle chemical coating is of foremost importance to find a compromise between attractive

ABSTRACT



We describe a method of controlled evaporation on a textured substrate for self-assembling and shaping gold-nanorod-based materials. Tridimensional wall features are formed over areas as large as several square millimeters. Furthermore, analyses by small-angle X-ray scattering and scanning electron microscopy techniques demonstrate that colloids are locally ordered as a smectic B phase. Such crystallization is in fact possible because we could finely adjust the nanoparticle charge, knowledge that additionally enables tuning the lattice parameters. In the future, the type of ordered self-assemblies of gold nanorods we have prepared could be used for amplifying optical signals.

KEYWORDS: gold nanorods · self-assembly · 3D crystal · shaping · PEGylated alkanethiolate · superstructure · controlled drying · PDMS stamp · SAXS · SEM

and repulsive forces. To that effect, we here exchange the detergent present at the gold surface after synthesis for a combination of neutral and negative alkanethiolates. Using such a mixture should allow us to adjust the colloid interdistance in the final material. In parallel, we develop a technique to guide the drying of the GNR suspension over areas as large as several square millimeters. A topographically patterned polydimethylsiloxane

* Address correspondence to valerie.marchi-artzner@univ-rennes1.fr.

Received for review February 9, 2012 and accepted April 12, 2012.

Published online April 12, 2012
10.1021/nn3006027

© 2012 American Chemical Society

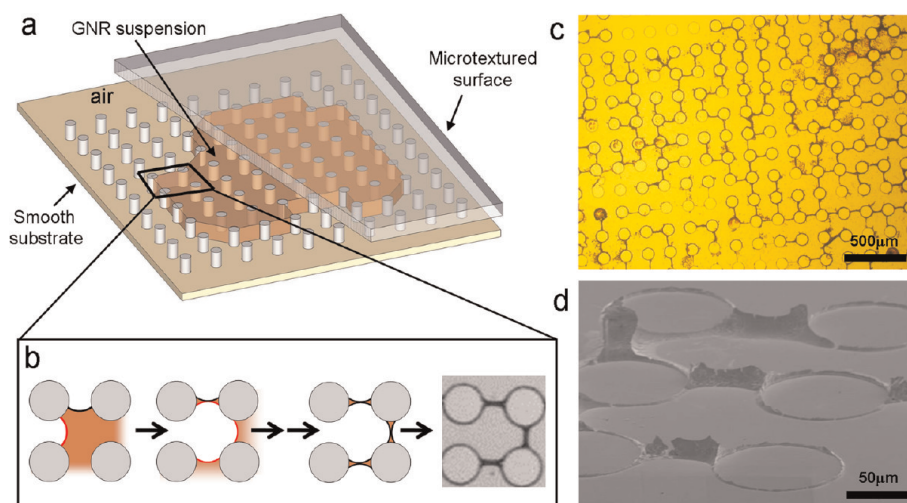


Figure 2. (a) Schematic view of the drying method used to fabricate macroscale GNR self-assemblies. The particle suspension is first confined between a smooth substrate and a PDMS stamp. After water evaporation and removal of the elastomeric mold, an array of solid structures is obtained. (b) Scheme of a typical dewetting process at the scale of four posts; capillary bridges are formed and further dehydrate to yield the colloidal material. (c) Bright field optical micrograph and (d) SEM image of walls made of nanorods.

repulsive interaction in order to adjust the final inter-particle spacing.

As already noticed, crude GNRs are obtained as a suspension in 0.2 M CTAB. Hence, the latter concentration has to be reduced before proceeding to any ligand exchange. Purification by several centrifugation/redispersion cycles was undertaken, and the detergent titer was adjusted at ~ 0.5 mM, *i.e.*, below its CMC value. The substitution of the capping agent could then be achieved and investigated by UV–vis absorbance, IR spectroscopy, electrophoresis, and zetametry. During the exchange of CTAB for MUDOL, the intensity maximum of the longitudinal plasmon band is red-shifted from 763 to 788 nm (see Figure S3), a phenomenon that can be attributed to some modifications in the nanorods' environment. Furthermore, clear alterations are also visible in Fourier transform infrared (FTIR) data (see Figure 1c and d). After substitution, two of the characteristic peaks observed for CTAB GNRs, corresponding to the CH_3 stretching vibrations in the trimethyl ammonium, *antisym* at 2956 cm^{-1} and *sym* at 2869 cm^{-1} , have disappeared. In contrast, the spectrum of the MUDOL particles exhibits bands similar to those of the free MUDOL, particularly in the CH stretching region, between 945 and 720 cm^{-1} , as well as in the $\text{O}-\text{CH}_2$ stretching region, at 1100 cm^{-1} . Moreover, the positions of the CH_2 stretching bands, *antisym* at 2924 cm^{-1} and *sym* at 2854 cm^{-1} , are shifted to 2915 and 2848 cm^{-1} , respectively. This change is in agreement with the crystallization of the MUDOL alkyl chains around GNRs. Indeed, the energy of the CH_2 stretching transitions has been reported to be a sensitive indicator of the order in alkyl chains since it depends on the incidence of the gauche conformation effects.⁴⁷ FTIR data thus suggest that CTAB is

exchanged for MUDOL and that the latter molecules are densely packed at the gold surface. Next, to control the electrostatic repulsion between colloids, the positive CTAB was exchanged for various mixtures of neutral MUDOL and negative MUDIC. As a consequence, agarose gel electrophoresis appears to be a pertinent technique to reveal differences in nanorod surface charge (see Figure 1b). When using only MUDOL, particles move toward the negatively charged electrode, which can be attributed to the residual presence of CTAB molecules at the interface. Noticeably, the fact that migration was clearly demonstrated confirms ligand substitution because CTAB GNRs are well-known to aggregate in loading pits due to their low colloidal stability.^{36,48} Furthermore, by increasing the ratio of negatively charged MUDIC in the capping layer, we noticed that the particle charge progressively vanished and then reversed. Some of these effects were qualitatively confirmed by measurements of the GNR surface zeta potential, which varies from $+55\text{ mV}$ in the case of “as-synthesized” CTAB nanorods to $+8\text{ mV}$ for colloids functionalized with pure MUDOL and purified from excess reagent.

In order to incorporate 3D GNR crystals into devices, one first has to self-assemble them on a substrate that enables easy handling and further processing. Additionally, it would also be beneficial to spatially direct material growth in any desired macroscopic shape.^{49–51} As a proof of concept, we here rely on microtextured surfaces made of polydimethylsiloxane, similar to the ones that are used to achieve specific hydrodynamic or wetting effects (*e.g.*, the polygonal spreading of a drop).⁵² More specifically, cylindrical microposts of height $35\text{ }\mu\text{m}$ and diameter $100\text{ }\mu\text{m}$ were arranged on a square array whose lattice parameter is

175 μm (see Figure 2a). A 1 μL droplet of $\sim 10^{-6}$ M pure MUDOL GNR suspension is confined between a smooth surface (silicon wafer, ITO, or gold-coated glass slide) and the elastomeric stamp before being allowed to dry at room temperature for 10 h (see Figure 2a). In addition to the already present 0.5 mM CTAB, the colloidal solution also contains 0.1 mM Tween 20 so as to improve the degree to which the substrate is wet by the liquid. After complete water evaporation, the PDMS template is removed to yield brown traces over the whole area previously covered by the liquid.

The features present on the sample are characterized at different scales using bright field optical microscopy and SEM. Images show regular patterns, as high as the stamp is deep. They consist of linear walls connected to rings; the former are reminiscent of pinned capillary bridges, while the latter correspond to the column footprints (see Figure 2b–d). When a drop of the same colloidal suspension is dried without confinement, *i.e.*, without applying any PDMS mold, we observe stains made of disordered nanorods, limited in both height and size to a few micrometers and tens of micrometers, respectively (see Figure S5); these results concur with previously published investigations.^{45,53} In another complementary experiment, the interdistance between pillars is changed so that the shape of the contact lines and the final morphology of the deposited solid can be altered. Increasing the square lattice parameters from 175 to 350 μm yields tetrapod features in between groups of four adjacent posts instead of simple walls joining two closest neighbors (compare Figure 2c and Figure S13a–c). Patterns are also broader and higher due to the shorter contour length associated with the new geometry. Nevertheless, the nano-scale architecture seems preserved (compare Figure 3a below and Figure S13d). Finally, it is worth noticing that in all cases the presence of Tween 20 is critical to stabilize the liquid bridges between pillars. Indeed in a control experiment where this neutral detergent was omitted, almost no wall was formed (see Figure S6). This research, being mainly dedicated to the control of colloidal assembly through surface charge tuning, the physical mechanisms controlling the drying process, and the subsequent formation of the superstructures, will be published elsewhere.

High-magnification SEM views show that GNRs are densely packed within walls (see Figure 3). Indeed, during the liquid-film thinning colloids are concentrated toward the triple contact line, at the junction between the air, the solution, and the substrate. Seen along their main axis, nanorods appear to follow a hexagonal order, with monodomains larger than 1 μm^2 (see Figure 3a and b). To subsequently investigate the internal structure of the produced solid, we have adopted three different approaches: either defects on the surface were observed (see Figure 3c and d), or the substrate was cleaved perpendicularly to a wall

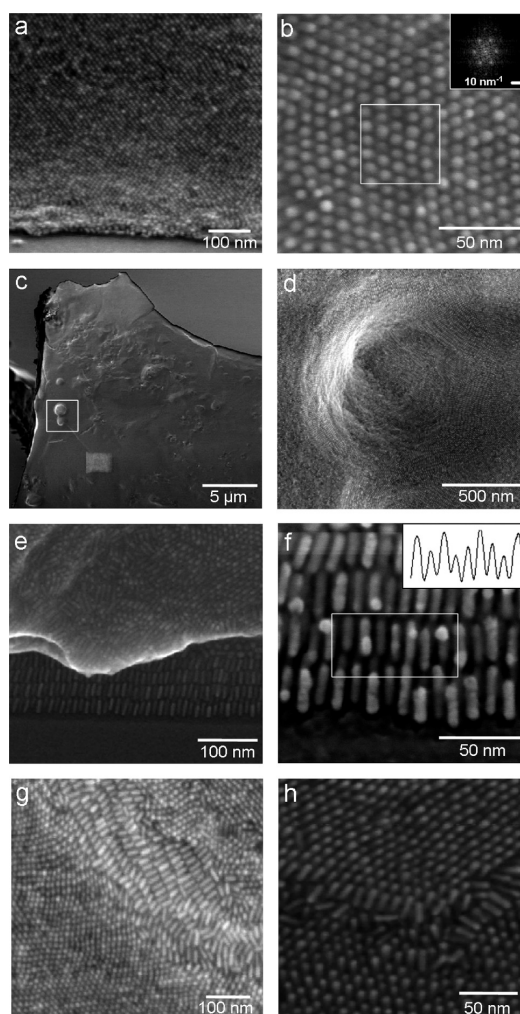


Figure 3. SEM images of the structures obtained from drying between a silicon substrate and a PDMS mold a suspension of pure MUDOL GNRs. (a, b) Hexagonal packing at the wall surface. Fourier analysis was performed on a $\sim 50 \times 50 \text{ nm}^2$ area. (c, d) Investigation of a concave defect. The cavity displays several micrometer sized smectic B domains. (e, f) Lamellar organization at the substrate vicinity revealed due to substrate cleaving. The intensity profile is plotted along a single nanorod layer. (g, h) Unambiguous smectic B ordering imaged after resection of a part of the solid with micromanipulators.

(see Figure 3e and f), or a part of the latter superstructure was removed with a micrometer-size tool (see Figure 3g and h as well as Figure S7). In all three cases, lamellae made of GNRs arranged side-by-side are evidenced. However, only images of fractures performed with the micromanipulator allow one to obtain both top and side views, which unambiguously reveal the smectic B (SmB) nature of the created colloidal crystal (see Figure 3g and h). Interestingly, in the vicinity of both the substrate and the former air/solution interface, particles are especially well-organized; they all stand perpendicular to the surface (see Figure 3e). A quantitative analysis of these images is next provided. By displaying six peaks perfectly

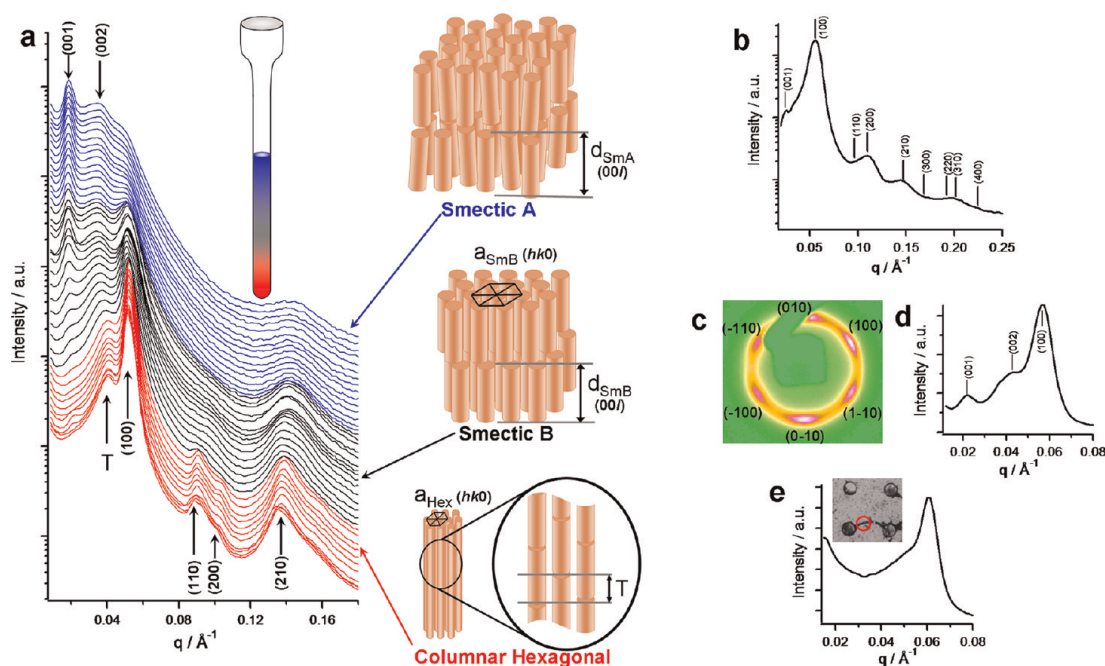


Figure 4. SAXS spectra of a MUDOL GNR suspension dried in a capillary. (a) Data acquired on the SWING beamline at SOLEIL ~ 12 h after the onset of evaporation. Measurements were performed at different positions along the longitudinal axis of the tube, hence evidencing three different organizations: a columnar hexagonal phase at the bottom, a smectic A one at the opening, and a smectic B phase in-between (for clarity, scattered intensity plots have been shifted in ordinate, according to the place where they were collected in the sample). Peaks related to a lamellar order are denoted (00 l) and T . Peaks related to the hexagonal parameters a_{hex} and a_{SmB} are denoted ($hk0$). The corresponding rod organizations are also sketched. (b, d) Data for the same sample, obtained on our in-house setup ~ 5 months later. (b) Spectrum of the smectic A phase. (c) Corresponding X-ray diffuse scattering along the 6-fold axis of the smectic B organization. (d) High-resolution SAXS enlightening the coexistence of lamellar and hexagonal orders. (e) Microfocus SAXS spectrum collected *in situ* on a wall produced by drying between a substrate and a PDMS mold. The beam size and its position are indicated by the red circle drawn in the inset.

arranged on a hexagon, Fourier transform (FT) of views captured along the GNR main axis confirms the hexagonal intralamella order (see the inset in Figure 3b); a hexagonal lattice parameter, $a_{\text{SmB}} = 9.5 \pm 0.2$ nm, can even be extracted. This value is incidentally verified by plotting intensity profiles along lamella cross sections and measuring the curves' periodicity: it yields $a_{\text{SmB}} \approx 10$ nm (see the inset in Figure 3f). Finally, from the latter images, a rough estimate of the lamellar order lattice parameter is easy to determine: we find $d_{\text{SmB}} \approx 24$ nm.

We next study nanorods self-assembling using SAXS to further unravel the structural properties of the obtained crystal. These bulk experiments are performed by letting suspensions of functionalized GNRs dry at room temperature in ~ 1.5 mm diameter glass capillaries, the initial particle concentration being $\sim 10^{-8}$ M. Our first high-resolution synchrotron SAXS measurements were achieved on the sample typically 12 h after the drying onset. Powder diffraction patterns are obtained, indicating crystalline domains smaller than the $400 \times 50 \mu\text{m}^2$ beam size. Furthermore, the 500 data sets collected along the tube axis display a continuous evolution of the scattered intensity plots (see Figure 4a). More precisely, at the capillary opening a lamellar structure is characterized by two Bragg peaks at 0.018 and $0.035 \text{ \AA}^{-1}$. No lateral order between GNRs

can be evidenced, and thus this signature is attributed to a smectic A arrangement (SmA) with a repetition distance $d_{\text{SmA}} = 35 \pm 2$ nm. Conversely, at the closed end of the tube we find a hexagonal lateral packing (Hex), as indicated by four Bragg peaks at 0.0515, 0.0894, 0.1029, and $0.1375 \text{ \AA}^{-1}$, with a respective distance ratio of $1:\sqrt{3}:2:\sqrt{7}$. These values correspond to a mean interdistance between nanorods $a_{\text{Hex}} = 14.0 \pm 0.3$ nm. In addition, the hexagonal phase spectrum presents an additional diffuse scattering at $0.0405 \text{ \AA}^{-1}$. Although the latter steadily shifts to the second-order Bragg diffraction of the lamellar phase, it cannot be indexed here as such because of the absence of any first-order signature. Nevertheless, since the discussed peak is associated with a 17 ± 0.5 nm spacing, *i.e.*, $\sim d_{\text{SmA}}/2$, we propose to assign it to a half-length translation between adjacent GNRs (see the schemes in Figure 4a). Finally, at the intermediate part of the tube, a higher order phase exhibits scatterings typical of both hexagonal and lamellar order, in agreement with a smectic B arrangement.

It is important to remark that the present SAXS investigations, conducted after only a few hours drying, are not perfectly consistent with SEM observations. Consequently, we hypothesized that the sample was still out-of-equilibrium, and accordingly we have

reanalyzed it on our custom-made setup after complete water evaporation. The capillary content is now more homogeneous, and it exhibits signatures typical of both hexagonal and lamellar order (see Figures 4b and S8). Oriented domains larger than the beam size, *i.e.*, $\sim 300 \times 300 \mu\text{m}^2$, can even be evidenced (see Figure 4b). The 6-fold symmetry is confirmed by the observation of six peaks associated with the first-order scattering by a lateral hexagonal packing along the direction normal to the tube wall (see Figure 4c). Yet, in this orientation the Bragg peaks corresponding to the arrangement perpendicular to the nanorods' main axis cannot be emphasized because the monodomain is very well aligned. Incidentally, this observation agrees with the SEM images collected when drying proceeds between a silicon wafer and a PDMS stamp (see Figure 3e and f): nanorods tend to stand upright on interfaces. High-resolution acquisitions on multi-domain areas were then achieved, and they demonstrate the coexistence of two first (00l) lamellar peaks and of the (100) hexagonal one (see Figure 4d); we can therefore conclude that GNRs are here also organized according to a smectic B order. For the lattice parameters, one computes from the experimental data $a_{\text{smB}} = 11.3 \pm 0.1 \text{ nm}$ and $d_{\text{smB}} = 24 \pm 1 \text{ nm}$, both matching quite well the values extracted from FT analysis of SEM images. Furthermore, when comparing the new results with the SAXS measurements conducted on the freshly dried suspension (*i.e.*, a_{Hex} and d_{smA} , respectively), we note a clear decrease of the interdistances. We attribute this observation to the slow dehydration of the polyethylene glycol ligands present at the nanorod surface. To summarize, MUDOL GNR self-assembling induced by slow water evaporation in a glass capillary first yields a smectic A/hexagonal polymorphism, which progressively transforms to smectic B local order upon complete drying.

In the absence of any kinetic investigation on the faster drying process involving a thinner film of colloidal suspension confined between a smooth and a topographically patterned surface, the preceding scenario is established only for bulk crystallization. However, we are confident that in both cases the system reaches a similar organization at thermodynamic equilibrium. Indeed, SEM data acquired on GNR walls and SAXS ones collected in a capillary provide results in good agreement. This fact is further confirmed by the $a_{\text{smB}} = 10.3 \pm 0.2 \text{ nm}$ value measured by microfocused SAXS on features dried between a nelophan membrane and a PDMS mold (see Figure 4e). Unfortunately, we could not rely on microfocused WAXS to reinforce the SEM observations of nanorod alignment perpendicular to the substrate¹² because the cubic crystalline system of the GNR colloids does not exhibit split Bragg peaks (see Figure S2). Nonetheless, we estimate that our set of measurements is comprehensive enough to allow a unified description of the most stable structure,

i.e., the one obtained after complete dehydration. The structure of the colloidal crystal should be unique whatever the considered formation mechanism, thus enabling a cross use of SEM and SAXS experiments. Finally, as Tween 20 is introduced only in GNR suspensions employed for wall formation, to definitely validate our methodological approach, we check this surfactant innocuousness with respect to self-assembly. As proved by SEM pictures and SAXS spectra collected on samples with and without the neutral detergent, no adverse effects could be evidenced (respectively compare Figures 3e and S11c as well as the two curves of Figure S9).

To investigate the role of electrostatic interactions in nanorod organization, various particle coatings, at different MUDOL/MUDIC ratios, are examined with respect to the final material morphology. We first used the PDMS stamp drying method. Similarly to the case of pure MUDOL, well-ordered assemblies of smectic B domains are observed by SEM for a 80/20 MUDOL/MUDIC composition (see Figure 5a and b). In contrast, disordered aggregates are obtained when the colloids are functionalized with an equimolar mixture of both ligands (see Figure 5c and d). We next tried to more precisely characterize samples by FT analysis of SEM views. Although many areas of the wall surface exhibit nearly hexagonal packing when MUDIC is present at 20% (see the arrangement of the six peaks in Figure 5b inset), it is very difficult to discern any lattice when the proportions of neutral and negative ligands are equal. Consequently, image autocorrelation appeared a more promising method to evaluate the spacing between nanorods. From the radial profiles issued from circular integration of the processed data, we estimate the colloid interdistance to vary from $a_{\text{smB}}(100/0) \approx 8.9 \text{ nm}$ to $a_{\text{smB}}(80/20) \approx 10.2 \text{ nm}$ when MUDIC is added to MUDOL as to represent one-fifth of the mixture (see Figure 5e and Figure S12). As far as an ordered area could be discovered in the 50/50 MUDOL/MUDIC sample (see Figure S12c), we also could compute $a_{\text{smB}}(50/50) \approx 12.1 \text{ nm}$. In parallel with the preceding experiments, SAXS measurements are done on GNR suspensions that have been dried in capillaries. Our custom-made setup yields data that unambiguously reinforced SEM observations. In the pure MUDOL case, four peaks are observed, which correspond to a respective distance ratio of $1:\sqrt{3}:2:\sqrt{7}$, which can be indexed in a hexagonal lattice (see Figure 5f). Thereafter, the packing quality decreases when the ratio of negatively charged MUDIC increases, as demonstrated by the broadening of the secondary peaks. At the same time, the first-order peak is shifted to smaller q , indicating that the intercolloid spacing becomes larger; it gains more than 1 nm when the MUDIC content reaches 50%. Finally, assemblies of nanorods capped with various MUDOL/MUDIC mixtures were also analyzed by TEM. Despite the fact that sample preparation

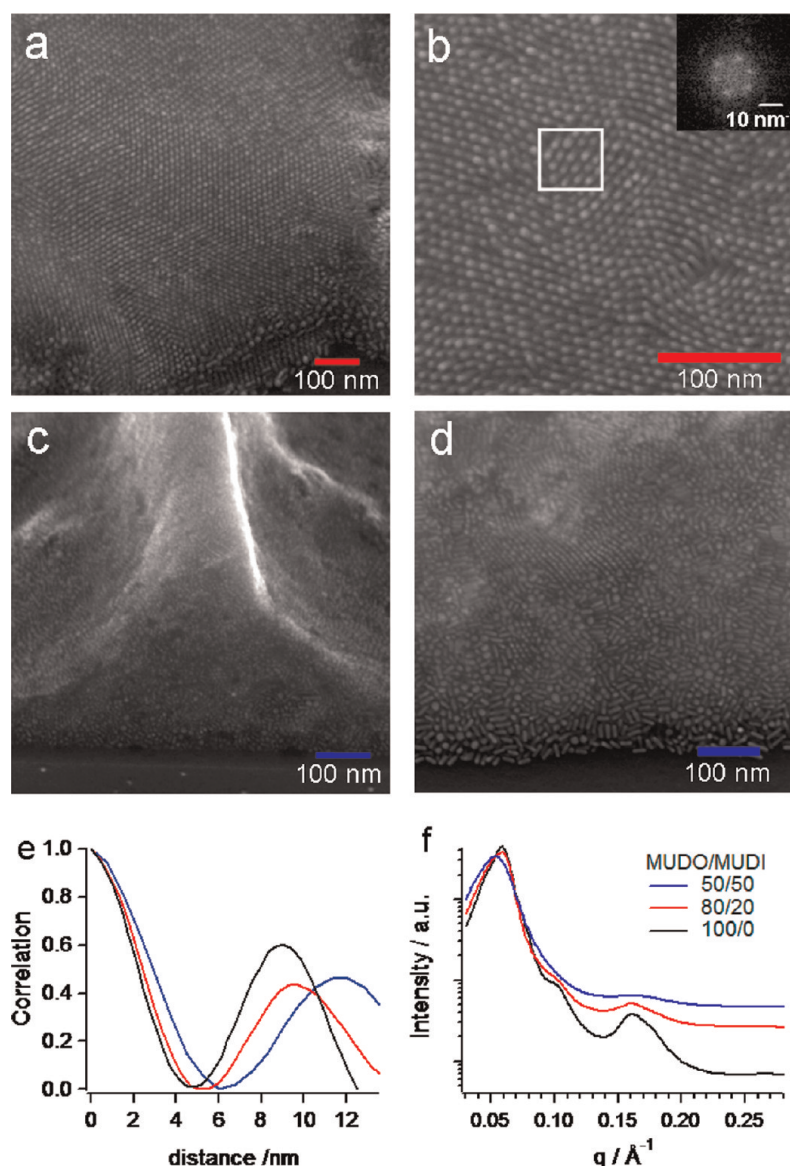


Figure 5. Characterization of self-assemblies resulting from drying suspensions of GNRs capped with different mixtures of neutral and negative alkanethiolates. (a, b) SEM images of the walls produced when evaporation takes place between a silicon substrate and a PDMS stamp and when the MUDOL/MUDIC ratio is equal to 80/20. The inset shows the FT of the area enclosed in the white square. (c, d) SEM images of similar features corresponding to a 50/50 MUDOL/MUDIC ratio. (e) Autocorrelation analysis performed on the SEM views of the structure surface (see Figure S10). Data for three MUDIC percentages are presented: black 0%, red 20%, and blue 50%. (f) SAXS analysis of the solids obtained upon dehydration of colloidal solutions contained in glass capillaries.

here implies a third kind of drying protocol, images evidence already-seen trends: GNRs organize into well-defined side-to-side aggregates, which include several tens of particles for pure MUDOL, 10 of them for 80/20 MUDOL/MUDIC, and only pairs for 50/50 MUDOL/MUDIC (see Figure S4). Therefore, all the experiments prove that mastering nano-objects' surface potential is of foremost importance to obtain organized supracrystals. Additionally, over a given distance range electrostatic repulsion can serve to impose a precisely tuned lattice parameter. However, the strength of this repulsive potential has to be maintained weak enough in order not to inhibit self-assembling. As evidenced

by the control observations performed on the “as-synthesized” colloids, which are capped by the sole CTAB, being too strongly charged only results in disordered aggregates (see Figure S11a and b for SEM, Figure S10 for SAXS, and Figure S4a for TEM).

CONCLUSION

We introduced a method opening access to the formation of 3D gold nanorod superstructures having a local smectic B order. We also discussed the importance of surface functionalization, which enables tuning repulsive and attractive forces acting on the GNRs so as to help their self-organization; more precisely,

particles are coated with the neutral MUDOL ligand, optionally supplemented with the negative MUDIC one (up to a few tens of percents). Colloid anisotropy results in a smectic B condensed phase with a lamellar parameter around 25 nm and a hexagonal one around 10 nm, depending on the amount of negatively charged capping agent. We obtain well-defined wall features when the nanorod solution is dried between a smooth surface and a topographically patterned PDMS stamp in the presence of the Tween 20 surfactant. This textured surface allows us to fix a slow and regulated evaporation rate and to define at the millimeter scale the shape of the final nanomaterial. Indeed, our experiments show that the motion of the contact line during drying is strongly affected by the micrometer-size features of the mold. Pinning of the meniscus yields the formation of capillary bridges, which evolve over time to become an engineered superstructure made of 3D walls of smectic B GNRs. Spatially controlled deposition of gold nanoparticles has previously been conducted using either passive processes, based on electrostatic and capillary forces, or active transfer involving PDMS stamps inked with thiolates. However, both strategies lead only to 2D-restricted assemblies.⁵⁴

Microwires were also generated by evaporation of a suspension of 20 nm diameter gold colloids in the interstices of a 2D crystal built of polystyrene latexes.⁵⁵ Although the latter method provides an alternative way for shaping self-assemblies of nanoparticles, it appears to be limited in terms of geometries. In comparison, our approach offers a low-cost way to truly order GNRs precisely and reproducibly within 3D macroscopic configurations (in the present case periodic arrays extending over several square millimeters). Our findings could then facilitate the elaboration of functional materials. For example, interesting developments could emerge in SERS or plasmonic detection where crystalline ordering would favor a much higher sensitivity than the one expected from sensors fabricated by classical drying techniques on a smooth substrate.^{3,16} Additionally, the manufacturing protocol presented here could be extended to any kind of water-soluble anisotropic colloids provided the optimization of an appropriate chemical coating. For instance, application to semiconductor nanocrystals would be a plus, as they are attractive candidates for both photocatalytic and photovoltaic devices.⁵⁶

METHODS SECTION

Synthesis of Gold Nanorods. Synthesis was achieved relying on a previously described one-pot procedure.^{31,33} Particles with an absorption maximum at 750 nm were obtained 20 min after the reducing agent addition. Next, starting with 10 mL of crude reactive mixture, the excess CTAB was removed by two washing cycles, which included centrifugation at 14000g for 10 min and pellet dissolution in 10 mL of CTAB prepared at 0.5 mM in Milli-Q water of resistivity 18.2 M Ω . The nanorod concentration was finally derived from the optical density measured at 750 nm and the extinction coefficient provided in the literature.⁵⁷ The titer of this stock solution of “as-synthesized” GNRs was found to be $\sim 4 \times 10^{-10}$ M.

GNR Grafting. This was accomplished by simply adding 10 μ L of a 10 mM aqueous solution of ligand to 1 mL of the previous colloidal suspension. The mixture was vortexed briefly and then stirred at room temperature for 24 h. The exchange was subsequently controlled by electrophoresis, a 0.5% agarose gel was used, and migration was performed for 45 min in 20 mM borate buffer, pH 8.5, under a 3.3 V $\cdot$ cm $^{-1}$ electric field. After functionalization, all GNR suspensions were employed for self-assembling experiments without any further purification. In order to remove the excess ligand, only FTIR samples were prepared by three dialyses of a 10 $^{-9}$ M GNR suspension (1 mL) against an aqueous solution (1 L) containing TMD 8 mixed bed resin (10 g; Sigma).

Transmission Electron Microscopy. TEM was conducted on the JEOL 1400 apparatus of the microscopy platform at Rennes 1 University. Samples were prepared by depositing drops of colloidal suspension at 10 $^{-9}$ M onto grids (Formvar/carbon on 300 mesh copper, Agar Scientific) and letting them dry at room temperature for 12 h. The mean length and diameter of the GNRs were determined from the corresponding size histograms, established with the open access ImageJ software.

Small-Angle X-ray Scattering. SAXS measurements were performed on either a custom-made setup⁵⁸ or the high brilliance SWING beamline (12 keV) located at the Soleil synchrotron

facility.⁵⁹ Except in Figure 5c, all samples exhibited powder diffraction patterns; thus, circular integration allowed one to plot the scattering intensity as a function of the radial wave vector $q = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$. Self-assembled condensed phases were prepared in 1.3–1.6 mm diameter glass capillaries (Glas-Technik & Konstruktion Müller & Müller OHG). Typically, the GNR suspension was at an initial concentration of $\sim 10^{-8}$ M. It was prepared in 0.5 mM CTAB, and Tween 20 was added only in the control experiment reported in Figure S9; its titer was then 0.1 mM. The still “wet” sample investigated at Soleil was dried for 12 h, and the completely dehydrated samples characterized in Rennes were desiccated for more than 48 h in a box containing phosphore pentoxide (Aldrich).

3D GNR Self-Assembling onto a Solid Substrate. This was carried out by controlled drying of colloidal suspensions between a smooth surface and a topographically patterned one. More precisely, a microtextured stamp was first manufactured in PDMS (Sylgard 184, Dow Corning) relying on standard soft lithography protocols⁶⁰ and on a 35 μ m deep master mold fabricated in negative photoresist (SU8-2025, Microchem). Two square arrays of 100 μ m diameter pillars were used, the lattice parameter being either 175 or 350 μ m. Meanwhile, “as-synthesized” or chemically modified GNRs were prepared at 10 $^{-6}$ M in 0.5 mM CTAB supplemented with 0.1 mM Tween 20; the latter neutral detergent was always present except in some of the experiments displayed in Figures S6 and S11a and c. A 1 μ L droplet of this solution was next casted between the substrate and the elastomeric template. Drying took place at room temperature for about 10 h before the removal of the PDMS cover.

Scanning Electron Microscopy. Images were recorded on a Magellan 400 L (FEI) with settings as follows: acceleration voltage 5 kV, probe current 0.2 nA, working distance 3.9 mm. Features were here obtained by drying the colloidal solutions on (100) silicon wafers of resistivity 1–10 $\Omega \cdot$ cm $^{-1}$. Moreover, to gain insight into the internal structure of GNR self-assemblies, we depended on two tricks. Either we simply cleaved the

samples to allow cross sectional observation, or we broke the walls apart with MM3A-M micromanipulators (Kleindiek Nanotechnik) mounted on a Leo 1430 microscope (Zeiss). Fourier transform computation was achieved with ImageJ, whereas autocorrelation analysis was undertaken relying on DigitalMicrograph (Gatan).

Conflict of Interest: The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgment. V.M.A. and C.G. thank the Agence Nationale de la Recherche (ANR) for financial support through the "BioModulator" grant obtained on the 2008 PNANO program. V.M.A. and F.A. acknowledge the Direction Générale de l'Armement (DGA), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and the Région Bretagne for the Ph.D. fellowships of C. H., M.P., and T.B. We are also indebted to A. Burel (TEM Mric-UMS 3480-Biosit-Université de Rennes1 platform) for her technical expertise in TEM, to G. Hwang and L. Couraud (LPN-CNRS) for conducting the micromanipulators, and to C. Meriadec (IPR-CNRS) and F. Meneau (Swing, SOLEIL) for high-quality assistance with X-ray experiments. We are grateful for the access to the SOLEIL synchrotron radiation facilities, where preliminary experiments were performed.

Supporting Information Available: This section includes TEM size histogram of GNRs (Figure S1), WAXS spectrum of a GNRs suspension dried in a glass capillary (Figure S2), absorbance spectra of GNRs during the exchange of CTAB for MUDOL (Figure S3), TEM images of GNRs capped with CTAB or different MUDOL/MUDOL ratios (Figure S4), SEM images of a MUDOL GNR suspension dried on a wafer without using any PDMS mold (Figure S5), optical micrographs of the GNR features obtained while drying colloidal suspensions between a mold and a substrate with and without Tween 20 and for both CTAB and MUDOL coating (Figure S6), SEM image of the micromanipulator (Figure S7), SAXS spectra collected for the MUDOL GNR sample after complete drying in a glass capillary (Figure S8), SAXS spectra of MUDOL GNRs after drying in glass capillaries in the presence or absence of Tween 20 (Figure S9), SAXS spectra of CTAB GNRs and MUDOL GNRs after drying in glass capillaries (Figure S10), SEM images of GNR features obtained while drying colloidal suspensions between a mold and a substrate with and without Tween 20 and for both CTAB and MUDOL coating (Figure S11), SEM images of the wall surface for GNRs capped with different ratios of MUDOL/MUDOL ligands (Figure S12), SEM images of features obtained while drying a MUDOL GNR suspension between a substrate and a mold where pillars are not spaced by 175 but 350 μm (Figure S13). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES AND NOTES

- Link, S.; El-Sayed, M. A. Optical Properties and Ultrafast Dynamics of Metallic Nanocrystals. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2003**, *54*, 331–366.
- Jones, M. R.; Osberg, K. D.; Macfarlane, R. J.; Langille, M. R.; Mirkin, C. A. Templated Techniques for the Synthesis and Assembly of Plasmonic Nanostructures. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *111*, 3736–3827.
- Stewart, M. E.; Anderton, C. R.; Thompson, L. B.; Maria, J.; Gray, S. K.; Rogers, J. A.; Nuzzo, R. G. Nanostructured Plasmonic Sensors. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *108*, 494–521.
- Noginov, M. A.; Zhu, G.; Belgrave, A. M.; Bakker, R.; Shalae, V. M.; Narimanov, E. E.; Stout, S.; Herz, E.; Suteewong, T.; Wiesner, U. Demonstration of a Spaser-Based Nanolaser. *Nature* **2009**, *460*, 1110–1112.
- Cattoni, A.; Ghenuche, P.; Haghir-Gosnet, A.-M.; Decanini, D.; Chen, J.; Pelouard, J.-L.; Collin, S. Plasmonic Nanocavities for Biosensing Fabricated by Soft UV Nanoimprint Lithography. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 3557–3563.
- Onsager, L. The Effects of Shape on the Interaction Between Colloidal Particles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1949**, *51*, 627–659.
- Liu, K.; Zhao, N.; Kumacheva, E. Self-Assembly of Inorganic Nanorods. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 656–671.
- Nikoobakht, B.; Wang, Z. L.; El-Sayed, M. A. Self-Assembly of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 8635–8640.
- Murphy, C. J.; Sau, T. K.; Gole, A. M.; Orendorff, C. J.; Gao, J.; Gou, L.; Hunyadi, S. E.; Li, T. Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 13857–13870.
- Jana, N. R. Shape Effect in Nanoparticle Self-Assembly. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 1536–1540.
- Link, S.; El-Sayed, M. A. Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8410–8426.
- Zanella, M.; Gomes, R.; Povia, M.; Giannini, C.; Zhang, Y.; Riskin, A.; Van Bael, M.; Hens, Z.; Manna, L. Self-Assembled Multilayers of Vertically Aligned Semiconductor Nanorods on Device-Scale Areas. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 2205–2209.
- Eustis, S.; El-Sayed, M. Aspect Ratio Dependence of the Enhanced Fluorescence Intensity of Gold Nanorods: Experimental and Simulation Study. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 16350–16356.
- Tripathy, S.; Marty, R.; Lin, V. K.; Teo, S. L.; Ye, E.; Arbouet, A.; Saviot, L.; Girard, C.; Han, M. Y.; Mlayah, A. Acousto-Plasmonic and Surface-Enhanced Raman Scattering Properties of Coupled Gold Nanospheres/Nanodisk Trimers. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 431–437.
- Kumar, J.; Thomas, K. G. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Investigations at the Nanorod Edges and Dimer Junctions. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 610–615.
- Alvarez-Puebla, R. A.; Agarwal, A.; Manna, P.; Khanal, B. P.; Aldeanueva-Potel, P.; Carbó-Argibay, E.; Pazos-Pérez, N.; Vigderman, L.; Zubarev, E. R.; Kotov, N. A.; *et al.* Gold Nanorods 3D-Supercrystals as Surface Enhanced Raman Scattering Spectroscopy Substrates for the Rapid Detection of Scrambled Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 8157–8161.
- Baranov, D.; Manna, L.; Kanaras, A. G. Chemically-Induced Self Assembly of Spherical and Anisotropic Nanocrystals. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 16694–16703.
- Cortie, M. B.; McDonagh, A. M. Synthesis and Optical Properties of Hybrid and Alloy Plasmonic Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *111*, 3713–3735.
- Huang, X.; Neretina, S.; El-Sayed, M. A. Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 4880–4910.
- Sau, T. K.; Rogach, A. L.; Jäkel, F.; Klar, T. A.; Feldmann, J. Properties and Applications of Colloidal Nonspherical Noble Metal Nanoparticles. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 1805–1825.
- Romo-Herrera, J. M.; Alvarez-Puebla, R. A.; Liz-Marzan, L. M. Controlled Assembly of Plasmonic Colloidal Nanoparticle Clusters. *Nanoscale* **2011**, *3*, 1304–1315.
- Shevchenko, E. V.; Talapin, D. V.; Kotov, N. A.; O'Brien, S.; Murray, C. B. Structural Diversity in Binary Nanoparticle Superlattices. *Nature* **2006**, *439*, 55–59.
- Nie, Z. H.; Fava, D.; Rubinstein, M.; Kumacheva, E. Supramolecular Assembly of Gold Nanorods End-Terminated with Polymer "Pom-Poms": Effect of Pom-Pom Structure on the Association Modes. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3683–3689.
- Dong, A.; Chen, J.; Vora, P. M.; Kikkawa, J. M.; Murray, C. B. Binary Nanocrystal Superlattice Membranes Self-Assembled at the Liquid-Air Interface. *Nature* **2010**, *466*, 474–477.
- Jana, N. R. Shape Effect in Nanoparticle Self-Assembly. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 1536–1540.
- Nie, Z. H.; Petukhova, A.; Kumacheva, E. Properties and Emerging Applications of Self-Assembled Structures Made from Inorganic Nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 15–25.
- Titov, A. V.; Kral, P. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 3605–3612.
- Zanella, M.; Bertoni, G.; Franchini, I. R.; Brescia, R.; Baranov, D.; Manna, L. Assembly of Shape-Controlled Nanocrystals by Depletion Attraction. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 203–205.
- Baranov, D.; Fiore, A.; van Huis, M.; Giannini, C.; Falqui, A.; Lafont, U.; Zandbergen, H.; Zanella, M.; Cingolani, R.; Manna,

- L. Assembly of Colloidal Semiconductor Nanorods in Solution by Depletion Attraction. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 743–749.
30. Walker, D. A.; Browne, K. P.; Kowalczyk, B.; Grzybowski, B. A. Self-Assembly of Nanotriangle Superlattices Facilitated by Repulsive Electrostatic Interactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 6760–6763.
 31. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template. *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 1389–1393.
 32. Hubert, F.; Testard, F.; Spalla, O. Cetyltrimethylammonium Bromide Silver Complex as the Capping Agent of Gold Nanorods. *Langmuir* **2008**, *24*, 9219–9222.
 33. Jana, N. R. Gram-Scale Synthesis of Soluble, Near-Monodisperse Gold Nanorods and Other Anisotropic Nanoparticles. *Small* **2005**, *1*, 875–882.
 34. Murphy, C. J.; Thompson, L. B.; Chernak, D. J.; Yang, J. A.; Sivapalan, S. T.; Boulos, S. P.; Huang, J.; Alkilany, A. M.; Sisco, P. N. Gold Nanorod Crystal Growth: From Seed-Mediated Synthesis to Nanoscale Sculpting. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2011**, *16*, 128–134.
 35. Sreeprasad, T. S.; Samal, A. K.; Pradeep, T. One-, Two-, and Three-Dimensional Superstructures of Gold Nanorods Induced by Dimercaptosuccinic Acid. *Langmuir* **2008**, *24*, 4589–4599.
 36. Park, S.; Sinha, N.; Hamad-Schifferli, K. Effective Size and Zeta Potential of Nanorods by Ferguson Analysis. *Langmuir* **2010**, *26*, 13071–13075.
 37. Murphy, C. J.; Thompson, L. B.; Alkilany, A. M.; Sisco, P. N.; Boulos, S. P.; Sivapalan, S. T.; Yang, J. A.; Chernak, D. J.; Huang, J. The Many Faces of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, 2867–2875.
 38. Jones, M. R.; Macfarlane, R. J.; Lee, B.; Zhang, J.; Young, K. L.; Senesi, A. J.; Mirkin, C. A. DNA-Nanoparticle Superlattices Formed from Anisotropic Building Blocks. *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 913–917.
 39. Dujardin, E.; Hsin, L.-B.; Wang, C. R. C.; Mann, S. DNA-Driven Self-Assembly of Gold Nanorods. *Chem. Commun.* **2001**, 1264–1265.
 40. Caswell, K. K.; Wilson, J. N.; Bunz, U. H. F.; Murphy, C. J. Preferential End-to-End Assembly of Gold Nanorods by Biotin-Streptavidin Connectors. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13914–13915.
 41. Nie, Z.; Fava, D.; Kumacheva, E.; Zou, S.; Walker, G. C.; Rubinstein, M. Self-Assembly of Metal-Polymer Analogues of Amphiphilic Triblock Copolymers. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 609–614.
 42. Murphy, C. J. *Nanoparticles Assemblies and Superstructures*; CRC Press, 2005.
 43. Ming, T.; Kou, X.; Chen, H.; Wang, T.; Tam, H.-L.; Cheah, K.-W.; Chen, J.-Y.; Wang, J. Ordered Gold Nanostructure Assemblies Formed by Droplet Evaporation. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *120*, 9831–9836.
 44. Valiokas, R. n.; Svedhem, S.; Svensson, S. C. T.; Liedberg, B. Self-Assembled Monolayers of Oligo(ethylene glycol)-Terminated and Amide Group Containing Alkanethiolates on Gold. *Langmuir* **1999**, *15*, 3390–3394.
 45. Xie, Y.; Guo, S.; Ji, Y.; Guo, C.; Liu, X.; Chen, Z.; Wu, X.; Liu, Q. Self-Assembly of Gold Nanorods into Symmetric Superlattices Directed by OH-Terminated Hexa(ethylene glycol) Alkanethiol. *Langmuir* **2011**, *27*, 11394–11400.
 46. Svedhem, S.; Hollander, C.-Å.; Shi, J.; Konradsson, P.; Liedberg, B.; Svensson, S. C. T. Synthesis of a Series of Oligo(ethylene glycol)-Terminated Alkanethiol Amides Designed to Address Structure and Stability of Biosensing Interfaces. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4494–4503.
 47. Nuzzo, R. G.; Fusco, F. A.; Allara, D. L. Spontaneously Organized Molecular Assemblies. 3. Preparation and Properties of Solution Adsorbed Monolayers of Organic Disulfides on Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2358–2368.
 48. Pierrat, S.; Zins, I.; Breivogel, A.; Sonnichsen, C. Self-Assembly of Small Gold Colloids with Functionalized Gold Nanorods. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 259–263.
 49. Dinca, V.; Kasotakis, E.; Catherine, J.; Mourka, A.; Ranella, A.; Ovsianikov, A.; Chichkov, B. N.; Farsari, M.; Mitraki, A.; Fotakis, C. Directed Three-Dimensional Patterning of Self-Assembled Peptide Fibrils. *Nano Lett.* **2007**, *8*, 538–543.
 50. Kang, S. H.; Grinthal, A.; Aizenberg, J. Meniscus Litography: Evaporation-Induced Self Organization of Pillar Arrays into Moiré Patterns. *Phys. Rev. Lett.* **2011**, *107*, 177802.
 51. Pokroy, B.; Kang, S. H.; Mahadevan, L.; Aizenberg, J. Self-Organization of a Mesoscale Bristle into Ordered Hierarchical Helical Assemblies. *Science* **2009**, *323*, 237–240.
 52. Courbin, L.; Denieul, E.; Dressaire, E.; Roper, M.; Adjari, A.; Stone, H. A. Imbibition by Polygonal Spreading on Micro-decorated Surfaces. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 661–664.
 53. Deegan, R. D.; Bakajin, O.; Dupont, T. F.; Huber, G.; Nagel, S. R.; Witten, T. A. Capillary Flow as the Cause of Ring Stains from Dried Liquid Drops. *Nature* **1997**, *389*, 827–829.
 54. Aizenberg, J.; Braun, P. V.; Wiltzius, P. Colloid Deposition Controlled by Electrostatic and Capillary Forces. *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *84*, 2997–3000.
 55. Vakarelski, I. U.; Chan, D. Y. C.; Nonoguchi, T.; Shinto, H.; Higashitani, K. Assembly of Gold Nanoparticles into Micro-wire Networks Induced by Drying Liquid Bridges. *Phys. Rev. Lett.* **2009**, *102*, 058303.
 56. Shemesh, Y.; Macdonald, J. E.; Menagen, G.; Banin, U. Synthesis and Photocatalytic Properties of a Family of CdS-PdX Hybrid Nanoparticles. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 1185–1189.
 57. Liao, H.; Hafner, J. H. Gold Nanorod Bioconjugates. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 4636–4641.
 58. van Grondelle, W.; López Iglesias, C.; Coll, E.; Artzner, F.; Paternostre, M.; Lacombe, F.; Cardus, M.; Martinez, G.; Montes, M.; Cherif-Cheikh, R.; *et al.* Spontaneous Fibrillation of the Native Neuropeptide Hormone Somatostatin-14. *J. Struct. Biol.* **2007**, *160*, 211–223.
 59. Henry, E.; Dif, A.; Schmutz, M.; Legoff, L.; Amblard, F.; Marchi-Artzner, V.; Artzner, F. Crystallization of Fluorescent Quantum Dots within a Three-Dimensional Bio-Organic Template of Actin Filaments and Lipid Membranes. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 5443–5448.
 60. McDonald, J. C.; Duffy, D. C.; Anderson, J. R. Fabrication of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis* **2000**, *21*, 27–40.

1.2 Peptidic ligands to control the three-dimensional self-assembly of quantum rods in aqueous media

Soumis à *J. Phys. Chem.*

Peptidic ligands to control the three-dimensional self-assembly of quantum rods in aqueous media

Thomas Bizien,^{†,‡} Pascale Even-Hernandez,[†] Marie Postic,[‡] Elsa Mazari,[§] Soizic Chevance[†], Arnaud Bondon,[◇] Cyrille Hamon,[†] David Troadec,[§] Ludovic Largeau,[§] Christophe Dupuis,[§] Charlie Gosse,[§] Franck Artzner,[‡] Valérie Marchi^{†,*}

[†] Université de Rennes 1, CNRS UMR 6226, Institut des Sciences Chimiques de Rennes, Avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes, France

[‡] Université de Rennes 1, CNRS UMR 6251, Institut de Physique de Rennes, Avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes, France

[§] Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, LPN-CNRS, Route de Nozay, 91460 Marcoussis, France

[◇] Université de Rennes 1, CNRS UMR 6290, RMN-ILPSIM, PRISM-Biosit, 2 Avenue du Professeur Léon Bernard, 3504300 Rennes, France

[§] Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN), CNRS UMR 8520, Cité Scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Supporting Information Placeholder

ABSTRACT: Although the self-assembly of anisotropic particles remains a challenge in nanotechnology, we here introduce an original method to generate, on a macroscopic scale, three-dimensional supracrystals made of quantum rods. In a first step, nanorods are transferred in an aqueous phase thanks to the substitution of the original capping layer by peptidic ligands. Infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopies data prove that the exchange is complete; fluorescence spectroscopy demonstrates that the emitter optical properties are preserved; electrophoresis and dynamic light scattering experiments assess the good colloidal stability of the resulting aqueous suspension. In a second step, water evaporation in a microstructured environment yields superstructures in which nanorods obey a smectic B arrangement, as shown by electron microscopy. Incidentally, bulk drying in a capillary tube generates a similar local order, as evidenced by small angle X-ray scattering. In the present paper we thus validate the use of peptidic ligands as a generic chemical platform allowing one to finely control the organization in solid phase of semiconductor nanorods originally dispersed in an aqueous media.

INTRODUCTION

Anisotropic semi-conductor nanocrystals, as well as their collective assemblies, have emerged as a promising class of materials owing to their unique size- and shape-dependent optical properties.¹⁻⁵ In particular, core/shell quantum rods (QRs) challenge their quantum dots (QDs) counterparts for energy conversion and light harvesting due, for example, to their longer exciton lifetime and to the linear polarization that appears along their main axis under irradiation.⁶⁻⁸

Nevertheless, succeeding in the fabrication of functional devices still depends on our ability to integrate QRs on a macroscopic level. More specifically, the use of these nano-objects as building blocks to develop complex ordered structures – *via* a 'bottom-up' approach – necessitates to precisely tune interactions between particles and thus to perfectly control the surface chemistry of the individual crystallites. In addition, it would be valuable for any proposed technology to be low-cost and green. To date the only reported method that yielded three-dimensional (3D) features consisted in allowing an organic QRs suspension to evaporate until a supracrystal is formed, the atmosphere being saturated with solvent.^{2,9} Although representing a significant advance, this process may in the future lack of flexibility because colloidal behavior in organic phase is not as rich as in water. Recently, we have described an original strategy for shaping self-assemblies of gold nanorods (GNRs) by slow drying of the corresponding aqueous solution between a smooth substrate and a topologically micropatterned mold. Walls displaying a smectic B packing were then obtained, organized on a regular lattice over several square millimeters.¹⁰ Moreover, the spacing between particles could be varied by adjusting their surface charge and thus their interaction potential. Finally, our technique did not require expensive equipment and was clean because it mainly involved water evaporation. As a consequence, these promising results prompted some implementation with core/shell semi-conductor nanorods.

At the end of the synthesis, QRs are coated with hydrophobic ligands; hence, post-synthetic surface engineering is compulsory to obtain hydrophilic objects. Importantly, during this procedure one has to preserve both the colloidal stability and the photoluminescence properties of the nanocrystals. The different strategies that have been described for preparing water soluble nanorods from hydrophobic ones include coating chemical modification of the coating,^{11,12} polymer layer addition,¹³ silanization,¹⁴ cap exchange¹⁵ and

micellar encapsulation.¹² In the latter approach, peptides appear as very attractive ligands since their chemical structure can easily be devised first to strongly bind the QR surface, second to generate electrostatic and hydrophobic interparticle forces that are well balanced.¹⁶ It is also worth noting that those derivatives can advantageously be purchased from commercial providers, thereby avoiding one to engage itself in time-consuming synthesis. To the best of our knowledge, only one single example of peptides grafting onto semi-conductor rod-shape particles has been published.¹⁷ As a matter of fact we then largely built on our own experience with QDs.^{16,18} For instance, although several bidentate molecules, such as lipoic acid and histidine amino acids,^{19,20} have been proved to exhibit a fair affinity to semiconductor surface, we here favored species bearing a tri-cysteine moiety because we had previously shown that they yield a strong binding, resulting in stable aqueous suspensions.¹⁸ Concerning the various functional groups and spacers that can be introduced in the amino acid sequence, one can for instance rely on an alkyl chain to increase the ligand packing density. Conversely, an ethylene glycol spacer will promote solubility in water and generate a steric repulsion able to prevent aggregation. Moreover, ionizable groups grafted in terminal position, such as carboxylic acids or amines, will allow one to tune the particle charge. All in all, it will therefore be possible to design ligands that are optimized to stabilize nanorods in solution and that yield a final material with precisely defined properties.

To achieve the present study, we relied on CdSe/CdS nanorods because they can be synthesized with a high monodispersity and with variable aspect ratio.²¹ Furthermore, for the sake of clarity our approach is here demonstrated by focusing on a single peptide, although various molecular structures have revealed functional during our research. The crucial role of the coating for successful 3D self-assembly has motivated the utilization of a large set of techniques to understand binding events at the nanoparticle surface during the ligand exchange process.¹⁰ More precisely, fluorescence,²² infrared (FTIR)²³ and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopies²⁴ enabled us to show that the hydrophobic phosphorus molecules constituting the cap after synthesis could be completely replaced by peptides. Subsequently, we accessed the surface charge of the hydrophilized QRs, as well as their stability in water, by electrophoresis and by dynamic light scattering (DLS). We also checked that the optical properties of the particles had been preserved.

Finally, structural data on 3D assemblies were obtained thanks to two complementary experimental approaches: bulk colloidal crystal dried in capillaries tubes were analyzed by small angle X-ray scattering techniques (SAXS) whereas wall features resulting from casting and evaporating a QR suspension between a substrate and a polydimethoxysilane (PDMS) stamp were investigated by both scanning and transmission electron microscopies (SEM and TEM, respectively).

MATERIAL AND METHODS

Chemicals. We purchased cadmium oxide (CdO, 99.998%), selenium (S, 99.5%), and hexylphosphonic acid (HPA, 99%) from Alfa Aesar; sulfur (S, 99%) from Strem Chemical; trioctylphosphine oxide (TOPO, 99%), trioctylphosphine (TOP, 97%), octadecylphosphonic acid (ODPA, 97%), tetramethylammonium hydroxide (TMAOH, 25% w/w in methanol), and agarose (EEO 0.09-0.13) from Sigma-Aldrich. Peptides were synthesized and purified by HPLC (>90%) by Polypeptide (Strasbourg, France). The Britton and Robinson buffers with a constant ionic strength (20 mM) were prepared according to described protocols.²⁵

CdSe/CdS quantum rods synthesis. Following a procedure described by Carbone *et al.*,²⁶ CdSe seeds were obtained in a TOPO/TOP/ODPA mixture and CdSe/CdS core/shell nanorods were grown in a TOPO/TOP/ODPA/HPA mixture, both at 350 °C (see Supplementary Information for details). These as synthesized QRs were then washed by 3 centrifugation/redispersion cycles using a toluene/methanol (1/5) mixture and stored in a small amount of toluene until further use. In the following, the resulting purified particles are called “hydrophobic QRs”.

Electron microscopy of nanocrystals. For morphological analysis a 1.5 µL droplet of diluted hydrophobic QR suspension, at ~ 0.1 nM, was allowed to evaporate onto Formvar-carbon coated copper grids (Agar Scientific). Size histograms were then obtained from transmission electron microscopy²⁷ images recorded on a JEOL 1400 operating at 120 kV.

Conversely, for crystal structure determination the sample was prepared onto ~ 50 nm thick silicon nitride membrane (DuraSiN) and Z-contrast images were acquired on an aberration-corrected JEOL 2200FS operating at 200 kV in scanning transmission electron microscopy (STEM) mode, using a high angle annular dark field (HAADF) detector. Images were then Fourier transformed relying on ImageJ.

Peptide grafting. Just before functionalization the preceding hydrophobic QRs were washed 3 more times in a similar way, in order to remove all ligands remaining in solution. The final redispersion was achieved in chloroform so as to obtain 30 μL aliquots at 10 mg/mL. The latter organic suspension was next mixed with 90 μL of 20 mM aqueous peptide solution, an addition followed by the one of 5 μL of TMAOH at 25% (w/w) in methanol. Transfer of the fluorescent particles from the organic phase to the aqueous one was then observed. After a 15 min incubation, chloroform was subsequently allowed to evaporate at room temperature for 0.5 h. Ligands in excess were eventually removed by size exclusion chromatography using sephadex G-25 columns (NAP-5 or NAP-10 from GE Healthcare). In routine both column equilibration and elution was performed with ultra-pure water. However, for NMR experiments a borate buffer prepared in deuterated water was used instead (1 M H_3BO_3 , 1 M KCl, 1 M NaOH, uncorrected pH 9.0). In all cases it yielded an aqueous suspension of water-soluble nanorods which will be referred to as "peptide-QRs" in the rest of the article.

UV-Vis absorption spectroscopy. Measurements were achieved using a Cary 100 SCAN UV-Vis spectrometer (Varian) and 1 cm long quartz cuvettes. The concentration of QRs in the various suspensions was calculated as described in the literature, i.e. relying on the absorbance at 350 nm as well as on the corresponding nanorod absorption coefficient $\epsilon_{350} = (0.38 \times 10^{26}) \text{ V mol}^{-1}$, where V is the particle volume in cm^3 .²⁸

Fluorescence spectroscopy. Emission spectra were recorded on a Fluorolog-3 fluorimeter (Horiba Jobin-Yvon). All samples were excited at their absorption maxima, which had previously been evaluated by UV-Vis spectrometry. In addition, to avoid self-absorption effects the optical density at the excitation wavelength was set between 0.01 and 0.1. The quantum yield of QRs, Φ_{QR} , was determined using the one of Rhodamine 6G dissolved in water as reference, $\Phi_{Rh} = 0.96$. More precisely, we relied on $\Phi_{QR} = \Phi_{Rh} (I_{QR} OD_{Rh} n_{QR}^2) / (I_{Rh} OD_{QR} n_{Rh}^2)$ where n is the solution refractive index, I is the integrated fluorescence intensity, and OD the optical density; the QR and Rh subscripts refer to the measurements on QRs and Rhodamine 6G, respectively.²⁹

Gel electrophoresis. Charge variations resulting from the functionalization of QRs with peptides, as well as possible aggregation phenomena, were monitored by electrophoresis in a 0.5 % agarose gel prepared in 0.02 M KCl, 0.02 M H_3BO_3 , 0.02 M NaOH, 15 mM NaCl buffer, pH 8.2. Loading was

performed in 3% w/v glycerol, a 3.3 V/cm electric field was applied for 45 min, and visualization was achieved on a 350 nm transilluminator.

Dynamic light scattering (DLS). QR colloidal stability was accessed from measurements performed at an angle of 173° on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). All solutions were filtered through 0.2 µm Millipore filters (Millex HV) and samples were kept sealed all along time series. Data were collected at 25 °C. Only an analysis for spherical nanoparticles can be implemented on this apparatus; therefore, the extracted hydrodynamical diameter is just a rough estimate giving information on colloidal stability but not providing fine details on object shape.

Fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy. Characterizations were carried out on a 640-IR apparatus (Varian) using the attenuated total reflectance (ATR) mode. Samples were prepared as a powder by either evaporation of the solvent for hydrophobic QRs dissolved in chloroform or by lyophilization for peptide-QRs in solution in ultra pure water.

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. ³¹P NMR spectra were recorded at 298 K on a Bruker Avance 500 MHz spectrometer equipped with a 5 mm HR-MAS triple-resonance probe head (PRISM platform, Rennes 1 University, France). The spectral width was 100 kHz, centered at -15.6 ppm. A 1D sequence with power-gated decoupling using a 30 degrees flip angle was applied. The acquisition parameters were the following: 32 k points time domain, 2 s relaxation delay, 2 dummy scans, 240 to 5 k scans. Spectra were then transformed with 16 k points.

Proton NMR was achieved at 278 K on an ultrashield Bruker Avance spectrometer operating at 500 MHz and equipped with a 5 mm TXI inverse triple-resonance cryoprobe head (PRISM platform, Rennes 1 University, France). A spectral width of 12 ppm centered on water resonance was used. Water suppression was realized either by water-presaturation or gradient-based sequences.^{30,31} The 2D spectra were recorded by using standard Bruker sequences. Acquisitions were performed in echo-anti-echo mode with Z-gradients selection. Mixing times of 100 ms for TOCSY and 250 ms for NOESY were used.

Diffusion coefficients were determined relying on the Stejskal–Tanner PFG-SE sequence.³² Sixteen acquisitions were recorded by increasing the strength of the gradient field applied along the tube main axis, while all the other parameters were kept constant (3 s relaxation delay, 8 scans, 16 k time domain). Gradient pulses were 5 ms long, with a 150 ms delay between

them. After Fourier Transform, integration of resonance peaks was used for diffusion coefficient determination.

X-ray scattering. Peptide-QRs in suspension at 1 μM in ultrapure water were loaded in 1.3 - 1.6 mm round glass capillaries (Glas Technik & Konstruktion Müller & Müller OHG) and samples were allowed to dry under vacuum at 150 mBar during one week in the presence of P_2O_5 . Experiments on hydrophobic QRs were achieved in a similar way: hydrophobic QRs from the same synthesis batch were dissolved in either chloroform or toluene at 1 μM , injected in the capillary, and dried under vacuum.

Small angle X-ray scattering (SAXS) measurements were performed on the high brilliance SWING beam line at the Soleil synchrotron facility, with monochromators set at 12 KeV.^{28,33} Using a CCD detector at 1.2 m from the capillary, diffraction patterns were recorded for reciprocal spacing $q = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$ varying between 0.01 and 0.8 $\text{\AA}^{-1}$, *i.e.* repetitive distances $d = 2\pi/q$ ranging from 628 to 78 $\text{\AA}$. All samples exhibited powder diffraction patterns that could be submitted to circular integration to yield scattered intensity plots.

Nanorod walls self-assembly. A PDMS stamp (Sylgard 184, Dow Corning) was first cast on a master mold that had been photolithographed in SU8-2025 (Microchem). The elastomer surface displayed 35 μm high and 100 μm large pillars, arranged on a square lattice of parameter 175 μm . A droplet of peptide-QR suspension, at 2.5 μM in ultra pure water and supplemented with Tween 20 at 96.4 μM , was then sandwiched in between a flat silicon wafer and the micropatterned template. After drying for 12h at room temperature, the PDMS lid was removed in order to proceed to observations.

Electron microscopy of superstructures. The 3D organization of the colloidal assemblies was first observed by scanning electron microscopy (SEM) using a Magellan 400 L (FEI) equipped with a field emission gun and running at the voltage acceleration of 15 kV with a 0.2 nA probe current. Settings and procedures were similar to the ones used for your previous work on GNRs,⁹ except that no micromanipulator was necessary to break open the structures and that the higher acceleration voltage enabled us to obtain good views although some organic film was initially present at the feature surface.

Alternatively, to gain insight on wall interior we relied on STEM-HAADF investigations performed on the JEOL 2200FS once again operating at 200 kV. The key point was here to achieve a successful preparation of thin sections of QR supracrystal: the dried structures were first protected with $\sim$

500 nm of carbon by rod evaporation in a Q150T ES coating system (Quorum Technologies) and $\sim 1 - 2 \mu\text{m}$ of platinum by $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{Pt}$ cracking in a STRATA DB 235 focus ion beam (FIB) machine (FEI). Then, a slice of superstructure was cut out perpendicular by the ridge using the gallium FIB (see Figure S8), extracted with the micromanipulator, thinned up to electron transparency at low intensity, and cleaned at low voltage.

RESULTS AND DISCUSSION

Hydrophobic QRs synthesis and characterization. The highly monodisperse CdSe/CdS nanorods used in this work were grown following the seeded approach described by Carbone *et al.*²⁶ After purification from ligands in excess, hydrophobic QRs were obtained dispersed in toluene. The length and diameter of these particles were determined by TEM to be 17.9 ± 0.7 and 6.7 ± 1.2 nm, respectively (see Figure S1a). Furthermore, the wurtzite structure was confirmed by analysis of the STEM-HAADF images, the nature of the seed as well as its surrounding were identified thanks to the characteristic and slightly different crystallographic parameters of CdSe and CdS (see Figure S1b and table S1).²⁶ Finally, the UV-Vis absorption spectrum in toluene exhibits three characteristic peaks corresponding to the absorption of the core at 580 nm and of the anisotropic shell at 421 and 471 nm. Conversely, the fluorescence emission spectrum obtained upon excitation at 390 nm displays a single sharp peak centered at 585 nm (see Figure S1c), which is associated to the sole seed and which quantum yield Φ_{QR} was estimated to be ~ 0.45 .

Ligand exchange. As described in Figure 1a, hydrophobic QRs were made hydrophilic by replacing the phosphorus ligands issued from the synthesis by the TCCPAC peptide. The molecular structure of the latter compound is given in Figure 1b. An alkyl chain length with eleven carbon atoms was introduced to get a high lateral attractive Van der Waals interaction within the coating layer. On the other hand, a PEG spacer was inserted. It was selected long enough to get a good solubility of the particles in water and to generate Helfrich undulation repulsive forces that ensure a satisfactory colloidal stability.³⁴

In practice, purified hydrophobic nanorods dissolved in chloroform were incubated in presence of a large excess of peptide solubilized in pure water. TMAOH was also added as a phase transfer agent. After 20 minutes of incubation, QRs have left the organic phase for the aqueous one. These

water-soluble peptide-capped QRs, now denoted TCCPAC-QRs or more generally peptide-QRs, were then purified by size exclusion chromatography to eliminate the peptide in excess as well as traces of any other reagents.

To investigate the nature of the ligands at the nanorods surface, FTIR analyses were carried out first (Figure 1c). When comparing the data associated with hydrophobic QRs to the ones issued from peptide-QRs we note that the peaks corresponding to the phosphoryl P=O band at 1145 cm^{-1} and to the hydrogen phosphoryl P-OH band at 819 cm^{-1} have disappeared during the cap exchange. They were indeed related to the octadecyl phosphonic acid (ODPA) and the hexyl phosphonic acid (HPA), as well as to the trioctyl phosphonic oxide (TOPO) and the trioctyl phosphine (TOP), all ligands that have been replaced by the peptide. By contrast, the emergence of the amide carbonyl C=O band at 1643 cm^{-1} clearly indicates the presence of TCCPAC.

To further prove the quantitative nature of ligand substitution at the QR surface, we relied on both ^{31}P and ^1H NMR spectroscopies. More precisely, we selected the former technique because it is generally used to characterize the capping of CdSe/CdS nanoparticles synthesized in mixtures of phosphonic acids such as HPA and ODPA. These molecules are usually strongly coordinated to the semiconductor surface and their signal therefore appears as a very broad peak. Indeed, the decrease of the molecular motions close to the solid interface yields more efficient relaxation pathways.³⁵ Similar observations were obtained here: whereas the pure HPA spectrum exhibits a very sharp feature, the hydrophobic QR spectrum shows a very broad resonance centered at 27 ppm (see Figure 1d). After ligand exchange, phase transfer, and purification by size exclusion chromatography, we obtain an aqueous suspension of peptide-QRs that does not exhibit a phosphorus signal anymore. As far as ^1H NMR is concerned, full signal assignment for the TCCPAC peptide was performed using standard procedures, both for the 1D (see Figures S2a and S2b) and for the 2D spectra (see Figure S3). It is worth noting that the chemical shifts of the peaks corresponding to the three H_α of the cysteines are sensitive to the pH due to the acido-basic properties of the thiols (see Figures S2b and S2c). The TCCPAC-QR ^1D spectrum exhibits two peaks at 3.66 ppm (H_{14}) and 4.3 ppm ($\text{H}_{15}/\text{H}_{16}$) that can be attributed to the cysteine protons of the free peptide in solution at pH 9.0 before size exclusion chromatography (see SI Figure S4). After purification, these peaks disappear in agreement with the elimination of the free peptide (see Figure S4). In addition the peaks

attributed to TMAOH (at 2.8 ppm and 3.0 ppm), methanol (around 3.2 – 3.3 ppm) and phosphonic ligands also disappear (see Figure S4). These results are in good agreement with the previous FTIR data and comfort the observation of a quantitative cap replacement. The observation made on ^1H NMR spectra also demonstrates that the purification by size exclusion chromatography is efficient to remove the large excess of peptide required for ligand exchange. We could further quantify the binding of the peptidic ligand to the CdS surface by monitoring the modifications of its 1D ^1H NMR spectrum during the addition of a solution of purified TCCPAC-QRs to a solution of TCCPAC (see Figure 2a and SI for further details). The sharp peaks of the free peptide initially present disappear as QR surface becomes saturated with the peptides. The integration area of the cysteine $\text{H}\alpha$ peaks (H15/H16) decreases until completely disappearance. Conversely, during the addition of a solution of free TCCPAC peptide to a purified peptide-QR suspension, all the characteristic peaks of the free TCCPAC are observed after addition of 4.4 mM peptide corresponding to the saturation of the QR surface (see Figure 2b). In both cases, the most affected signals (shadowed on the spectra of Figure 2b) belong to the three-cysteine residues or to protons located very close to these residues (H6-9 and H2). Thus, the evolution of these peaks strongly suggests an anchoring through the cysteines residues. In addition this experiment also provides an estimation of the number of peptides per QR. Indeed, during the addition of peptide-QR to a solution of free TCCPAC, the integration area of the peaks H1 and H4, belonging to the ligand alkyl chain, is fully correlated with the increasing amount of added peptide-QRs (see Figure 2b). With the help of an external standard, the integrations are directly converted into concentrations. The total concentration of TCCPAC in the NMR tube is given by the integration of proton peaks 1, 4, and 12, normalized by the external reference. The peaks integration values vary respectively from 64 to 83 (H1), from 16 to 19 (H4), and from 74 to 83 (H12), increasing from about 20%. Knowing the starting amount of free peptide, it is thus possible to extract the amount of peptides present on the TCCPAC-QRs. From the QR concentration, the estimation of the ratio of the peptides per QR is roughly evaluated to be around 650 peptides per QR after ligand exchange. The QR surface area (360 nm^2) is estimated by considering the QR (18 nm diameter and 5 nm length) as a cylinder closed with two haft spheres at the tops. We can deduce the mean surface occupied by one peptide to be 0.6 nm^2 . This result shows that the surface of hydrophilic QRs is not totally saturated with peptides after ligand

exchange. Finally, additional data could be obtained using diffusion ordered spectroscopy (DOSY),³⁵ a technique which discriminates the resonances of the free and bound peptides according to their molecular diffusion.³⁶ When analyzing purified TCCPAC-QRs we found that the protons of the PEG portion as well as the ones of the first methylene group (H9) are associated with a $0.44 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ self-diffusion. This value is significantly higher than the $1.35 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ one obtained for all the peaks of free TCCPAC in the region from 1 to 4 ppm (see Figure S5). These results are once again in agreement with the attachment of the peptide to the nanorod surface.

Characterization of peptide-QR aqueous suspensions. Nanorods self-assembly and the use of the obtained materials for applications in optics or in energy conversion impose to use particles initially well dispersed in solution, which display a controlled surface chemistry and a preserved fluorescence emission. An overview of the purified TCCPAC-QR optical and colloidal properties is given in Figure 3. We measured absorbance and fluorescence emission spectra similar to the hydrophobic QR ones (compare Figure 3a and Figure S1c). However, the fluorescence quantum yield Φ_{QR} has been proved to decrease from 0.45 to 0.20 upon ligand exchange. This change might be attributed to the trapping of the photo-induced charge separation by interactions with the polythiolate ligands at the inorganic crystal surface. Additionally, TCCPAC-QRs are photostable for weeks as soon as pH is higher than 4 (see Figure 3b). At pH 3, fluorescence intensity falls to nearly zero after 3 days, a phenomenon that we attribute to aggregation. Indeed, it correlates with a dramatic increase of the average hydrodynamic diameter measured by DLS (see Figure 3c).

To gain more insight on the influence of the ligand structure on particle properties, we relied on two additional peptides. First we modified the QR surface charge by mixing TCCPAC with TCCPAM, the parent molecule bearing a terminal amide group instead of the carboxylic acid one (see Figure S6a). For all the investigated capping mixtures nanorods migrate as a single and well-defined band in agarose gel electrophoresis, which indicates that colloidal stability was always preserved (see Figure S6b). As expected, we also noticed an electrophoretic mobility increasing with the TCCAP/TCCAPM ratio. Similar results have been previously observed for QDs coated with PEGylated peptidic ligands¹⁶ and for GNRs coated with PEGylated alkyl thiolate ligands.⁹ In a second set of experiments, we introduced TCPAC, a peptide similar to TCCPAC although it does not include the alkyl chain (see Figure S7a). Fluorescence and DLS data revealed that both photophysical

and colloidal stabilities were much smaller under acidic conditions. On the long term, aggregation was even observed for neutral and basic pH (see Figure S7a and b). Thus, the presence of an alkyl chain seems to be a key factor in the design of ligands able to provide a good QR dispersion in aqueous solutions.

Peptide-QR self-assembly. In view to integrate nanorods into devices, we explored a controlled drying method yielding well-defined patterns of auto-organized superstructures.⁹ More precisely, an aqueous suspension of TCCPAC-QRs was first confined between a flat substrate and a PDMS stamp before water was allowed to evaporate freely (see Figures 4a-b). After removal of the elastomeric mold, a macroscopic array of linear and circular features was obtained, as demonstrated by optical fluorescence and scanning electron microscopies (see Figures 4c and 4d-e, respectively). SEM images clearly reveal that QRs are densely packed within these walls. For instance, some hexagonal arrangement is observed normal to the superstructure surface (see Figure 4f). Additionally, a lamellar organization is evidenced in places where a part of colloidal crystal has been fortuitously removed during cleaving (see Figures 4g-h). Thereby, we can infer the existence of a local smectic B order. To get quantitative measurements of the lattice parameters, thin foils were micromachined by FIB perpendicularly to the wall ridge and inspected by STEM-HAADF. As shown in Figure 5, this method permitted to extract the lateral interdistance of 75 ± 5 Å of the QR within a lamella which gives a hexagonal parameter of $a_{SmB} \sim 87 \pm 6$ Å (see Figures 5b and 5c). The measurement of the intensity profile acquired along one QR layer gives a less accurate estimation of the lateral interdistance (80 ± 10 Å) but validates the previous result given from Fourier Transform.

To further explore the ability of TCCPAC-QRs to self-organize upon water evaporation, SAXS was used to analyze the solid obtained from drying a colloidal suspension in a glass capillary. Peak indexation indeed confirmed the existence of a smectic B crystal phase, as shown in Figure 6 (see also Table S2). The unit cell parameters are $a = 97.6$ Å and $c = 638$ Å, they correspond to a hexagonal spacing $a_{SmB} = a = 97.6$ Å and to a lamellar repeat distance $d_{SmB} = c/3 = 212.6$ Å. Those data are thus in fair agreement with the ones obtained by STEM-HAADF.

Incidentally, we noticed that organic solvent evaporation from a suspension of hydrophobic QRs also yields a smectic B crystal phase. Its lateral

interdistance and lamellar repeat distance are $a = a_{SmB} = 68.6 \text{ \AA}$ and $c = d_{SmB} = 168.9 \text{ \AA}$, respectively (see Figure S9). Hence, grafting of TCCPAC peptides induces an increase of about 30 to 50 $\text{\AA}$ for these parameters. The SAXS spectrum from the sample originally in organic solvent also exhibited a lower interlamellar order than the one from the sample originally in water. It may be due to the negative charges at the nanorod surface, which can favor interparticle repulsion, and/or to the alkyl chain in the ligand structure, which can harden the interaction potential because of crystallization inside the coating.

CONCLUSION

The present experiments clearly demonstrate the ability of core/shell quantum rods to self-assemble into a smectic B phase upon colloidal suspension drying. This operation was achieved in water after initial phosphonic ligands had been exchanged for peptides with precisely devised properties. More specifically, we first showed by FTIR and NMR spectroscopies that a simple 'mix-and-react' protocol can lead to quantitative cap substitution. The interaction between the semiconductor surface and the new coating molecule occurs through the three N-terminal cysteines and a very high packing density ($\sim 0.6 \text{ nm}^2/\text{peptide}$) was obtained thanks to an alkyl chain inserted within the ligand structure. Next, relying on fluorescence emission spectroscopy, electrophoresis, and DLS, we proved that the optical and colloidal properties of the CdSe/CdS nanorods dispersed in aqueous buffers are preserved for weeks until pH remains above 4 and ionic strength stays below or equal to 1 M. Such a result is due to both the PEG spacer and the carboxylic acid group present at the C-terminal peptide extremity. Finally, we evidenced the possibility to fabricate well-defined ordered superstructures from the obtained solution, just by letting water evaporate. As an example, a regular network of micron size walls is produced over several millimeters squares when drying is performed between a flat substrate and a mold patterned with an array of pillars. EM images confirmed that particle organization yields a smectic B phase similar to the one identified by SAXS after bulk desiccation in a capillary tube.

Our easy to implement method for quantum rods capping and self-assembly thus leads to the formation of densely packed supracrystals, a result that appears to be a first step towards the elaboration of more sophisticated superstructures. Indeed, the use of PEGylated peptides offers the possibility

to chemically adjust the interaction potential between the nano-objects, for instance by varying the charge density thanks to the introduction of appropriate functional groups. In a forthcoming paper, we will consequently present how to modulate QRs interdistance, alike what we have previously realized with GNRs.¹⁰ Since this spacing parameter is of paramount importance to tune the final superstructure properties (e.g. the optical response under photo-irradiation), our studies will be relevant for integration in either photo-electrochemical²⁰ or optoelectronic devices. Moreover, the ability to easily dispersed in water and self-assemble nanorods made various materials will allow us to mix semiconductor and metal particles inside dense and ordered features, in order to study phonon-plasmon coupling.³⁷

Supporting Information. Detailed protocols are given for the synthesis of the CdSe/CdS nanorods and for the NMR experiments. Figure S1: TEM, STEM-HAADF and spectroscopic characterization of the hydrophobic QRs. Figure S2: Chemical structure of TCCPAC (numbered protons) and its assigned ¹H NMR proton spectrum in water at pH 7.0. Figure S3: Overlay of 2D¹H NMR spectra of TCCPAC in 10% D₂O, pH 7.0. Figure S4: ¹H NMR proton spectra of TCCPAC-QRs during the purification step in deuterated borate buffer, pH 9.0. Figure S5: Overlay of ¹H DOSY spectra of TCCPAC-QRs and free TCCPAC. Figure S6: Chemical structure of TCCPAM and agarose gel electrophoresis of QRs capped with different TCCPAC/TCCPAM ratios. Figure S7: Chemical structure of TCPAC and evolution in time of the TCCPAC-QRs fluorescence and hydrodynamical diameter. Figure S8: SEM pictures showing where the wall was cut by FIB technique. Figure S9: SAXS spectrum of hydrophobic QRs dried in a capillary from a suspension in toluene. Table S1: STEM-HAADF image analysis confirming the crystal composition of the CdS shell and CdSe core. Table S2: Indexation of the Smectic B crystal obtained from a dried suspension of TCCPAC-QRs.

This material is available free of charge *via* the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* valerie.marchi @univ-rennes1.fr

Funding Sources

The Agence Nationale de la Recherche (ANR), the Direction générale de l'Armements (DGA), the Cnano IdF and the Région Bretagne supported the research described in this manuscript.

ACKNOWLEDGMENT

VM and FA thank the Région Bretagne and the Direction Générale de l'Armement for the PhD fellowships of TB, MP, and CH. VM and CG acknowledge the Agence Nationale de la Recherche for financial support through the "Biomodulator" grant obtained in 2008 on the PNANO program. CG also benefited from a financial support from the Cnano IdF, in the context of the DypMOA project. We are indebted to A. Burel for her technical support during observations on the TEM platform Mric-UMS 3480-biosit-Université de Rennes 1 and to X. Zhao for assistance with sample preparation prior to FIB processing.

<http://pubs.acs.org/page/jacsat/submission/authors.html>

REFERENCES

- (1) Hu, J.; Li, L.-s.; Yang, W.; Manna, L.; Wang, L.-w.; Alivisatos, A. P. *Science* **2001**, 292, 2060.
- (2) Talapin, D. V.; Shevchenko, E. V.; Murray, C. B.; Kornowski, A.; Förster, S.; Weller, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12984.
- (3) Rizzo, A.; Nobile, C.; Mazzeo, M.; Giorgi, M. D.; Fiore, A.; Carbone, L.; Cingolani, R.; Manna, L.; Gigli, G. *ACS Nano* **2009**, 3, 1506.
- (4) Luo, Y.; Wang, L.-W. *ACS Nano* **2009**, 4, 91.
- (5) Zanella, M.; Gomes, R.; Povia, M.; Giannini, C.; Zhang, Y.; Riskin, A.; Van Bael, M.; Hens, Z.; Manna, L. *Adv. Mat.* **2011**, 23, 2205.
- (6) Talapin, D. V.; Koeppe, R.; Götzinger, S.; Kornowski, A.; Lupton, J. M.; Rogach, A. L.; Benson, O.; Feldmann, J.; Weller, H. *Nano Lett.* **2003**, 3, 1677.
- (7) Amirav, L.; Alivisatos, A. P. **2010**, 1, 1051.
- (8) Alam, R.; Fontaine, D. M.; Branchini, B. R.; Maye, M. M. *Nano Lett.* **2012**, 12, 3251.
- (9) Tang, R.; Lee, H.; Achilefu, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 4545.

- (10) Hamon, C.; Postic, M.; Mazari, E.; Bizien, T.; Dupuis, C.; Even-Hernandez, P.; Jimenez, A.; Courbin, L.; Gosse, C.; Artzner, F.; Marchi-Artzner, V. *ACS Nano* **2012**, *6*, 4137.
- (11) Yong, K. T.; Qian, J.; Roy, I.; Lee, H. H.; Bergey, E. J.; Trampusch, K. M.; He, S.; Swihart, M. T.; Maitra, A.; Prasad, P. N. *Nano Lett.* **2007**, *7*.
- (12) Yong, K. T.; Hu, R.; Roy, I.; Ding, H.; Vathy, L. A.; Bergey, E. J.; Mizuma, M.; maitra, A.; Prasad, P. N. *ACS Appl. Mat.and Interf.* **2009**, *1*.
- (13) Deka, S.; Quarta, A.; Lupo, M. G.; Falqui, A.; Boninelli, S.; Giannini, C.; Morello, G.; De Giorgi, M.; Lanzani, G.; Spinella, C.; Cingolani, R.; Pellegrino, T.; Manna, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2948.
- (14) Kumar, R.; Ding, H.; Yong, K.-T.; Roy, I.; Bergey, E. J.; Prasad, P. N. *Chem. Mat.* **2010**, *22*, 2261.
- (15) Brown, K. A.; Wilker, M. B.; Boehm, M.; Dukovic, G.; King, P. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* 5627.
- (16) Dif, A.; Boulmedais, F.; Pinot, M.; Roullier, V.; Baudy-Floc'h, M.; Coquelle, F. M.; Clarke, S.; Neveu, P.; Vignaux, F. o.; Borgne, R. L.; Dahan, M.; Gueroui, Z.; Marchi-Artzner, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14738.
- (17) Tsay, J. M.; Doose, S. r.; Pinaud, F.; Weiss, S. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 1669.
- (18) Dif, A.; Henry, E.; Artzner, F.; Baudy-Floc,Äôh, M.; Schmutz, M.; Dahan, M.; Marchi-Artzner, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8289.
- (19) Rainö, G.; Stoferle, T.; Moreels, I.; Gomes, R.; Hens, Z.; Mahrt, R. F. *ACS Nano* **2012**, *6*, 1979.
- (20) Han, Z.; Qiu, F.; Eisenberg, R.; Holland, P. L.; Krauss, T. D. *Science* **2012**, *338*, 1321.
- (21) Burda, C.; Chen, X.; Narayanan, R.; El-Sayed, M. A. *Chem. Rev.* **2005**, *105*.
- (22) Tsay, J. M.; Doose, S. R.; Weiss, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*.
- (23) Bala, T.; Sanyal, A.; Singh, A.; Kelly, D.; O'Sullivan, C.; Laffir, F.; Ryan, K. M. *J. Mat. Chem.* **2011**, *21*, 6815.
- (24) Gomes, R.; Hassinen, A.; Szczygiel, A.; Zhao, Q.; Vantomme, A.; Martins, J. C.; Hens, Z. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*.
- (25) Frugoni, J. A. C. *Gazetta Chimica Italiana* **1957**, *87*, 403.
- (26) Carbone, L.; Nobile, C.; De Giorgi, M.; Sala, F. D.; Morello, G.; Pompa, P.; Hytch, M.; Snoeck, E.; Fiore, A.; Franchini, I. R.; Nadasan, M.;

Silvestre, A. F.; Chiodo, L.; Kudera, S.; Cingolani, R.; Krahne, R.; Manna, L. *Nano Lett.* **2007**, 7, 2942.

(27) Artemyev, M.; Müller, B.; Woggon, U. *Nano Lett.* **2003**, 3, 509.

(28) van Grondelle, W.; López Iglesias, C.; Coll, E.; Artzner, F.; Paternostre, M.; Lacombe, F.; Cardus, M.; Martinez, G.; Montes, M.; Cherif-Cheikh, R.; Valéry, C. *J. Struc. Biol.* **2007**, 160, 211.

(29) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer, 2009.

(30) Hwang, T. L.; Shaka, A. J. *J. Magn. Res. Ser. A* **1995**, 112, 275.

(31) Sklenář, V.; Piotto, M.; Leppik, R.; Saudek, V. *J. Magn. Reson. Ser. A* **1993**, 102.

(32) Stejskal, E. O.; Tanner, J. E. *J. Chem. Phys.* **1965**, 42, 288.

(33) David, G.; Perez, J. *J. Applied Crystallography* **2009**, 42, 892.

(34) Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces* **1992**.

(35) Owen, J. S.; Park, J.; Trudeau, P.-E.; Alisivatos, A. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130.

(36) Moreels, I.; Fritzinger, B.; Martins, J. C.; Hens, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130.

(37) Sun, D.; Gang, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 5252.

Chapitre 2

Annexe 2. Microsystèmes magnétiques pour la modification spatiotemporelle du réseau de signalisation Ran

2.1 Annexe 2.A. La méthode de Debye-Scherrer

La méthode de Debye Scherrer consiste à défocaliser le faisceau électronique d'un microscope à transmission pour obtenir des figures de diffraction (Fig.2.2). Nous acquérons alors des cercles concentriques appelés anneaux de Debye-Scherrer. Il existe une relation simple entre la distance des plans réticulaires (h,k,l) du réseau direct et la distance séparant les noeuds correspondants du réseau réciproque. Les points sur la figure de diffraction représentent donc les points du réseau réciproque de l'échantillon étudié. Il est alors possible de définir l'orientation cristallographique en mesurant l'espace entre ces points, le faisceau incident et les angles entre les vecteurs $\mathbf{g}$ (Fig. 2.1-2.2).

La condition pour qu'il y ait diffraction est établie par la loi de Bragg :

$$\frac{1}{2d} = \frac{1}{\lambda} \sin(\theta) \quad (2.1)$$

où, d est la distance inter-réticulaire, θ l'angle formé entre le rayon incident et le rayon diffracté, λ la longueur d'onde du faisceau électronique et n l'ordre de diffraction considéré. Puisque la diffraction d'électrons relativistes (i.e. très rapides) induit des angles de Bragg très petits, l'équation 2.1 se simplifie en :

$$d = \frac{L\lambda}{R} \quad (2.2)$$

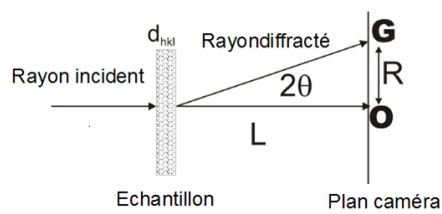


FIGURE 2.1 – Représentation schématique de la méthode Debye-Scherrer.

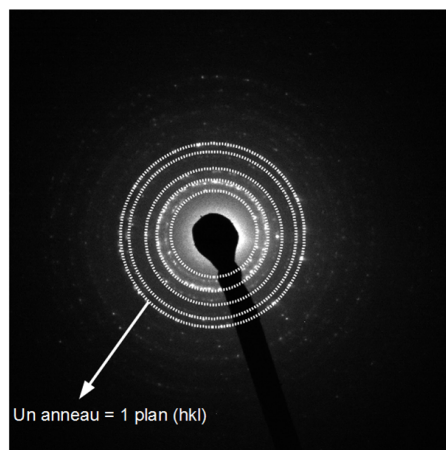


FIGURE 2.2 – Profil de diffraction issu de l'échantillon. Représentation des cercles concentriques appelés anneaux de Debye-Scherrer.

Nous comparons alors l'ensemble avec les données des fiches cristallographiques d'oxydes ferriques. Plus exactement, nous étudions les valeurs des plans inter-réticulaires de la maghémite et l'hématite (Fig. 2.2). En examinant les rapports ainsi obtenus, il vient :

$$\left(\begin{array}{l} \frac{d_2}{d_1} = 0,85 \\ \frac{d_3}{d_1} = 0,7 \\ \frac{d_4}{d_1} = 0,55 \\ \frac{d_2}{d_1} = 0,52 \end{array} \right) \quad (2.3)$$

Ceci est en bon accord avec les paramètres cristallins relatifs à l'hématite dont la structure est rhomboédrique. L'hématite est le polymorphe $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$, le polymorphe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ étant la maghémite. Il est très important de noter que cet examen vaut pour la position spatiale pour laquelle l'analyse a été effectuée.

Il est tout à fait possible que pour un autre emplacement sur l'échantillon, un oxyde ferrique différent tel que la maghémite soit détecté vu que l'oxyde de fer se stabilise sous diverses formes. A ce propos, rappelons que la maghémite (magnétite-hématite) est utilisée comme composant dans les ferrofluides et est obtenue par oxydation de la magnétite pour la synthèse des ferrofluides. L'hématite détectée représente alors peut-être des produits de cette réaction d'oxydation.

Enfin, l'hématite a une structure magnétique décrite, à température ambiante, comme faiblement ferromagnétique avec une valeur d'aimantation à saturation égale à $2,5 \text{ kA.m}^{-1}$. D'autres composés tels que la magnétite (aimantation à saturation égale à 480 kA.m^{-1}) ou la maghémite (aimantation à saturation égale à 350 kA.m^{-1}) sont nettement plus cohérent avec les mesures SQUID (cf. section suivante) et le comportement superparamagnétique.

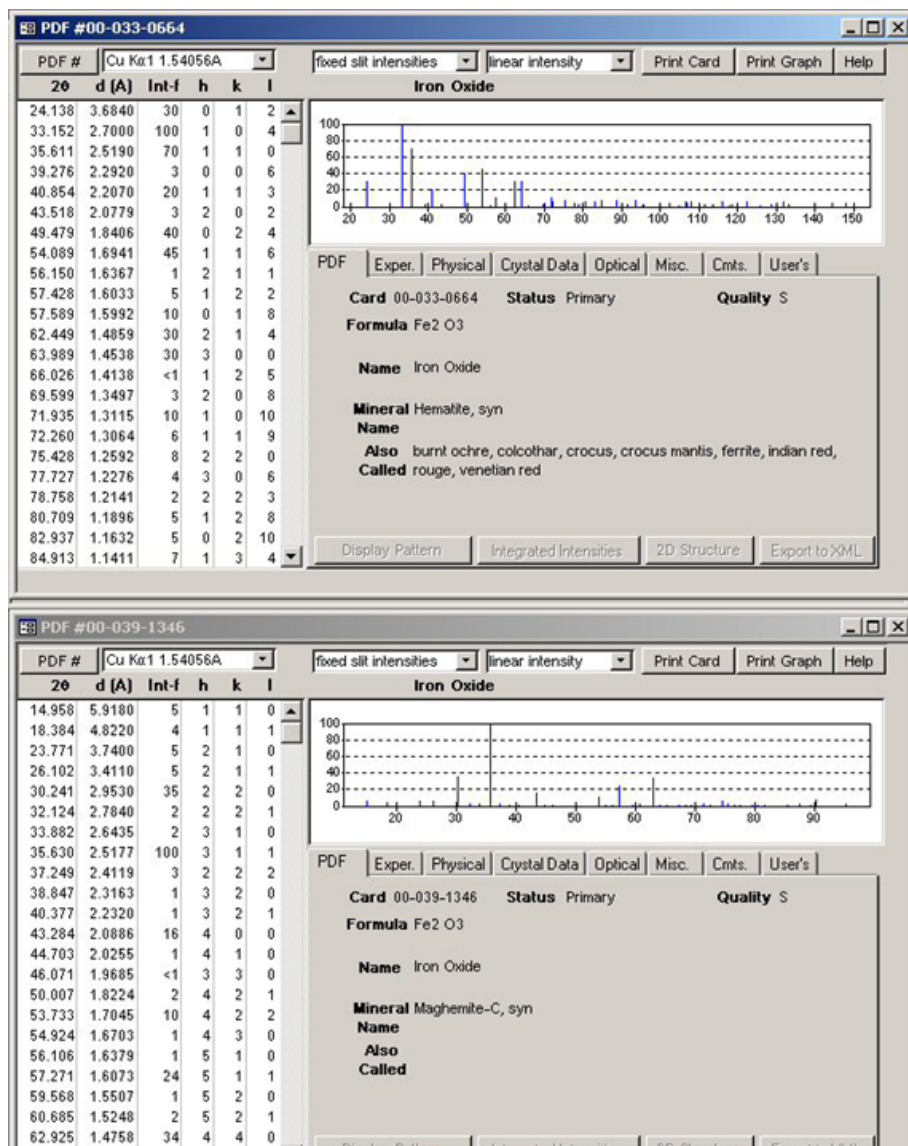


FIGURE 2.3 – Fiches cristallographiques de l'ASTM (american society for testing and materials) de la maghémite et de l'hématite.

2.2 Annexe 2.B. Caractérisation magnétique de nanobilles superparamagnétiques

Chaque nanobille superparamagnétique est composée de grains d'oxyde de fer qui possèdent un moment magnétique permanent. Le superparamagnétisme est un comportement des matériaux ferromagnétiques apparaissant lorsqu'ils sont sous la forme de petits grains ou nanobilles. Plus exactement, les domaines magnétiques de ces nanobilles sont considérés comme très petits et chaque domaine se comporte comme un macrospin. Elles ont alors un comportement paramagnétique avec une susceptibilité magnétique χ de l'ordre de 1.

En l'absence de champ magnétique, les moments magnétiques des nanobilles fluctuent avec l'agitation thermique et s'orientent aléatoirement. La sphère ne dispose pas de moment magnétique global. Il n'existe pas d'interaction magnétique entre les billes et elles sont agitées par un mouvement brownien. En présence d'un champ magnétique extérieur, l'ensemble des dipôles s'orientent dans la direction du champ extérieur et un moment magnétique global apparaît à l'échelle de la nanobille. Les interactions dipolaires magnétiques sont anisotropes : l'interaction dipôle-dipôle entre les billes est attractive dans la direction parallèle au champ et répulsive dans la direction perpendiculaire au champ. Ainsi, pour minimiser l'énergie magnétique totale du système, les nanobilles s'auto-organisent sous forme de chaînes dans la direction du champ magnétique extérieur.

2.2.1 Propriétés magnétiques

La société Ademtech (Pessac, France) fournit la valeur de l'aimantation à saturation de ces particules : 40 emu.g^{-1} (electromagnetic unit = 10^{-3} A.m^2). En considérant que la masse volumique du $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ est égale à 5 g.cm^{-3} , ceci donne une aimantation à saturation pour les particules égale à 200 emu.cm^{-3} soit 20 kA.m^{-1} . Toutefois, cette valeur dépend fortement de la masse volumique des nanobilles d'intérêt. Ici, nous avons calculé l'aimantation à saturation grâce à la masse volumique de l'oxyde massique. Nous n'avons pas accès au nombre de particules par cluster de 120 nm et donc cette valeur d'aimantation à saturation à 20 kA.m^{-1} n'est qu'une approximation grossière.

2.2.2 Calcul de susceptibilité magnétique

L'évaluation de la valeur de la susceptibilité magnétique des nanobilles superparamagnétiques permet de déduire la force magnétique exercée sur ces dernières (2.37). Connaissant la composition des nanobilles constituées de grains de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, la susceptibilité magnétique est déterminée en caractérisant les grains

de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, c'est-à-dire, le ferrofluide initial.

Pour cela, nous disposons des mesures effectuées sur des échantillons de ferrofluide analysés par l'intermédiaire d'un magnetomètre SQUID (superconducting quantum interference device), menées par A. Koenig et L. Cohen-Tannoudji en collaboration avec P. Monod du Laboratoire de Physique du Solide de l'Ecole des Sciences Physiques et Chimiques Industrielles durant leurs travaux de thèses respectifs [191, 192]. L'expérience consiste à mesurer le flux de courant induit par le mouvement de l'échantillon à travers une bobine supraconductrice alimentée par un courant continu. La variation du moment magnétique qui en résulte est mesurée *via* la variation d'intensité qu'elle induit dans les bobines. Le moment total de l'échantillon est alors déduit et ce, pour différentes valeurs de champ magnétique.

Les inductions magnétiques avec lesquelles nous travaillons sont comprises entre 0 et 200 mT. Dans les expériences de L. Cohen Tannoudji, l'allure de l'aimantation de l'oxyde de fer, $M\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ a été déterminée grâce à la mesure d'un échantillon de 20 μL de ferrofluide à 14,4 %, soit une masse de 2,9 mg ou un volume de $5,8 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3$ d'oxyde de fer $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$. Le moment total mesuré peut être rapporté à une aimantation c'est-à-dire à un moment par unité de volume. L'évolution de l'aimantation en fonction de l'induction magnétique B est alors déduite (Fig. 2.4).

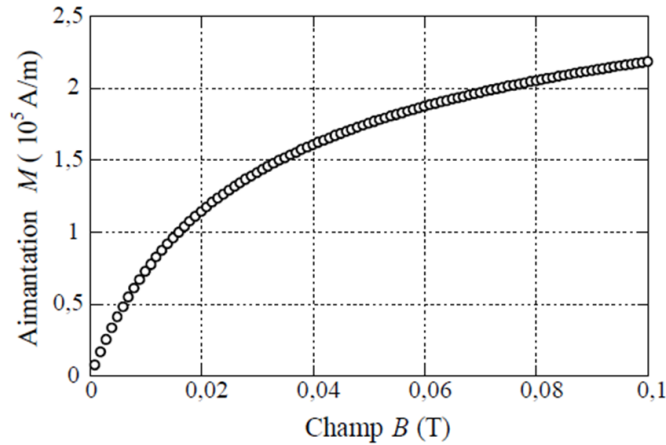


FIGURE 2.4 – Courbe de l'aimantation M induite en fonction de l'induction magnétique B de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, réalisée à partir d'expériences de SQUID sur le ferrofluide initial fourni par Ademtech. De [192].

Connaissant la valeur de cette aimantation et des fractions volumiques de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ dans les particules, nous allons calculer la susceptibilité $\chi_{\text{ferrofluide}}$ du matériau constituant les particules. En considérant que la densité du coeur

dur des nanobilles $M_{coeurdur}$ donnée par Ademtech est d'environ 2,35 et en supposant que le coeur dur est composé d'oxyde de fer (de densité égale à 5,1) et de polymère (de densité égale à 1), on obtient une fraction volumique en oxyde de fer dans le coeur dur de 30 %. On a alors :

$$\chi_{ferrofluide} = \frac{M_{coeurdur}}{H} = \frac{M_{Fe_2O_3} \times 0,30}{H} \quad (2.4)$$

Finalement, pour obtenir la valeur de la susceptibilité magnétique des particules, il ne reste plus qu'à prendre en compte leur sphéricité *via* la relation suivante.

$$\chi = \frac{\chi_{ferrofluide}}{1 + \frac{\chi_{ferrofluide}}{3}} \quad (2.5)$$

La susceptibilité magnétique des nanobilles est alors déterminée comme représentée sur la Figure.2.5.

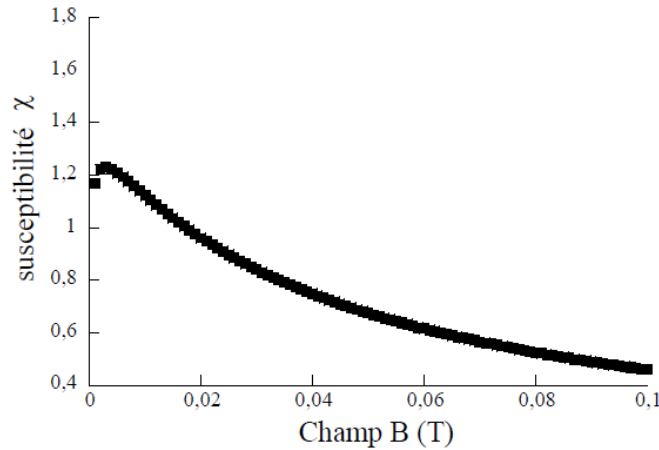


FIGURE 2.5 – Susceptibilité magnétique χ des particules Ademtech polymérisées de 150 nm de diamètre en fonction de l'induction magnétique B. D'après [192, 191].

2.2.3 Conclusions

Nous travaillons avec des distances entre l'aimant et la paroi du canal comprises entre 0,5 mm et 10 mm. Ceci correspond à des champs magnétiques variant de 50 mT à 300 mT, soit χ compris entre 0,4 (non disponible sur le graphe) et 0,6 (Fig. 2.5) soit $\chi_{moyen} = 0,5$ pour cette gamme d'induction magnétique. Les valeurs d'aimantation pour les particules associées sont comprises entre les valeurs 150 kA.m⁻¹ et 250 kA.m⁻¹.

Enfin, la Figure 2.4 nous permet d'établir que la valeur de l'aimantation à saturation du ferrofluide à la base de la fabrication des particules superparama-

gnétiques s'élève à 200 kA.m^{-1} . Au vu de ces résultats et de la gamme de champ magnétique avec laquelle nous travaillons, il nous semble raisonnable de fixer pour nos calculs que $\chi \approx 0,5$ et $M_s \approx 10^5 \text{ A.m}^{-1}$.

2.3 Annexe 2.C. Les aimants

Nous voulons caractériser théoriquement et expérimentalement les inductions magnétiques générées par différents aimants permanents.

2.3.1 Calcul semi-analytique de l'induction magnétique produite par des aimants permanents

Principe du calcul

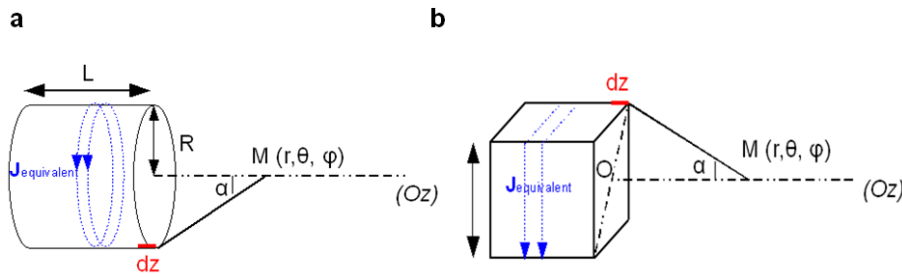


FIGURE 2.6 – Les différentes formes d'aimants utilisées. (a) Représentation d'un aimant cylindrique de longueur L de rayon R parcourue par un courant surfacique noté J_{eq} . (b) Représentation d'un aimant cubique de côté a .

Nous proposons une méthode de calcul analytique permettant d'estimer la valeur de l'induction générée sur l'axe de symétrie (Oz) d'un aimant. Tout d'abord, rappelons qu'un dipôle magnétique est équivalent à une boucle de courant [174]. Un aimant permanent est comparable à un ensemble de dipôles magnétiques, chacun de ces dipôles étant équivalent à une boucle de courant particulière. Pour un aimant parfait, les boucles de courant intérieures se compensent et s'annulent. Du fait de la symétrie quasi-parfaite de la géométrie, il existe des boucles de courants adjacentes. L'aimant permanent consiste alors en une simple distribution surfacique de courant. L'aimantation totale de la structure est donnée par un courant net de surface, J_{eq} .

$$\mathbf{J}_{eq} = \mathbf{M} \wedge \mathbf{n} \quad (2.6)$$

Où, $\mathbf{M}$ est l'aimantation de l'aimant et $\mathbf{n}$ est la normale à la surface de l'aimant. Pour des aimants permanents, l'induction rémanente $\mathbf{B}_{rem}$, i.e. la densité de flux résiduelle persistante après première aimantation de la structure, est liée à l'aimantation rémanente par la relation

$$\mathbf{B}_{rem} = \mu_0 \mathbf{M}_{rem} \quad (2.7)$$

$$|\mathbf{J}|_{eq} = \frac{|\mathbf{B}|_{rem}}{\mu_0} = \frac{B_{rem}}{\mu_0} \quad (2.8)$$

La contribution au champ magnétique (et donc à l'induction magnétique) en un point de l'espace de tous les courants considérés au sein de l'aimant peut être calculée en utilisant la loi de Biot-Savart :

$$\mathbf{B} = \frac{\mu_0}{4\pi} \int J_{eq} \frac{\mathbf{dl} \wedge \mathbf{r}}{r^2} = \frac{B_{rem}}{4\pi} \int \frac{\mathbf{dl} \wedge \mathbf{r}}{r^2} \quad (2.9)$$

où, $\mathbf{dl}$ est le vecteur déplacement infinitésimale pointant dans la direction du courant équivalent sur la spire, $\mathbf{r}$, le vecteur pointant de l'élément de courant sur la spire vers le point de mesure et r , la coordonnée du vecteur de l'élément du courant au point de mesure (Fig.2.6).

Nous avons entrepris ces calculs pour deux formes d'aimants distinctes : (b) cylindriques et (c) cubiques. Nous considérons tout d'abord une spire de forme circulaire (ou respectivement carrée) traversée en son centre par un axe noté (Oz) . En supposant que le courant I ne varie pas dans le temps, le problème vérifie alors les lois de la magnétostatique. Les antisymétries du système permettent de montrer que l'induction magnétique, $\mathbf{B}$, a une composante nulle selon l'axe $\mathbf{e}_\theta$ (Fig. 2.7 et Fig. 2.8). Tout plan contenant l'axe Oz est un plan d'antisymétrie pour la distribution de courant considérée. Le champ résultant est donc contenu dans ce plan d'antisymétrie. Dans un repère à coordonnées cylindriques, cela se traduit par :

$$\mathbf{B}(r, \theta, z) = B_r(r, z) \mathbf{e}_r + B_z(r, z) \mathbf{e}_z \quad (2.10)$$

De plus, l'axe (Oz) étant l'intersection des plans d'antisymétrie, le champ induit en M est donc dirigé suivant (Oz) . Connaissant la direction de $\mathbf{B}$, on peut alors appliquer la loi de Biot-Savart à la spire considérée afin de déterminer l'induction magnétique générée par cette dernière. En prenant en compte les caractéristiques géométriques de la structure, on intègre ensuite le résultat obtenu pour la spire à l'aimant entier. Finalement, nous obtenons une estimation de la valeur du champ magnétique généré sur l'axe de symétrie (Oz) de l'aimant permanent.

Les aimants cylindriques

Soit, une spire circulaire de rayon a dans laquelle circule un courant d'intensité I . On considère un point M de coordonnées cylindriques (r, θ, z) placé sur l'axe de symétrie (Oz) passant par le centre O de la spire comme représenté sur la Figure 2.7.

$$B_{spire} = \frac{\mu_0 I}{4\pi} \int \frac{dl \sin \alpha}{r^2} \quad (2.11)$$

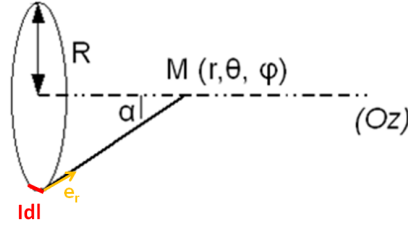


FIGURE 2.7 – Schéma d'une spire circulaire de rayon a , de centre O , d'axe noté (Oz) et dans laquelle circule un courant d'intensité I .

Avec $\alpha = (\mathbf{r}, \mathbf{MO})$, c'est-à-dire, l'angle depuis lequel le point M voit la spire. Or, en intégrant sur toute la longueur de la spire, on a $\int_{spire} dl = 2\pi a$.

De plus, sachant que $\sin \alpha = \frac{a}{r}$, l'induction magnétique créée par une spire circulaire de rayon R parcourue par un courant I se résume donc à :

$$B_{spire}(\alpha) = \frac{\mu_0 I \sin^3 \alpha}{2a} \quad (2.12)$$

Considérons maintenant un aimant cylindrique de longueur L et de rayon a (Fig. 2.6a). L'induction magnétique créée par une spire infinitésimale s'écrit :

$$dB_{aimant} = \frac{\mu_0 I \sin^3 \alpha}{2a} dz \quad (2.13)$$

Où, $z = a \cot \theta$ et $dz = \frac{-a d\alpha}{\sin^2 \alpha}$

$$dB_{aimant} = \frac{\mu_0 I \sin \alpha d\alpha}{2a} \quad (2.14)$$

En intégrant entre les angles α_1 et α_2 , l'expression 2.14 change et,

$$B(\alpha) = \frac{\mu_0 |\mathbf{J}|_{eq}}{2} [\cos \alpha_2 - \cos \alpha_1] \quad (2.15)$$

avec

$$|\mathbf{J}|_{eq} = \int_{cylindre} I \quad (2.16)$$

Enfin, en remplaçant dans l'équation 2.15 par les expressions de $\cos \alpha_2 = \frac{L+z}{\sqrt{(L+z)^2 + a^2}}$ ainsi que de $\cos \alpha_1 = \frac{d}{\sqrt{z^2 + a^2}}$, il en découle :

$$B(z) = \frac{B_{rem}}{2} \left[\frac{L+z}{\sqrt{(L+z)^2 + a^2}} - \frac{d}{\sqrt{z^2 + a^2}} \right] \quad (2.17)$$

Les aimants cubiques

Comme précédemment, nous proposons de déterminer tout d'abord l'induction magnétique générée par une spire carrée de côté a parcourue par un courant d'intensité I . On considère encore ici un point M de l'axe de symétrie (Oz) passant par le centre de la spire (Fig. 2.8a). Au point M de coordonnées cylindriques (r, θ, z) , chaque côté du carré, i.e. chacun des fils de longueur a parcouru par un courant d'intensité I , engendre un champ d'amplitude (Fig. 2.8b).

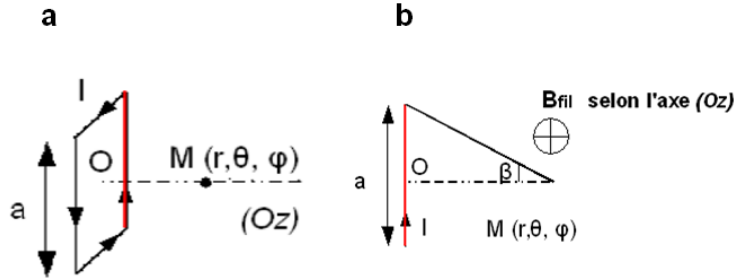


FIGURE 2.8 – Schéma d'une spire carrée de rayon a , de centre O , d'axe noté (Oz) et dans laquelle circule un courant d'intensité I .

$$B_{fil}(\beta) = \mu_0 I \frac{\sin \beta_2 - \sin \beta_1}{2\pi r} \quad (2.18)$$

Avec $r = \sqrt{z^2 + \frac{a^2}{4}}$, β angle depuis lequel le point M de l'axe (Oz) voit le fil de longueur a considéré. Précisons que $\sin \beta_2 = -\sin \beta_1 = \frac{a}{2\sqrt{z^2 + \frac{a^2}{2}}}$. Chaque fil engendre l'induction magnétique suivante :

$$B_{fil}(z) = \frac{\mu_0 I}{2\pi} \frac{a}{\sqrt{z^2 + \frac{a^2}{4}} \sqrt{z^2 + \frac{a^2}{2}}} \quad (2.19)$$

L'induction magnétique produite par la spire carrée est la somme de la contribution de quatre fils de longueur a parcourus par une intensité I . Seules les composantes selon l'axe (Oz) s'ajoutent de manière constructive. Il suffit donc de projeter l'ensemble de ces quatre contributions sur (Oz) .

Soit un cube de côté a . En introduisant l'angle α sous lequel on voit d'un point M de l'axe (Oz) , une demie-diagonale de la base carrée du plan (Oxy) (Fig.2.6b), il vient :

$$dB_{aimant} = \frac{2\mu_0 I}{\pi} \left[\frac{a^2(z^2 + \frac{a^2}{2})}{(2z^2 + \frac{2a^2}{4}) \left[\sqrt{z^2 + \frac{a^2}{2}} \right]^3} \right] dz \quad (2.20)$$

en outre, rappelons que $\sin \alpha = \frac{a\sqrt{2}}{2\sqrt{z^2 + \frac{a^2}{2}}}$, $\cos \alpha = \frac{z}{\sqrt{z^2 + \frac{a^2}{2}}}$, $z = \frac{a\sqrt{2}}{2} \cot \alpha$ et que $dz = \frac{-a\sqrt{2}}{2\sin^2 \alpha}$. Après calcul, l'équation 2.8 se résume à :

$$dB_{aimant} = \frac{2\sqrt{2}\mu_0 I}{a\pi} \left[\frac{\sin^3 \alpha}{(1 + \cos^2 \alpha)} \right] \frac{-a\sqrt{2}}{2\sin^2 \alpha} \quad (2.21)$$

Posons,

$$u = \cos \alpha \quad (2.22)$$

$$du = \sin \alpha d\alpha \quad (2.23)$$

$$|\mathbf{J}|_{eq} = \int_{cube} I \quad (2.24)$$

En intégrant sur l'ensemble de l'aimant, on en déduit :

$$B_{aimant}(u) = \frac{2\mu_0 |\mathbf{J}|_{eq}}{\pi} \int \left(\frac{-du}{(1 + u^2)} \right) \quad (2.25)$$

En remplaçant $|\mathbf{J}|_{eq}$ par sa valeur établie à l'équation 2.8, on trouve

$$B_{aimant}(u) = \frac{2B_{rem}}{\pi} \left[\arctan \frac{1}{u_2} - \arctan \frac{1}{u_1} \right] \quad (2.26)$$

avec, $u_2 = \cos \alpha_2 = \frac{z}{\sqrt{z^2 + \frac{a^2}{2}}}$ et que $u_1 = \cos \alpha_1 = \frac{z+a}{\sqrt{(z+a)^2 + \frac{a^2}{2}}}$. On rappelle que $2 \arctan u = \arctan \frac{2u}{1-u^2}$.

L'équation 2.26 devient :

$$B(z) = \frac{B_{rem}}{\pi} \left[\arctan \frac{\sin^2 \alpha_2}{\cos \alpha_2} - \arctan \frac{\sin^2 \alpha_1}{\cos \alpha_1} \right] \quad (2.27)$$

On a donc

$$B(z) = \frac{B_{rem}}{\pi} \left[\arctan \left(\frac{a^2}{2z\sqrt{4z^2 + 2a^2}} \right) - \arctan \left(\frac{a^2}{2(a+z)\sqrt{4(a+z)^2 + 2a^2}} \right) \right] \quad (2.28)$$

2.3.2 Mesure de l'induction magnétique

Dimensions et caractéristiques

Nous utilisons des aimants Néodyme-Bore-Fer (NdFeB) Supermagnete (Uster, Switzerland) de dimensions variées pour deux géométries différentes (cylindrique et cubique). Les dimensions des différents aimants dont nous disposons ainsi que leur champ rémanent respectif sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Dimensions $a \times a \times a$ en mm^3	B_{rem} en T
aimants cubiques	
$3 \times 3 \times 3$	$1,32 \text{ T} < B_{rem} < 1,38 \text{ T}$
$5 \times 5 \times 5$	$1,4 \text{ T} < B_{rem} < 1,46 \text{ T}$
$20 \times 20 \times 10$	$1,29 \text{ T} < B_{rem} < 1,32 \text{ T}$
$30 \times 30 \times 15$	$1,32 \text{ T} < B_{rem} < 1,38 \text{ T}$
Dimensions $a \times L$ en mm^2	B_{rem} en T
aimants cylindriques	
$2,5 \times 5$	$1,32 \text{ T} < B_{rem} < 1,37 \text{ T}$
2×10	$1,4 \text{ T} < B_{rem} < 1,46 \text{ T}$
10×10	$1,32 \text{ T} < B_{rem} < 1,37 \text{ T}$
15×15	$1,29 \text{ T} < B_{rem} < 1,32 \text{ T}$

Tab. 1. Les différents aimants cylindriques et cubiques «Supermagnete» ainsi que leurs caractéristiques géométriques et magnétiques.

Mesures de Hall

Principe de la mesure Nous mesurons grâce à un capteur à effet Hall les valeurs d'induction générées par chaque aimant et ce à différentes distances. Considérons par exemple l'aimant cubique $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ $W-03-N48-G$. Ces derniers ont une aimantation nominale notée N48 ce qui correspond à une induction rémanente de $1,37 \text{ T} - 1,42 \text{ T}$. En utilisant une sonde de Hall, nous mesurons $B(y = 1,4 \text{ mm}) = 0,186 \text{ T}$ ce qui correspond à un champ rémanent expérimental de $1,35 \text{ T}$.

Limitations Au cours de cette opération, le capteur de la sonde de Hall utilisé possède des dimensions analogues à celles d'un aimant cubique de 3 mm de coté. L'erreur produite lors des mesures sur de petits aimants n'est donc pas négligeable. Dans ce contexte, il nous faudrait un capteur de Hall de dimensions réduites (inférieures à 1 mm) pour optimiser ces mesures. De plus, pour les aimants de grande taille, un autre problème se pose. La sonde de Hall sature à proximité de la surface de l'aimant. Il n'est pas possible de mesurer l'induction magnétique à une distance réduite entre la surface de l'aimant et le capteur de la sonde. Pour de tels aimants, les données expérimentales ne sont disponibles qu'à partir d'une distance surface-capteur égale à 7 mm en moyenne alors que nous travaillons en général à des distances comprises entre 0 et 10 mm .

2.3.3 Comparaison des données théoriques et expérimentales

Sur les figures 2.9 et 2.10 sont respectivement représentées les valeurs d'inductions magnétiques générées par les différents aimants cylindriques et cubiques obtenues théoriquement et expérimentalement.

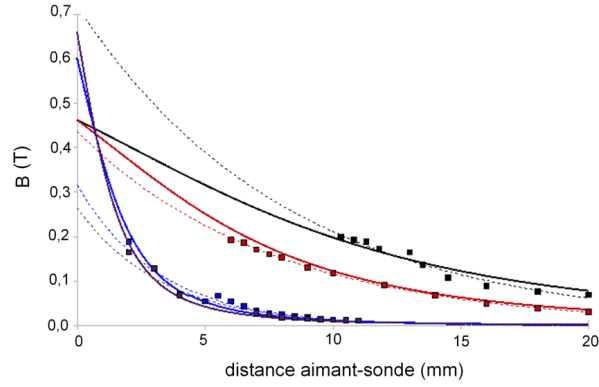


FIGURE 2.9 – Inductions magnétiques générées par les aimants de forme cylindrique. Les courbes représentées par des lignes continues correspondent aux valeurs obtenues par le calcul théorique en prenant en compte les dimensions des différents aimants alors que les courbes intégrant des symboles reproduisent les mesures effectuées avec la sonde de Hall. La courbe de couleur violette correspond à l'aimant de 4 mm de diamètre et 10 mm de long, bleue à l'aimant de 5 mm de diamètre et 5 mm de long, rouge à l'aimant de 20 mm de diamètre et 10 mm de long, noire à l'aimant de 30 mm de diamètre et 15 mm de long.

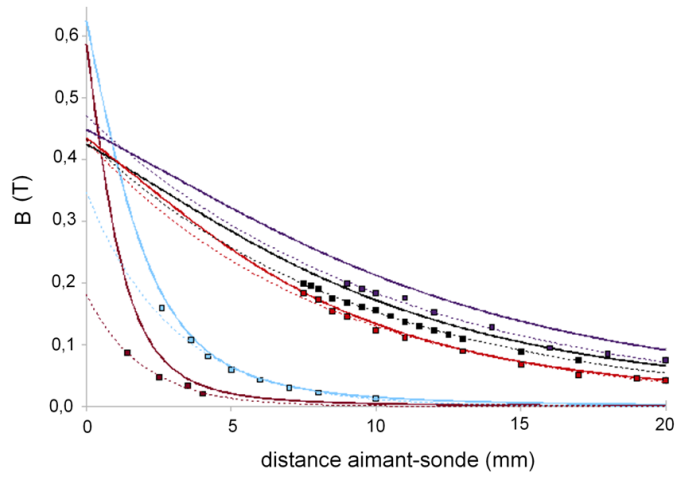


FIGURE 2.10 – Inductions magnétiques produites par les aimants de forme cubique. Les courbes représentées par des lignes continues correspondent aux valeurs obtenues par le calcul théorique en prenant en compte les dimensions des différents aimants alors que les courbes intégrant des symboles reproduisent les mesures effectuées avec la sonde de Hall. La courbe de couleur rose correspond à l'aimant de 3 mm de côté, bleue à l'aimant de 5 mm de côté, rouge à l'aimant de 10 mm de large et 20 mm de long, noire à l'aimant de 25,4 mm de large et 25,4 mm de long, violette à l'aimant de 15 mm de large et de 30 mm de long.

2.4 Annexe 2.D. Approche d'un aimant permanent à proximité d'une suspension de nanobilles superparamagnétiques. Considérations théoriques

2.4.1 Principe

L'objectif est de nous permettre d'évaluer théoriquement, à partir d'une estimation d'induction magnétique produite par un aimant permanent, la force magnétique ainsi que le profil de concentration adopté par des nanobilles superparamagnétiques en suspension dans un canal microfluidique à l'approche d'un aimant permanent.

2.4.2 Considérations générales

Force magnétique agissant sur une nanobille superparamagnétique

L'induction magnétique B aussi appelée densité de flux (en Tesla) caractérise la réponse globale d'un matériau à l'application d'un champ magnétique H (en $A.m^{-1}$). Chaque moment atomique constituant le matériau contribue à cette réponse. Le moment porté par une particule magnétique isolée et exposée à un champ magnétique extérieur de norme H est usuellement décrite par une fonction de Langevin [171, 181].

$$\mathbf{m}_p = V_p \mathbf{M}_p = V_p M_s L(\zeta^{inter}) = V_p M_s \left[\coth(\zeta^{inter}) - \frac{1}{\zeta^{inter}} \right] \quad (2.29)$$

Et finalement où, m_p est la norme du moment magnétique de la particule en $A.m^2$, M_p est l'aimantation de la particule en $A.m^{-1}$, M_s est l'aimantation à saturation de l'échantillon en $A.m^{-1}$ donnée en fonction de la taille et de la forme des nanobilles, V_p est le volume de la particule en m^3 . Le paramètre sans dimension ζ^{inter} estime le rapport entre énergie magnétostatique et énergie thermique :

$$\zeta^{inter} = \frac{M_s V_p B}{k_B T} \quad (2.30)$$

Où, k_B est la constante de Boltzmann en $m^2.kg.s^{-2}.K^{-1}$, B l'intensité de l'induction générée par la source magnétique, T la température absolue en K . L'équation 2.29 donne une approximation raisonnable de l'aimantation effective d'un agrégat de nanobilles agissant comme un seul et même dipôle magnétique [169].

En outre, les particules magnétiquement marquées par un moment $\mathbf{m}_p$ sont captées par une force $\mathbf{F}_m$ d'expression [173, 175, 176]

$$\mathbf{F}_m = (\mathbf{m}_p \cdot \nabla) \mathbf{B} \quad (2.31)$$

Le moment magnétique m_p de la particule ne perçoit une force magnétique qu'en présence d'un gradient d'induction magnétique $\nabla \mathbf{B}$. Si ce gradient est suffisamment puissant, un couplage apparaît et les nano-sphères magnétiques s'alignent matérialisant les lignes de champ et ces dernières peuvent être déplacées dans une direction particulière. En revanche, pour des champs magnétiques homogènes, la force magnétique exercée sur la particule est nulle [183]. La particule est aimantée par le champ magnétique mais ne sera attirée dans aucune direction particulière. Afin d'atteindre une force magnétique optimale, il faut pouvoir atteindre des valeurs de moments magnétiques et de gradients d'induction maximales.

Nanocargos superparamagnétiques Comme discuté plus haut, les expériences proposées au cours de ce travail imposent l'utilisation de nanobilles, leur taille étant compatible avec des applications à l'échelle intracellulaire. La réponse magnétique de ces objets est considérablement amoindrie : en réduisant la taille des particules d'un facteur 10, la force magnétique est divisée par un facteur 10^3 . Toutefois, les nanocargos seront composés par des nanobilles superparamagnétiques. Ceci permet de partiellement contourner cette difficulté. En effet, leur taille restreinte leur confèrent une structure magnétique monodomaine de laquelle émerge un moment magnétique important et ce, sous l'effet d'un champ magnétique modéré (de l'ordre de la centaine de mT). De plus, étant dotés des caractéristiques des matériaux ferromagnétiques, leur aimantation spontanée s'oriente selon $\mathbf{B}$ pour atteindre une valeur constante de saturation M_s . Enfin, l'absence d'aimantation rémanente pour ces particules permet d'assurer le maintien de la stabilité colloïdale de la suspension, en s'affranchissant de tout phénomène d'agrégation irréversible. Ainsi, si l'on considère une solution colloïdale de nanobilles superparamagnétiques, l'aimantation locale M_{lf} , en première approximation s'écrit

$$\langle \mathbf{M}_{lf} \rangle = \varphi |\mathbf{M}|_p = \varphi M_s L(\zeta^{inter}) \quad (2.32)$$

avec, φ est la fraction volumique en particules comprise entre 0 (particules infiniment diluées) à 1 (particules agrégées). La relation linéaire constitutive 2.32 peut être justifiée par le fait que l'aimantation de n'importe quel matériau est proportionnelle à la densité locale de dipôles magnétiques. Cette relation est en accord avec la théorie d'Onsager sur les liquides polaires [170] dans laquelle la susceptibilité électrique des fluides composés de molécules fortement polaires comme l'eau suit une relation linéaire avec la densité de particules notée N , de la forme $\chi = (\epsilon - 1) \propto N$. L'aimantation globale $M_g f$ d'une suspension de nanobilles [177]

$$\mathbf{M}_{gf} = \alpha \arctan\left(\frac{\beta \mathbf{B}}{\mu_0}\right) \quad (2.33)$$

où, $\mu_0=4\pi 10^{-7}$ est la perméabilité du vide en $\text{Wb.A}^{-1}.\text{m}^{-1}$. α qui s'exprime en A.m^{-1} et β en m.A^{-1} sont des paramètres dépendant de la nature de la suspension. Ils sont issus des courbes d'aimantation qui expriment $\mathbf{M}$ en fonction de $\mathbf{H}$ du ferrofluide.

En posant $\chi = \alpha\beta$ et en travaillant avec des champs magnétiques relativement faibles, l'expression précédente se linéarise en [167]

$$\mathbf{M}_{gf} = \chi \left(\frac{\mathbf{B}}{\mu_0} \right) = \chi \mathbf{H} \quad (2.34)$$

avec, χ est la susceptibilité magnétique des nanobilles et $\mathbf{B} = \mu_0 \mathbf{H}$. En outre, en considérant un ferrofluide de fraction volumique φ_f [177, 167] :

$$\mathbf{M}_f = \chi_f \mathbf{H} \quad (2.35)$$

où, $\chi_f = \varphi_f \chi$ est la susceptibilité magnétique du ferrofluide. On rappelle la relation globale : $\mathbf{m}_f = V_p \mathbf{M}_f = V_p \chi_f \mathbf{H}$. Dans ces conditions, l'équation (2.31) devient alors

$$\mathbf{F}_m = \frac{V_p \chi_f}{\mu_0} (\mathbf{B} \cdot \nabla) \mathbf{B} \quad (2.36)$$

Dans notre étude, les champs magnétiques appliqués ne seront pas dépendants du temps alors : $\nabla(\mathbf{B} \cdot \mathbf{B}) = 2(\mathbf{B} \cdot \nabla) \mathbf{B}$. Ainsi $\mathbf{F}_m$ s'écrit [174, 184] :

$$\mathbf{F}_m = \frac{V_p \chi_f}{\mu_0} \nabla B^2 \quad (2.37)$$

Enfin, sous l'effet d'une induction magnétique suffisamment grande (supérieure à 100 mT), l'aimantation des nanobilles superparamagnétiques s'oriente selon $\mathbf{B}$ et atteint rapidement sa valeur de saturation M_s . Le moment magnétique des nanocargos est alors considéré comme constant [176, 185] et $\mathbf{F}_m$ s'exprime comme

$$\mathbf{F}_m = \mathbf{m}_{fs} \nabla B = V_p \mathbf{M}_{fs} \nabla B \quad (2.38)$$

où, $|\mathbf{m}|_{fs} = V_p |\mathbf{M}|_{fs}$ est le moment magnétique à saturation du ferrofluide en A.m^2 , [169]. $|\mathbf{M}|_{fs} = \varphi |\mathbf{M}|_s$, l'aimantation à saturation de la suspension en A.m^{-1} .

Gradients d'induction Le gradient d'induction influe considérablement sur l'intensité de la force magnétique. Si l'on divise par 100 l'intensité de l'induction magnétique délivrée par l'aimant (en éloignant l'aimant ou en utilisant par exemple une bobine), on réduit le gradient correspond par 100 et la force par un facteur 10^{-4} . En laboratoire, deux systèmes produisent des valeurs d'inductions

magnétiques comprises entre 0,5 et 1,5 T. Il s'agit des aimants permanents ou des électroaimants. Par ailleurs, la géométrie des aimants impacte sur les inductions délivrées par ces derniers. L'intensité et l'homogénéité du flux d'induction créés par un aimant augmentent avec le ratio géométrique $w = \frac{h}{l}$ et le ratio $\frac{l}{s}$ [193] avec, l , longueur de l'aimant, h , sa hauteur et s , l'espace séparant l'aimant du point de mesure. En outre, le gradient d'induction en première approximation s'exprimant comme $\approx \frac{B}{w}$, il s'agira de sélectionner des aimants ayant des rapports d'aspect $\frac{h}{l}$ les plus petits possibles tout en travaillant au plus près de la zone cible.

Extension d'un gradient de nanobilles

L'application d'une force magnétique permet la génération de divers profils de nanobilles. Elles peuvent s'arranger selon des gradients dont la longueur est modulable (de quelques dizaines jusqu'à quelques centaines de micromètres) ou selon des ensembles compacts de quelques micromètres de diamètre en des positions spatialement définies.

Force hydrodynamique Lors de la mise en mouvement les nanobilles, la force magnétique est contrebalancée par une force de friction hydrodynamique. Pour une $\mathbf{v}_p$, la vitesse de déplacement (en m.s^{-1}), cette dernière s'exprime pour des particules sphériques comme

$$\mathbf{F}_d = -\gamma f_d \mathbf{v}_p \quad (2.39)$$

où, $\gamma = 6 \pi \eta r$ est le coefficient de friction (en N.s.m^{-1}), η_{milieu} est la viscosité du milieu entourant les nanobilles magnétiques (en N.s.m^{-2}). f_d est le coefficient de traînée de la nanobille (sans unité). Il prend en compte l'influence de la paroi solide au voisinage des nanoparticules en mouvement et se calcule de la manière suivante [178]

$$f_d = \left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{r}{r+z} \right) + \frac{1}{8} \left(\frac{r}{r+z} \right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{r}{r+z} \right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{r}{r+z} \right)^5 \right]^{-1} \quad (2.40)$$

où, z est la distance de la particule à la paroi et r , le rayon de la bille magnétique. En suspension, les nanobilles évoluent à différents z et la force de traînée visqueuse varie. Par exemple, pour des z réduits, $f_d \approx 3$ et donc la force de traînée hydrodynamique est 3 fois plus importante que lorsqu'il n'y a pas de paroi solide à proximité de la particule.

On peut ainsi déterminer la valeur de la vitesse maximale qui peut être atteinte par les nanobilles en suspension (cf. 2.37 et 2.39).

$$\mathbf{v} = \frac{1}{\mu_0 f_d} \mu_m (\mathbf{B} \cdot \nabla) \mathbf{B} \quad (2.41)$$

avec

$$\mu_m = \frac{V_p \chi}{\gamma} = \frac{2r^2 \chi}{9\eta} \quad (2.42)$$

Où, μ_m représente la mobilité «magnétophorétique» de la nanobille. Ce paramètre permet de déterminer le degré de «maniabilité magnétique» de la particule d'intérêt [182].

Viscosités d'extraits acellulaires Par ailleurs, nos expériences seront menées au sein d'extraits d'œufs de xénope. Cela impacte directement sur la force hydrodynamique ressentie par les nanobilles. La viscosité du cytoplasme cellulaire est supérieure à celle de l'eau : la force magnétique générée sur les nanobilles doit donc nécessairement être plus importante afin d'aboutir aux mêmes vitesses de déplacement $v_{p,max}$. *Plus précisément, la viscosité de l'extrait a été évaluée à $20 \cdot 10^{-3}$ Pa.s [204] alors que la valeur de la viscosité de l'eau est égale à 10^{-3} Pa.s.* Cette valeur importante obtenue au sein d'extraits cytoplasmiques s'explique par la présence à haute concentration de vésicules ainsi que de protéines et particulièrement de protéines globulaires. Toutefois, diverses méthodes de préparation d'extraits CSF existent impliquant notamment différentes valeurs de vitesse de centrifugation. Une telle disparité de protocoles induit nécessairement une variabilité quant à la concentration finale de protéines au sein de ces extraits. C'est pour cette raison que nous avons choisi de déterminer la viscosité d'extraits cytoplasmiques comme étant 5 fois supérieure à celle de l'eau [134].

Conséquences En contrôlant finement les effets de la force magnétique et de la force hydrodynamique sur les nanocargos, nous pourrions déterminer précisément la position qu'ils adoptent en cours de manipulation magnétique. Plus exactement, la nucléation des microtubules semble opérer à proximité des chromosomes au niveau de la chromatine alors que la stabilisation peut s'étendre jusqu'à $30 \mu\text{m}$ des chromosomes [108, 131]. La nucléation des microtubules doit donc s'effectuer depuis une zone de taille comparable à celle présumée active en mitose. Nous choisissons donc de concentrer les nanocargos sur une zone de taille comprise entre 1 et $10 \mu\text{m}$ [134]. Des aimants permanents génèrent par exemple des gradients d'inductions magnétiques compris entre 10 T.m^{-1} et 50 T.m^{-1} (cf. Annexe 2.3). La force magnétique exercée par de tels aimants sur une nanobille superparamagnétique de 120 nm de diamètre varie entre 2 fN à 10 fN ce qui correspond à une vitesse maximale induite au sein d'extraits CSF égale à $0,5 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. Si l'on calcule, par l'intermédiaire de l'équation de Stokes

Einstein, le coefficient de diffusion de ces nanobilles au sein d'extraits d'œufs de xénope, il vient $D = 0,75 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. A l'équilibre stationnaire, le profil spatial de nanobilles est alors distribué avec une longueur caractéristique de $1,5 \mu\text{m}$.

Analyse du temps de réponse

Les nanobilles vont atteindre leur position d'équilibre à l'application du champ magnétique en un temps qui peut varier de quelques secondes jusqu'à quelques minutes voire même une heure. Pourtant, ils doivent être magnétiquement organisés en un temps compatible avec celui défini par nos expériences de nucléation et de croissance de microtubules. Les microtubules polymérisent *in vitro* à une vitesse comprise entre $0,5$ et $2 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$. 15 à 60 minutes sont donc nécessaires pour que des ensembles de microtubules apparaissent. Ceci implique, pour une application adaptée à notre travail, que la répartition magnétique de nanocargos soit effectuée en quelques minutes.

Pour ce faire, une force magnétique maximale doit être exercée. Il s'agit d'utiliser d'une part des matériaux magnétiques optimisés pour élaborer les nanobilles leur conférant des moments magnétiques optimaux. D'autre part, il faudra générer pour les manipuler des gradients d'induction conséquents, de quelques dizaines de T.m^{-1} voire une centaine de T.m^{-1} . Une vitesse optimale comparée à la viscosité de la suspension pourra ainsi être atteinte. Toutefois, cette force magnétique importante va alors être pondérée par une force hydrodynamique conséquente.

Des considérations quant aux dimensions des systèmes d'étude s'imposent. Reprenons l'exemple exposé dans le paragraphe «Conséquences» pour lequel le profil spatial de nanobilles à l'équilibre est distribué avec une longueur de $1,5 \mu\text{m}$ au bord d'une paroi de canal. Du fait de la faible vitesse des nanobilles superparamagnétiques, les nanobilles vont mettre, au sein d'un canal de $1,5 \text{ mm}$ de largeur par exemple, 50 minutes pour atteindre leur position d'équilibre ! Si l'on considère un canal microfluidique de largeur égale à $100 \mu\text{m}$ dans les mêmes conditions que précédemment, l'équilibre stationnaire est en revanche atteint en un peu moins de 3 minutes 30 secondes.

Les dimensions du système sont donc critiques. Afin de restreindre la taille du système d'étude, nous avons opté pour deux types méthodes d'encapsulations d'extraits acellulaires : des microémulsions formant des gouttes de 40 à $80 \mu\text{m}$ de rayon et des microcanaux de largeur comprise entre $100 \mu\text{m}$ et $500 \mu\text{m}$ et de hauteur variant de $10 \mu\text{m}$ à $60 \mu\text{m}$.

Stabilité colloïdale

Lorsque le champ magnétique extérieur est supprimé, les nanocargos se dispersent dans la suspension sous l'effet de l'énergie $k_B T$. Par ailleurs, en cours de manipulation magnétique, les effets de l'énergie d'agitation thermique sur des nanobilles ne sont plus négligeables. Les forces dues au mouvement brownien sont importantes [179, 180] alors que la force magnétique, qui est proportionnelle à r^{-3} , diminue fortement. Le mouvement de nanobilles supposées sphériques en solution est dicté par l'équation de Langevin :

$$M \frac{dv}{dt} = F_{mi} - F_d + F_l \quad (2.43)$$

Où, M est la masse de la nanobille et v sa vitesse. F_{mi} est la force magnétique induite sur la nanoparticule, F_d la force de traînée et F_l est la force de Langevin qui traduit la somme des chocs moléculaires conduisant aux fluctuations stochastiques associées au mouvement brownien. F_l suit une distribution de type Gaussien :

$$\langle F_l(t) F_l(t') \rangle = 4\pi k_B T \eta \gamma r \delta(t - t') \quad (2.44)$$

Où t et t' représentent deux instants différents. La force de Langevin est une force fluctuante nulle en moyenne, i.e. $\langle F_l(t) \rangle = 0$.

A l'échelle d'une nanobille, les effets de la force de Langevin ne sont plus négligeables. Divers paramètres sont à considérer afin de garantir la stabilité de la suspension de nanobilles à l'application du champ magnétique.

Aspects magnétiques Le paramètre sans dimension ζ^{inter} introduit précédemment estime le rapport entre énergie magnétostatique et énergie thermique. ζ^{inter} donne une approximation raisonnable de l'aimantation effective d'un agrégat de nanobilles agissant comme un seul et même dipôle magnétique [169].

En outre, exercée sur des nanobilles de moins d'une centaine de nanomètres de rayon, l'énergie thermique peut s'avérer supérieure à l'énergie d'interaction dipôle-dipôle inter-particules. Le mouvement brownien des particules est trop important empêchant l'agrégation des billes sous forme de chaînes et rendant impossible le déplacement et la concentration des particules en un temps raisonnable. Par exemple avec des particules de rayon 25 nm concentrées à 0.3 mg.mL⁻¹ sur une lamelle de microscope, Schaller *et al.* n'ont observé aucun changement dans la concentration de la solution à l'approche d'un aimant, et ce, pendant une durée de 30 minutes [179]. C'est pourquoi il faut contrôler la valeur d'un paramètre noté ζ^{intra} qui compare l'intensité de l'énergie magnétostatique inter-particules par rapport à l'énergie thermique [181, 179] et définit par :

$$\zeta^{intra} = \frac{\mu_0(|\mathbf{m}|_p)^2}{4\pi(d)^3 k_B T} \quad (2.45)$$

Où, $|\mathbf{m}|_p$ est la norme du moment magnétique par particule exprimée en A.m² et $d = 2r$ le diamètre de la particule.

En général, pour des particules dont la taille est supérieure à 200 nm, $\zeta^{intra} \geq 1$ indiquant que l'interaction des moments magnétiques inter-particules est telle qu'elle provoque l'aggrégation spontanée des nanobilles magnétiques et ne peut donc plus être négligée dans l'expression de la force magnétique. Plus précisément, dans ce cas, le mouvement brownien ne prévaut pas sur l'accrétion des nanobilles lorsque $1 \leq \zeta^{intra} \leq 100$. Par exemple, la valeur de ζ^{intra} pour des particules superparamagnétiques de 120 nm de diamètre approche 100 ce qui signifie que l'interaction magnétique inter-particules existe au sein de la suspension alors que pour des micelles de 50 nm de diamètre fluorescentes dopées avec des particules magnétiques d'oxyde ferrique de 3 nm de diamètre $\zeta^{intra} \approx 10^{-12} \ll 1$ ce qui nous signale que le mouvement brownien sur ces nanobilles prédomine et peut contrebalancer les effets de la force magnétique.

Aspects diffusifs En outre, le coefficient de diffusion D introduit plus tôt permet d'établir le rapport entre la quantité d'énergie mise en œuvre par le mouvement brownien et le coefficient de friction γ . Par exemple, une bille superparamagnétique d'un rayon de 500 nm possède un coefficient de diffusion égal à $4,8.10^{-13} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ à température ambiante. La longueur de diffusion d'une particule varie en $\sqrt{Dt}$. Cela signifie qu'après 1 s de diffusion, la particule peut encore se déplacer sur une distance de 0,7 μm . Considérons maintenant une particule superparamagnétique disposant d'un rayon de 100 nm, son coefficient de diffusion est égal à $2,4.10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$, doublant le temps de diffusion par rapport au cas précédent. Si l'on calcule par l'intermédiaire de l'équation de Stokes Einstein le coefficient de diffusion des nanobilles au sein d'extraits d'œufs de xénope, il vient $D = 0,75 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Reprenons l'exemple de nanobilles superparamagnétiques de 120 nm de diamètre atteignant leur position d'équilibre en 50 minutes dans un canal de 1.5 mm de largeur. Durant cet intervalle de temps, les particules peuvent diffuser sur une longueur égale à 48 μm . Ceci a donc des conséquences directes sur les trajectoires des particules et il faut intégrer un terme correctif dans la solution de l'équation du mouvement tenant compte de ce phénomène.

2.4.3 Applications

Bilan des forces s'appliquant sur des nanobilles superparamagnétiques

A l'application d'un champ magnétique, les nanobilles ressentent les effets (i) d'une force magnétique qui après simplification s'exprime par :

$$\mathbf{F}_m = \frac{V_p \chi_f}{\mu_0} \nabla \mathbf{B}^2 \quad (2.46)$$

Où, $\chi_f = \varphi_f \chi$ est la susceptibilité magnétique du ferrofluide, $V_p = \frac{4}{3}\pi r^3$ le volume de la particule en m^3 , r le rayon de la particule et $\mu_0 = 4\pi 10^{-7}$ la perméabilité du vide en $\text{Wb.A}^{-1}.\text{m}^{-1}$. En outre, sous l'effet d'une excitation magnétique suffisante (à partir de 100 mT), l'aimantation des nanobilles superparamagnétiques est constante et égale à sa valeur de saturation. $\mathbf{F}_m$ s'exprime comme :

$$\mathbf{F}_m = \mathbf{m}_{fs} \nabla \mathbf{B} = V_p \mathbf{M}_{fs} \nabla \mathbf{B} \quad (2.47)$$

où, $|\mathbf{m}|_{fs} = V_p |\mathbf{M}|_{fs}$ est le moment magnétique à saturation du ferrofluide en A.m^2 , $|\mathbf{M}|_{fs} = \varphi |\mathbf{M}|_s$, l'aimantation à saturation de la suspension en A.m^{-1} .

(ii) d'une force hydrodynamique opposée à la force magnétique $\mathbf{F}_m$ et d'expression :

$$\mathbf{F}_d = -\gamma f_d \mathbf{v}_p \quad (2.48)$$

En revanche, les effets de la force de Langevin sur les nanobilles superparamagnétiques ne sont pas considérés ici. L'évaluation de deux paramètres sans dimension précédemment introduits nous permet d'estimer que les forces exercées par le mouvement brownien sont négligeables dans notre problème par rapport aux forces exercées magnétiquement et hydrodynamiquement. D'une part, pour des particules de 120 nm de diamètre et pour des inductions magnétiques supérieures à 100 mT, le rapport entre énergie magnétostatique et énergie thermique (paramètre ζ^{inter} , cf. Equation 2.30) est environ égal à 2. Ceci montre que les nanobilles superparamagnétiques en suspension répondent à l'action du champ magnétique lors de son application et qu'elles se comportent comme un seul et même dipôle magnétique. D'autre part, pour des valeurs d'inductions magnétiques supérieures à 100 mT, le paramètre ζ^{intra} (cf. Equation 2.45) est approximativement égal à 100 ce qui nous prouve que l'intensité de l'énergie magnétostatique engagée entre les nanobilles à l'application du champ magnétique est supérieure à l'énergie thermique.

Résolution de l'équation de la conservation de la masse

Afin de déterminer le profil de concentration au bord de la paroi du canal, il faut résoudre l'équation de la conservation de la masse [186, 187] pour des nanobilles en suspension en considérant les phénomènes de convection et de

diffusion au sein de la solution de billes ainsi que les forces magnétique et de traînée hydrodynamique en présence.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \Delta C - \frac{|\mathbf{F}_m|}{\gamma} \nabla C \quad (2.49)$$

où, C est la concentration de particules en Mol.L^{-1} , D le coefficient de diffusion de la nanobille (relation de Stokes-Einstein) d'expression $\frac{kT}{\gamma}$ en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Nous étudions le problème à l'équilibre stationnaire, i. e, lorsque $t > \tau_s$ avec τ_s dépend de la force de l'aimant utilisé et de la concentration de la suspension et varie de quelques secondes à quelques minutes.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = 0 \quad (2.50)$$

Ainsi,

$$D \nabla C - \frac{|\mathbf{F}_m|}{\gamma} C = 0 \quad (2.51)$$

Le profil de la fraction volumique φ_f de la suspension colloïdale s'écrit en intégrant l'expression de $\mathbf{F}_m$ et en sachant que φ_f est proportionnelle à la concentration C .

$$\frac{\partial \varphi_f}{\partial t} = \nabla \cdot [\varphi_f \mathbf{v}_p - D \nabla \varphi_f] = 0 \quad (2.52)$$

Avec,

$$\frac{\nabla \varphi_f}{\varphi_f [1 - \varphi_f]} = \left[\coth(\zeta^{inter}) - \frac{1}{\zeta^{inter}} \right] \nabla \zeta^{inter} \quad (2.53)$$

En considérant que $\zeta^c = \frac{M_s V_p}{kT}$ est une constante, on intègre l'ensemble sur ζ^{inter} ,

$$\frac{\varphi_f}{\varphi_f [1 - \varphi_f]} = A \frac{\sinh(\zeta^{inter})}{\zeta^{inter}} \quad (2.54)$$

où, A est une constante d'intégration déterminée par les conditions aux limites de notre problème. On considère que loin de la source de champ, la concentration de nanobilles est égale à la concentration initiale introduite, soit $C = C_b$.

$$C_b = \left[1 + A^{-1} \frac{\zeta_0^{inter}}{\sinh(\zeta_0^{inter})} \right] \quad (2.55)$$

En remplaçant C_b dans l'équation 2.55, la concentration locale φ s'écrit :

$$\varphi_f = \left[1 + \left(\frac{1 - C_b}{C_b} \right) \frac{\sinh(\zeta_0^{inter})}{\sinh(\zeta^{inter})} \frac{\zeta^{inter}}{\zeta_0^{inter}} \right]^{-1} \quad (2.56)$$

Le paramètre sans dimension ζ^{inter} représente le ratio d'énergie magnéto-statique « locale » et ζ_0^{inter} caractérise le ratio d'énergie d'une nanobille dans la suspension de nanobilles, cette dernière se trouvant éloignée de toute source de

champ magnétique. En outre, l'expression 2.56 décrit relativement bien la saturation près de fortes sources de gradients de champs magnétiques (particules agrégées) sans avoir à ajouter de terme géométrique artificiel. Lorsque $\zeta^{inter} \geq \zeta_0^{inter}$, $\varphi_f \approx 1$ alors que si $\zeta^{inter} = \zeta_0^{inter}$ (particule loin de la source de champ magnétique), cela signifie que la concentration locale de nanobilles converge vers 0 soit celle prévalant dans la suspension de nanobilles. Les particules se concentrent dans des régions où le champ magnétique local est supérieur au champ uniforme extérieur ($\zeta^{inter} > \zeta_0^{inter}$). Cette situation se produit quand le champ à proximité de la source de champ magnétique est aligné avec le champ extérieur. A l'inverse, les particules superparamagnétiques se déplacent des régions dans lesquelles $\zeta^{inter} < \zeta_0^{inter}$.

Profils de concentration produits

On résout l'équation 2.51 avec les expressions simplifiées de la force magnétique déjà établies en 2.46 et en 2.47. Ceci revient à résoudre une simple équation différentielle du premier degré dont la solution est

$$C = C(y=0) \exp\left(\frac{-y}{\ell}\right) \quad (2.57)$$

Où,

$$\ell = \frac{k_B T}{V_p \chi_f \frac{\nabla B^2}{2}} \quad (2.58)$$

ou alors

$$\ell = \frac{k_B T}{V_p M_{fs} \nabla B} \quad (2.59)$$

ℓ s'exprime en m. Cette grandeur caractéristique détermine en effet l'épaisseur de la couche de nanobilles formée au sein la suspension au bord de la paroi du canal.

Nota Bene :

Il est clair que les profils de concentrations prédits par les deux solutions sont équivalents. Rappelons l'équation 2.56 :

$$\varphi_f = \left[1 + \left(\frac{1 - C_b}{C_b} \right) \left(\frac{\exp(\zeta_0^{inter}) - \exp(-\zeta_0^{inter})}{\exp(\zeta^{inter}) - \exp(-\zeta^{inter})} \right) \frac{\zeta^{inter}}{\zeta_0^{inter}} \right]^{-1} \quad (2.60)$$

Avec, $\zeta^{inter} = \zeta^c B$, avec $\zeta^c = \frac{M_s V_p}{k_B T} \gg 1$ et $B = |\mathbf{B}|$, la norme de l'induction magnétique comprise entre 0 et 1 T. En considérant un ensemble de nanobilles soumises à une induction faible, il vient $\exp(-\zeta^c B) \rightarrow 0$ et $\exp(-\zeta^c B_0) \rightarrow 0$. Ceci simplifie l'équation 2.60 en

$$\varphi_f \approx \Phi \frac{1}{\exp[\zeta^c (B_0 - B)]} \quad (2.61)$$

où, Φ est une constante dépendant de la concentration initiale de la suspension de nanoparticules. Rappelons que $\approx \frac{B}{w}$ avec $w = w(y)$ et l'équation précédente devient :

$$\varphi_f \approx \Phi \exp[-\zeta^c w(y)] = \Phi \exp[-\frac{w(y)}{L}] \quad (2.62)$$

avec, $L = \frac{1}{\zeta^c}$ relatif à une longueur et w dépendant de y . Cette solution est bien analogue à l'équation 2.57.

2.5 Annexe 2.E. Approche d'un aimant permanent à proximité d'une suspension de nanobilles superparamagnétiques. Simulations par éléments finis

Afin de modéliser l'accumulation de nanobilles au bord d'une paroi de canal microfluidique sous l'action d'un aimant de forme cubique, nous utilisons le logiciel COMSOL Multiphysics (Stockholm, Suède).

2.5.1 Elaboration

Contexte et environnement Comsol

Nous avons développé un modèle mathématique simulant les forces s'exerçant sur les billes magnétiques. Pour ce faire, nous élaborons un modèle incluant les forces diffusives, fluidiques et magnétiques agissant sur les nanobilles superparamagnétiques. En 2D, on reproduit un canal microfluidique auprès duquel on place un aimant permanent le tout étant entouré par de l'air (Fig. 2.11). Le logiciel calcule le potentiel magnétique généré par l'aimant permanent et en déduit le champ magnétique ainsi que l'induction résultante. Cette induction magnétique engendre une force affectant le comportement des nanobilles magnétiques en suspension dans le canal.

Le modèle magnétostatique

L'aimant permanent génère un champ magnétique inhomogène qui permet la mise en mouvement des nanobilles superparamagnétiques. Le champ magnétique dans ce problème s'écrit :

$$\nabla \mathbf{H} = \mathbf{J} \quad (2.63)$$

En outre, la loi de Gauss pour l'induction magnétique établit que :

$$\nabla \mathbf{B} = 0 \quad (2.64)$$

Les équations constitutives décrivant les relations entre $\mathbf{B}$ et $\mathbf{H}$ dans les différents groupes du domaine magnétostatique sont :

$$\mathbf{B} = \begin{cases} \mu_0 \mu_{r,mag} \mathbf{H} + B_r, & \text{aimant permanent,} \\ \mu_0 (\mathbf{H} + M_f(\mathbf{H})), & \text{ferrofluide,} \\ \mu_0 \mathbf{H}, & \text{air.} \end{cases} \quad (2.65)$$

où, $\mu_{r,mag}$ est la perméabilité relative de l'aimant permanent (sans dimension), B_r , l'induction rémanente, M_f le vecteur aimantation au sein de la suspen-

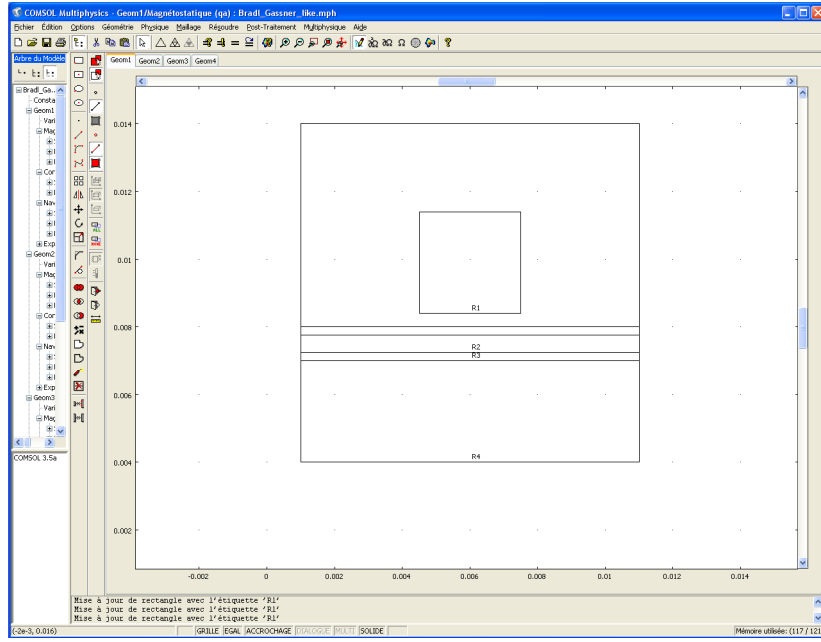


FIGURE 2.11 – Le modèle élaboré dans l’environnement Comsol. Les éléments de géométrie représentés sont (R1) l’aimant permanent, (R2) le canal microfluidique, (R3) la lamelle de microscope sur laquelle repose le canal et (R4) le milieu dans lequel se trouve l’ensemble i.e. l’air.

sion de nanobilles superparamagnétiques en $A.m^{-1}$ qui est fonction de la norme du champ magnétique H .

Sachant que le potentiel magnétique $\mathbf{A}$ s’écrit :

$$\mathbf{B} = \nabla \times \mathbf{A} \quad \nabla \cdot \mathbf{A} = 0 \quad (2.66)$$

Il ne reste plus qu’à substituer dans l’équation 2.63 l’expression de l’équation 2.65.

$$\nabla \times \left(\frac{1}{\mu} \nabla \times \mathbf{A} - \mathbf{M} \right) = \mathbf{J} \quad (2.67)$$

En 2D et sans courant perpendiculaire au plan de travail, cette expression se simplifie en :

$$\nabla \times \left(\frac{1}{\mu_0} \nabla \times \mathbf{A} - \mathbf{M} \right) = \mathbf{0} \quad (2.68)$$

Pour que cette dernière équation soit valable, le vecteur potentiel magnétique n’a qu’une composante non nulle, celle qui se situe dans le plan perpendiculaire au plan de travail, i.e. $\mathbf{A} = (0, 0, A_z)$. L’aimantation induite M_f d’un fluide est exprimée par une fonction arctangente avec deux paramètres matériels

[177]. De plus, du fait de l'utilisation d'un aimant permanent, il est possible de linéariser cette expression en arctan qui devient :

$$\mathbf{M}_f = \begin{pmatrix} M_{fx} \\ M_{fy} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{\chi \partial A_z}{\mu_0 \partial y} \\ -\frac{\chi \partial A_z}{\mu_0 \partial x} \end{pmatrix} \quad (2.69)$$

Conditions aux limites Assez loin de l'aimant permanent, nous appliquons la condition aux limites «isolation magnétique» soit $A_z = 0$. Pour l'aimant et le canal microfluidique, il s'agit de la condition «continuité», c'est-à-dire, $\mathbf{n} \times (\mathbf{H}_2 - \mathbf{H}_1) = 0$, qui est appliquée.

Le modèle convection-diffusion

En premier lieu, nous formulons l'hypothèse suivante : l'équation de conservation de la masse que le solveur Comsol résout est conservative. En outre, nous négligeons les interactions entre les particules magnétiques. La force magnétique s'écrit :

$$\mathbf{F}_m = V (\mathbf{M} \cdot \nabla) \mathbf{B} = V \begin{pmatrix} M_{fx} \frac{\partial B_x}{\partial x} + M_{fy} \frac{\partial B_x}{\partial y} \\ M_{fx} \frac{\partial B_y}{\partial x} + M_{fy} \frac{\partial B_y}{\partial y} \end{pmatrix} \quad (2.70)$$

ce qui donne,

$$\mathbf{F}_m = \frac{\chi}{\mu_0 \mu_r^2} \begin{pmatrix} \frac{\partial A_z}{\partial x} \frac{\partial^2 A_z}{\partial^2 x} - \frac{\partial A_z}{\partial y} \frac{\partial^2 A_z}{\partial y \partial x} \\ -\frac{\partial A_z}{\partial x} \frac{\partial^2 A_z}{\partial y \partial x} + \frac{\partial A_z}{\partial y} \frac{\partial^2 A_z}{\partial^2 y} \end{pmatrix} \quad (2.71)$$

où, μ_r est la perméabilité des billes magnétiques. Afin d'obtenir l'expression finale de la force magnétique agissant sur les nanobilles superparamagnétiques, il suffit de multiplier cette dernière expression par la fraction volumique en nanobilles superparamagnétiques de la suspension φ_f .

Conditions aux limites A l'entrée du canal, nous imposons la concentration avec la condition $C = C_0$ avec C_0 la concentration de la solution de billes en suspension. Sur les parois ainsi qu'à la sortie du canal, nous fixons un flux nul.

2.5.2 Validation

Mode opératoire

Afin que l'analyse des résultats issus de ces simulations soit pertinente, nous allons les confronter à ceux obtenus par des méthodes théoriques, calculatoires et expérimentales. Plus précisément, ce modèle par éléments finis reproduit une

expérience de concentration magnétique de nanobilles superparamagnétiques au bord d'un mur et nous fournit une évaluation de l'induction magnétique, du gradient de champ magnétique produit par l'aimant, de la force magnétique induite sur les nanobilles et aussi du profil adopté par ces dernières au bord de la paroi du canal.

En outre, deux méthodes (expérimentale et calculatoire) développées en 2.3 nous fournissent des valeurs d'inductions magnétiques. Nous appliquons à ces valeurs l'approche théorique décrite en 2.4 ce qui nous permet de prédire la force ainsi que le profil de concentration adopté par les nanobilles superparamagnétiques en suspension.

Enfin, une mesure directe de la force expérimentale magnétique est possible. Elle repose sur l'introduction au sein d'un canal microfluidique d'une solution de nanobilles Ademtech de 120 nm de diamètre. Sachant que $|\mathbf{F}|_m = |\mathbf{F}|_d = 6\pi\eta_{eau} r W$ et $W = d_t$, on mesure expérimentalement le temps t durant lequel les nanobilles se concentrent sur l'un des bords du canal lorsque que l'on positionne l'aimant à une distance fixée de la paroi. On peut alors calculer W et on peut en déduire la force magnétique expérimentale induite. Par exemple, l'expérience nous montre que pour un aimant cubique de 3 mm de côté

$$W = \frac{F_m}{\gamma} \approx 2,5 \cdot 10^{-5}, |\mathbf{F}|_m = 29 \text{ fN et } \nabla \frac{B^2}{2} \approx 74 \text{ T}^2 \cdot \text{m}^{-1} \text{ ou } \nabla B \approx 29 \text{ T} \cdot \text{m}^{-1}.$$

Pour un aimant cubique de côté 5 mm

$$W = \frac{F_m}{\gamma} \approx 2,5 \cdot 10^{-5}, |\mathbf{F}|_m = 35 \text{ fN et } \nabla \frac{B^2}{2} \approx 88 \text{ T}^2 \cdot \text{m}^{-1} \text{ ou } \nabla B \approx 35 \text{ T} \cdot \text{m}^{-1}.$$

Cette méthode conduit ainsi à l'estimation expérimentale du gradient de densité de flux magnétique, de la force ainsi que des profils de concentration générés sur des nanobilles superparamagnétiques.

Résultats

Nous allons donc comparer les inductions magnétiques, les forces magnétiques induites et les profils de concentration créés prédits par ces quatre différents démarches. Précisons que pour ce travail nous nous concentrons sur l'étude de deux aimants de forme cubique et de dimensions 5 mm x 5 mm et 15 mm x 30 mm.

Induction magnétique Sur les Figures 2.12 et 2.13 sont représentées les valeurs d'induction magnétique obtenues selon les différentes méthodes. Ces données confirment que l'induction magnétique est bien supérieure à l'extrémité de l'aimant qu'à son centre.

Les inductions magnétiques recueillies pour les petits aimants (dont les dimensions < 10 mm) sont similaires selon les divers méthodes envisagées. Elles présentent des écarts relatifs d'environ 10% entre 0 et 1 mm en distance aimant-sonde. En revanche, pour les grands aimants et à distance de travail réduite, les

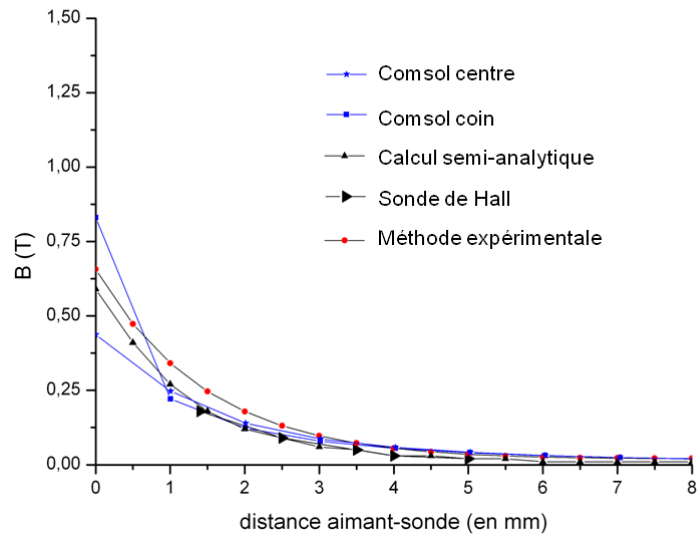


FIGURE 2.12 – Les inductions magnétiques mesurées ou calculées selon les différentes méthodes pour un aimant cubique de 5 mm de côté. «Comsol centre» : calcul effectué au niveau de l'axe central de l'aimant, «Comsol coin» : évaluation de l'induction produite à l'extrémité de l'aimant.

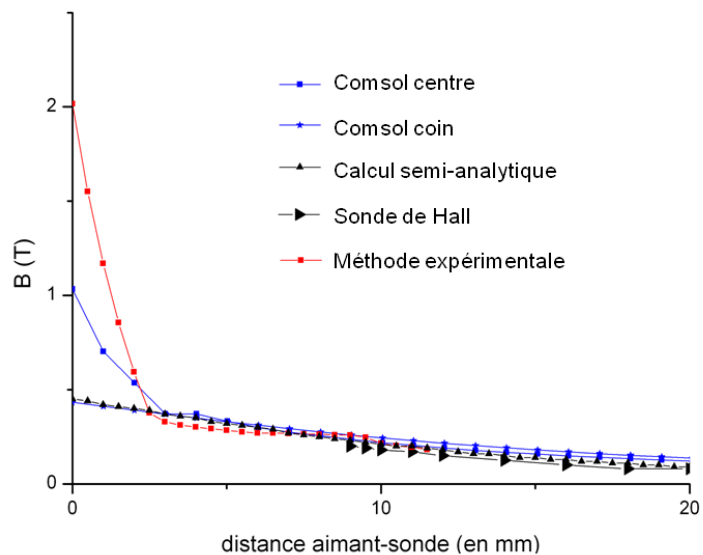


FIGURE 2.13 – Les inductions magnétiques mesurées ou calculées selon les différentes méthodes pour un aimant cubique de 30 mm de côté. «Comsol centre» : calcul effectué au niveau de l'axe central de l'aimant, «Comsol coin» : évaluation de l'induction générée à l'extrémité de l'aimant.

valeurs données par le calcul semi-analytique, la sonde de Hall ainsi que Comsol sont en deçà de celles dont on dispose expérimentalement. Ceci s'explique principalement par la difficulté d'obtenir des mesures précises de la force avec des aimants de grande taille proche de la paroi du canal microfluidique. Du fait de l'intensité importante de l'induction magnétique, les particules se déplacent très vite lorsque l'on approche l'aimant. Dans ces conditions, il est délicat de déterminer précisément le temps de réponse des nanobilles. Une autre méthode de caractérisation pour les grands aimants restent à envisager pour de petites distances de travail. En outre, nous avons déjà souligné la modicité des dimensions du capteur de la sonde de Hall expliquant l'absence de données pour ces mesures proches de l'aimant (Fig.2.13).

Force magnétique Les Figures 2.14 et 2.15 représentent les valeurs de forces magnétiques obtenues avec le modèle théorique (sonde de Hall et calcul semi-analytique), le modèle Comsol et la mesure directe. Puisque la force magnétique est proportionnelle au gradient d'induction, les mêmes remarques quant aux valeurs de forces recueillies s'imposent. Remarquons que le phénomène (différence de valeur à l'extrémité ou au centre) déjà observé pour l'induction magnétique prend des proportions importantes pour la force magnétique.

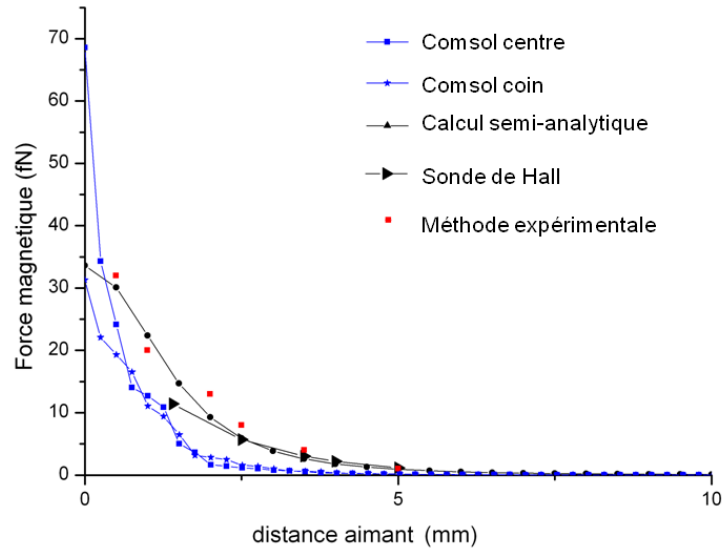


FIGURE 2.14 – Force magnétique mesurée ou calculée selon les différentes méthodes pour un aimant cubique de 5 mm de côté.

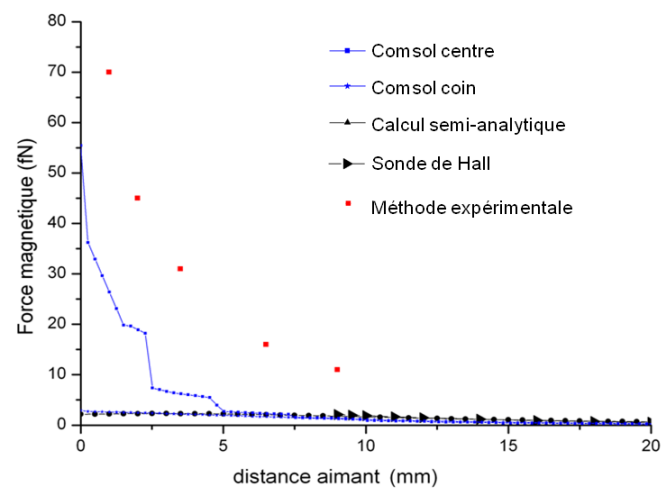


FIGURE 2.15 – Force magnétique mesurée ou calculée selon les différentes méthodes pour un aimant cubique de 30 mm de côté.

Profils de concentration

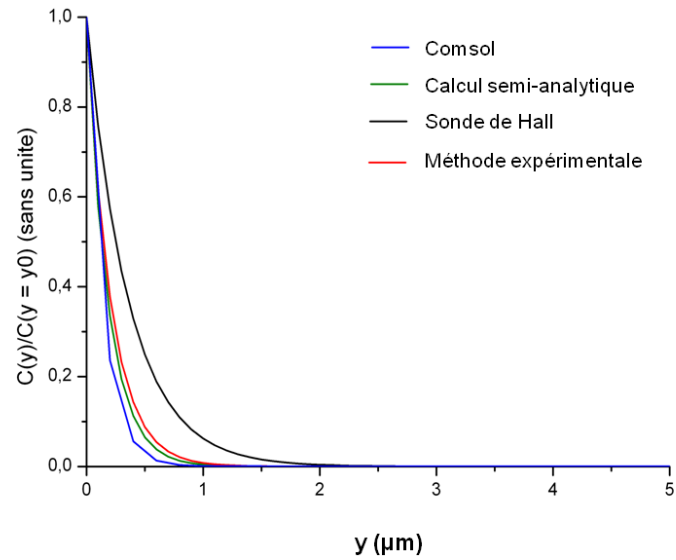


FIGURE 2.16 – Profils de concentration de nanobilles de 120 nm de diamètre. La concentration initiale des particules dans le canal est à $C_0 = 25$ nM à l’approche de l’aimant cubique de 5 mm de côté. On place l’aimant à 1 mm de la paroi du canal.

Comme attendu, les profils de concentration donnés par les différentes méthodes coïncident (2.16 et 2.17). Le logiciel Comsol adopte la même méthode de résolution que celle détaillée en 2.4.

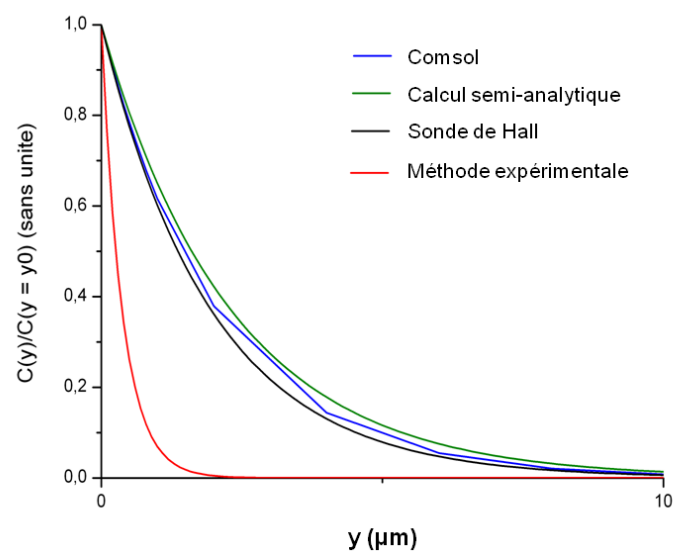


FIGURE 2.17 – Profils de concentration de nanobilles de 120 nm de diamètre. La concentration initiale des particules dans le canal est à $C_0 = 25$ nM à l’approche de l’aimant cubique de 15 mm de large et de 30 mm de long. On place l’aimant à 9 mm de la paroi du canal.

2.5.3 Simulations complémentaires

Le bon accord entre résultats expérimentaux, théoriques ainsi que logiciels nous assure de la validité du modèle élaboré par le logiciel Comsol. Pour évaluer l'influence des différents paramètres sur les profils de concentration de nanobilles, nous avons réalisé des simulations supplémentaires à partir de ce modèle.

Rayon des nanobilles

Plus le rayon des particules est petit, moins la force s'exerçant sur ces dernières est importante ($|\mathbf{F}|_m$ varie en r^3) (Fig.2.18). Les profils de concentration ont des longueurs caractéristiques ℓ de plus en plus importantes jusqu'à atteindre la taille critique de 1 mm (la largeur du canal simulé) pour un rayon r_c égal à 5 nm pour lequel l'aimant n'exerce plus aucun effet attractif sur la suspension de nanobilles superparamagnétiques (Fig.2.19).

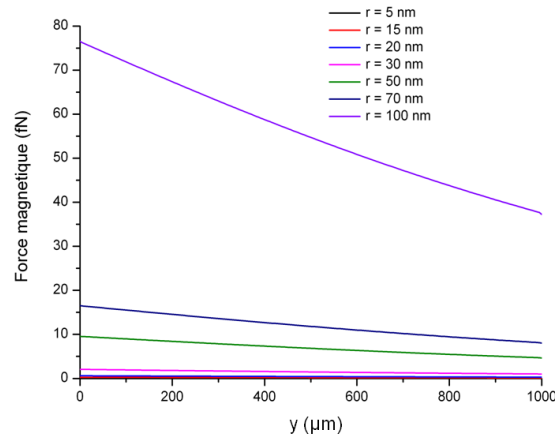


FIGURE 2.18 – Forces magnétiques s'exerçant sur une suspension de billes magnétiques calculées avec le logiciel Comsol pour différents rayons de nanobilles. La concentration initiale des particules dans le canal est à $C_0 = 25$ nm à l'approche de l'aimant cubique de 5 mm de côté. La position de l'aimant est fixée à 1 mm de la paroi du canal.

Position des aimants

L'intensité de la force magnétique générée à l'extrémité de l'aimant étant maximale, il semble judicieux de travailler avec le bord des aimants. Nous modélisons pour des positions d'aimants distinctes la force magnétique exercée sur les nanobilles (Fig.2.20) ainsi que les profils de concentration générés (Fig.2.21).

Avec un aimant unique au bord du canal, la force magnétique est maximale lorsque l'aimant est placé à 30° du canal microfluidique. Des simulations ont été effectuées avec un angle de 45° mais les courbes correspondantes ne sont pas

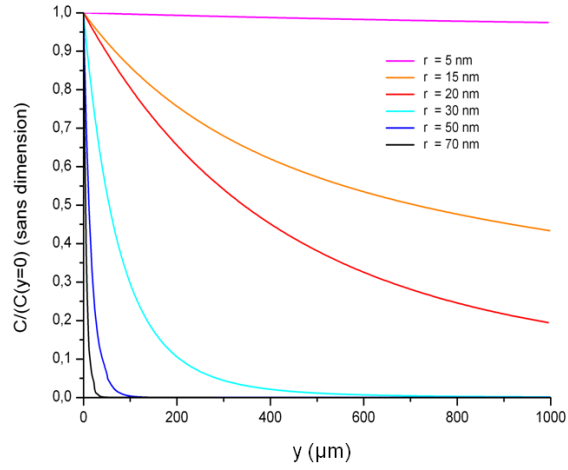


FIGURE 2.19 – Profils Comsol de concentration de nanobilles Ademtech de 120 nm de diamètre. La concentration initiale des particules dans le canal est à $C_0 = 25$ nM à l'approche de l'aimant cubique de 5 mm de côté. La position de l'aimant est fixée à 1 mm de la paroi du canal.

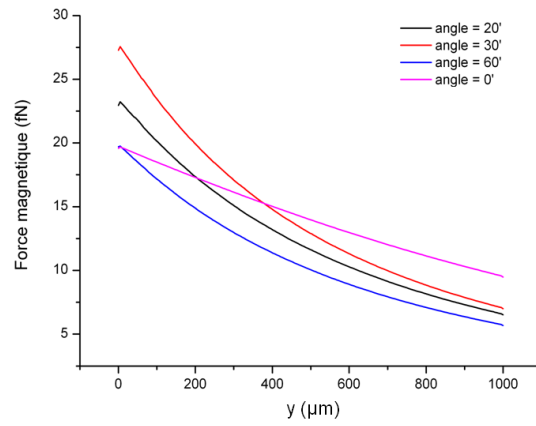


FIGURE 2.20 – Forces magnétiques s'exerçant sur une suspension de billes magnétiques calculées avec le logiciel Comsol. La concentration initiale des particules dans le canal est à $C_0 = 25$ nM à l'approche de l'aimant cubique de 5 mm de côté. On place l'aimant à 5 mm de la paroi du canal et l'angle formé entre le canal et l'aimant est compris entre 0 et 60° .

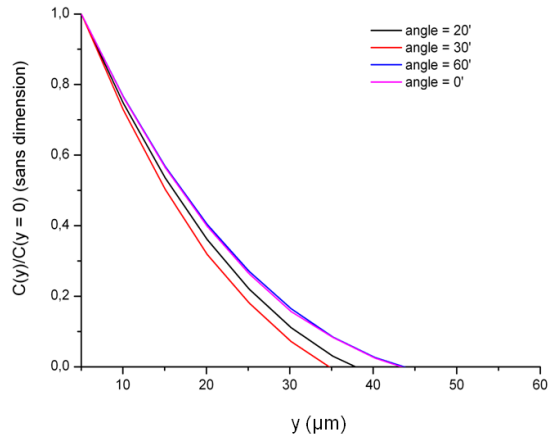


FIGURE 2.21 – Profils de concentration de nanobilles de 120 nm de diamètre. La concentration initiale des particules dans le canal est à $C_0 = 25$ nM à l’approche de l’aimant cubique de 5 mm de coté. On place l’aimant à 1 mm de la paroi du canal et l’angle formé entre le canal et l’aimant est compris entre 0 et 60° .

représentées sur les figures 2.20 et 2.21 car les résultats sont similaires à ceux obtenus pour un angle de 30° . Nous notons aussi que pour cette configuration, les particules se concentrent sur une zone plus restreinte. Le profil de concentration engendré au bord du canal possède une épaisseur de couche d’accrétion ℓ plus courte (Fig.2.21).

Fraction volumique de nanobilles

La fraction volumique influe bel et bien sur l'intensité de la force magnétique agissant sur les particules. Plus la suspension a une fraction volumique φ_f importante, plus ℓ est petite comme montré sur la Figure 2.22. Précisons ici qu'au delà d'une fraction en nanobilles supérieure ou égale à 10% de la suspension, le logiciel Comsol nous fournit des profils de concentration incohérents. Ceci indique que si travailler à une fraction volumique élevée accroît l'intensité de la force magnétique, cela conduit aussi à une augmentation de la viscosité de la suspension et donc à une force de trainée hydrodynamique conséquente.

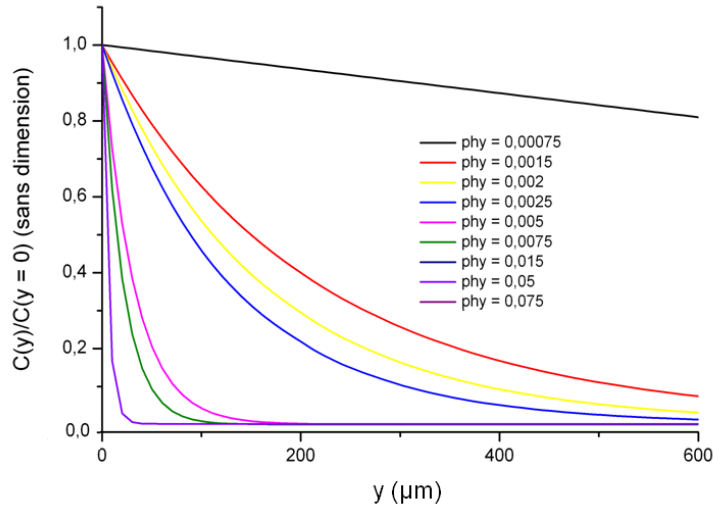


FIGURE 2.22 – Profils de concentration pour différentes fractions volumiques de suspension de nanobilles Ademtech de 125 nm de diamètre. La concentration initiale des particules dans le canal est variée de $C_0 = 1,5$ nM à $C_0 = 125$ nM. On place l'aimant de 5mm de côté à 1 mm de la paroi du canal.

Chapitre 3

Annexe 3. Microsystèmes électriques pour la modification spatiotemporelle de la concentration à l'échelle d'un tissu en développement

3.1 Annexe 3.A. Protocole de fabrication du micro-système de première génération

Nettoyage	
Substrat de base	D263 de diamètre 50 mm, épaisseur 550 μm (Opticad, Mitry-Mory, France)
Ultrasons	140 % 10 min, acétone
Rinçage	Eau
Nettoyage Piranha	2/3 H_2SO_4 (95%) + 1/3 H_2O_2 (30 %) pendant 1h30
Rinçage	Eau puis isopropanol
Séchage	Azote
Lithographie optique	
Niveau 1	
Enduction	Résine :AZnLOF 2070 (AZ Electronic Materials, Branchburg, Allemagne)
	Masque en chrome : niveau «microélectrodes»
	Vitesse : 4000 rpm avec une accélération de 2000 rpm.s ⁻¹ , 30 secondes
Premier recuit	1 minute à 110 °C
Insolation	54 secondes avec l'aligneur Karlsüss MJB3 UV3, $\lambda = 310 \text{ nm}$
Deuxième recuit	1 minute à 110 °C
Développement	1 minute 30 secondes dans le développeur LDD26 W (Rohr and Haas Electronic Materials, Coventry, Royaume-Uni)
Rinçage	Eau, environ 30 secondes
Séchage	Azote
Métallisation	
IBE (Ion Beam Etching)	Nettoyage plasma de la surface de l'échantillon
Dépôt	10 nm de couche d'accroche en titane et 70 nm de platine
Lift-off	Bain d'acétone pendant 1 heure
	Nettoyage à l'acétone puis à l'isopropanol
	Séchage à l'azote

Lithographie optique Niveau 2	
Enduction	Résine :AZnLOF 2070 Masque en chrome : niveau 2 «mesas» Vitesse : 4000 rpm avec une accélération de 2000 rpm.s ⁻¹ , 30 secondes
Premier recuit	1 minute à 110°C
Insolation	54 secondes avec l'aligneur Karlsüss MJB3 UV3, $\lambda = 310$ nm
Deuxième recuit	1 minute à 110°C
Développement	1 minute 30 secondes dans le développeur LDD26 W
Rinçage	Eau, environ 30 secondes
Séchage	Azote
Métallisation	
IBE	Nettoyage plasma de la surface de l'échantillon
Dépôt	10 nm de couche d'accroche en titane et 150 nm d'or
Lift-off	Bain d'acétone pendant 1 heure Nettoyage à l'acétone puis à l'isopropanol Séchage à l'azote
Lithographie optique Niveau 3	
Enduction	Tournette : RC-8 équipée système gyrset Masque en chrome sur verre : «piscine» Résine : SU-8 2005 (Microchem, MA) Vitesse : 1800 rpm avec une accélération de 400 rpm.s ⁻¹ , 30 secondes
Premier recuit	1 minutes à 65 °C, 2 minutes à 95 °C
Insolation	10 secondes avec l'aligneur Karlsüss MJB3 UV3, $\lambda = 360$ nm
Deuxième recuit	2 minutes à 65 °C, 7 minutes à 95 °C
Développement	25 secondes dans le développeur SU-8 developper (Microchem, MA)
Rinçage	Isopropanol, environ 4 minutes
Soudure	
Nettoyage des cales	Cales en plexiglas (14mm x 8mm x 3.4mm) fraisées à l'atelier Bain à ultrasons, 10 minutes, Decon 90 (Laboratories Limited) Rinçage à l'eau Séchage des cales sur lingette en papier
Collage des cales	Colle à deux composants : 1 dose du tube A et $\frac{1}{2}$ dose du tube B (colles Araldite, Vantico Ltd, Royaume-Uni).
Collage des connecteurs	Connecteurs (461-124 ROHS MEXICO)
Soudure	A une température de 200°C, soudure à basse température afin que les mesas en or n'aient pas le temps d'être absorbés par la soudure

3.2 Annexe 3.B. Protocole de fabrication du microsystème de deuxième génération

Nettoyage	
Substrat de base	D263 de diamètre 50 mm, épaisseur 550 μm
Ultrasons	140 % 10 min, acétone
Rinçage	Eau
Nettoyage Piranha	2/3 H_2SO_4 (95%) + 1/3 H_2O_2 (30 %) pendant 1h30
Rinçage	Eau puis isopropanol
Séchage	Azote
Lithographie optique	
Niveau 1	
Enduction	Tournette : Karlsüss technique RC Résine :AZnLOF 2070 Masque en chrome : niveau 1 «électrodes prototype II» Vitesse : 4000 rpm avec une accélération de 2000 rpm.s ⁻¹ , 30 secondes
Premier recuit	1 minute à 110 °C
Insolation	54 secondes avec l'aligneur Karlsüss MJB3 UV3, $\lambda = 310$ nm
Deuxième recuit	1 minute à 110 °C
Développement	1 minute 30 secondes dans le développeur LDD26 W
Rinçage	Eau, environ 30 secondes
Séchage	Azote
Métallisation	
IBE	Nettoyage plasma de la surface de l'échantillon
Dépôt	10 nm de couche d'accroche en titane et 70 nm de platine
Lift-off	Bain d'acétone pendant 1 heure Nettoyage à l'acétone puis à l'isopropanol Séchage à l'azote
Lithographie optique	
Niveau 2	
Enduction	Tournette : Karlsüss technique RC Résine :AZnLOF 2070 Masque en chrome : niveau 1 «mésas prototype II » Vitesse : 4000 rpm avec une accélération de 2000 rpm.s ⁻¹ , 30 secondes
Premier recuit	1 minute à 110 °C
Insolation	54 secondes avec l'aligneur Karlsüss MJB3 UV3, $\lambda = 310$ nm
Deuxième recuit	1 minute à 110 °C
Développement	1 minute 30 secondes dans le développeur LDD26 W
Rinçage	Eau, environ 30 secondes
Séchage	Azote
Métallisation	
IBE	Nettoyage plasma de la surface de l'échantillon
Dépôt	10 nm de couche d'accroche en titane et 150 nm d'or
Lift-off	Bain d'acétone pendant 1 heure Nettoyage à l'acétone puis à l'isopropanol Séchage à l'azote

Lithographie optique : moules PDMS	
Enduction	Tournette : RC-8 équipée système gyrset Substrat : wafer silicium 4 pouces type P Masque en chrome sur verre : «guides» Résine : SU-8 2050 Vitesse : 1600 rpm avec une accélération de 400 rpm.s ⁻¹ , 30 secondes
Premier recuit	2 minutes à 65 °C, 7 minutes à 95 °C
Insolation	40 secondes avec l'aligneur Karlüss MJB3 UV3, $\lambda = 360$ nm
Deuxième recuit	2 minutes à 65 °C, 7 minutes à 95 °C
Développement	7 minutes dans le développeur SU-8 developer
Rinçage	Isopropanol, environ 4 minutes
Obtention des timbres en PDMS	
Fabrication du PDMS liquide	Mélange 10 :1 de monomère (GE Bayer Silicones, Allemagne) et de réticulant (GE Bayer Silicones, Allemagne) Mélangeuse : AR-250 Conditioning Mixer (Japon) Moulage Verser le PDMS liquide sur les motifs
Dégazage	Dessiccateur pendant 30 minutes
Recuit	Etuve à 60°C pendant une heure
Inversion des timbres en PDMS	
Nettoyage surface	Plasma Cleaner pendant 40 secondes sur la surface du timbre PDMS
Silanisation timbre PDMS	Dans une boîte fermée avec quelques gouttes de silane liquide Le timbre PDMS est posé sur un wafer de silicium afin d'assurer sa planarité
Préparation PDMS liquide	Mélange 10 :1 de monomère et de réticulant Mélangeuse
Moulage	Verser le PDMS liquide sur le timbre PDMS à inverser
Dégazage	Dessiccateur pendant 3 heures
Recuit	Etuve à 60°C pendant 1 heure

Obtention des motifs en NOA81	
cf. Fig.3.1	
Alignement	Aligneur Karlsüss MJB3 Substrat : timbre PDMS inversé reproduisant les motifs des piscines que l'on a dégazé pendant 1 à 2 h au préalable Masque : wafer de verre sur lequel on a déposé les électrodes (cf. Lithographie optique niveau 1)
«Enduction»	Dépôt de la NOA liquide sur les bords à l'interface timbre PDMS/substrat en verre du dispositif Répartition de la NOA liquide à travers la surface du timbre par capillarité
Réticulation	Sous UV pendant 50 secondes, puissance 100% (Lampe UV Hamamatsu, Japon)
Démoulage	
Traitement thermique de la NOA81	
Recuit	150°C pendant 3 heures
Soudure	
Nettoyage des cales	Cales en plexiglas (14mm x 8mm x 3.4mm) fraisées à l'atelier Bain à ultrasons pendant 10 minutes, Decon 90 Rinçage à l'eau Séchage des cales sur lingette en papier
Collage des cales	Colle à deux composants
Collage des connecteurs	Connecteurs
Soudure	A une température de 200°C, soudure à basse température afin que les mesas en or n'aient pas le temps d'être absorbés par la soudure

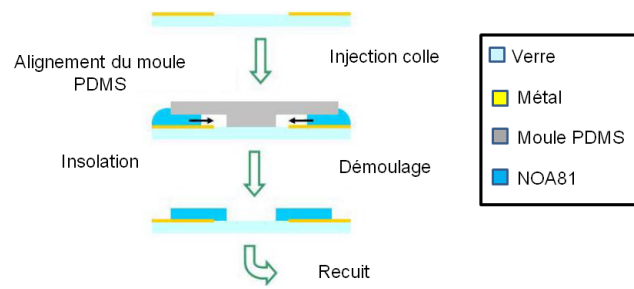


FIGURE 3.1 – Obtention de «micro-stickers» en NOA81.

Nettoyage	
Substrat de base	D263 de diamètre 50 mm, épaisseur 550 μm
Ultrasons	140 % 10 min, acétone
Rinçage	Eau
Nettoyage Piranha	2/3 H_2SO_4 (95%) + 1/3 H_2O_2 (30 %) pendant 1h30
Rinçage	Eau puis isopropanol
Séchage	Azote
Lithographie optique	
Niveau 1, électrodes	
Enduction	Tournette : Karlsüss technique RC Résine : AZnLOF 2070 Masque en chrome : niveau 1 «électrodes du microsystèmes de troisième génération» Vitesse : 4000 rpm avec une accélération de 2000 rpm.s ⁻¹ , 30 secondes
Premier recuit	1 minute à 110 °C
Insolation	54 secondes avec l'aligneur Karlsüss MJB3 UV3, $\lambda = 310$ nm
Deuxième recuit	1 minute à 110 °C
Développement	1 minute 30 secondes dans le développeur LDD26 W (Rohr and Haas Electronic Materials, Coventry, Royaume-Uni)
Rinçage	Eau, environ 30 secondes
Séchage	Azote
Métallisation	
IBE	Nettoyage plasma de la surface de l'échantillon
Dépôt	10 nm de couche d'accroche en titane, 70 nm de platine, 10 nm de couche d'accroche en titane et 200 nm de d'or
Lift-off	Bain d'acétone pendant 1 heure Nettoyage à l'acétone puis à l'isopropanol Séchage à l'azote
Rinçage	Eau, pendant environ 30 secondes
Séchage	Azote

3.3 Annexe 3.C. Protocole de fabrication du microsysteme de troisième génération

Lithographie optique	
Niveau 2, tunnels	
Enduction	Tournette : RC-8 équipée système gyrset Substrat : wafer silicium 4 pouces type P Masque en chrome sur verre : «guides» Résine : SU-8 2050 Vitesse : 1500 à 2500 rpm avec une accélération de 400 rpm.s ⁻¹ , 30 secondes
Premier recuit	2 minutes à 65 °C, 7 minutes à 95 °C
Insolation	20 à 30 secondes avec l'aligneur Karlsüss MJB3 UV3, $\lambda = 360$ nm
Deuxième recuit	2 minutes à 65 °C, 7 minutes à 95 °C
Développement	7 minutes dans le développeur SU-8 developer
Rinçage	Isopropanol, environ 4 à 6 minutes
Hydrophilisation de la couche de SU-8	
Traitement Plasma	Plasma d'azote P = 300 mT pendant 50 secondes (Plasma Cleaner, Harrick)
Fermeture des tunnels	
Découpage du parafilm	Parafilm «M» (Pechiney)
Alignement	Sous loupe binoculaire la couche «couverture» de parafilm est déposée sur le wafer sur lequel repose la couche de SU-8 formant les tunnels
Collage thermique	Sur une plaque de recuit à 65°C pendant 2 minutes 30 secondes
Soudure	
Préparation des connecteurs	Soudure des connecteurs Bananes 2 mm (RadioSpare) à leurs fils de cuivre respectifs
Soudure	A une température de 200°C, soudure à basse température afin que la couche d'or n'aient pas le temps d'être absorbés par la soudure

Bibliographie

- [1] F. J. Bruggeman, H. V. Westerhoff, The nature of systems biology, *Trends Microbiol.*, **2007**, *15*, 45–50.
- [2] P. V. Coveney, P. W. Fowler, Modelling biological complexity : a physical scientist’s perspective, *J. R. Soc. Interface*, **2005** *2*, 267–280.
- [3] G. F. R. Ellis, Physics, complexity and causality, *Nature*, **2005**, *435*, 743.
- [4] A. Lesne, Multi-scale approaches, *Encyclopedia of Mathematical Physics*, **2006**, *3*, 465–482.
- [5] L. Von Bertalanffy, General system theory : foundations, development, applications, *New York : George Braziller Inc.*, **1968**.
- [6] J. Von Neumann, Theory of self-reproducing automata, *Urbana and London : University of Illinois Press*, **1966**.
- [7] H. Poincaré, OEuvres, *Paris : Gauthier-Villars*, **1913-1965**, *11*.
- [8] S. Kauffman, Origins of order : self-organization and selection in evolution, *Oxford : Oxford University Press*, **1993**.
- [9] A. Lesne, Robustness : confronting lessons from physics and biology, *Biological Rev.*, **2008**, *83*, 509–532.
- [10] J. Demongeot, A. Elena, *et al.*, Robustness in neural and genetic networks, *Acta. Biotheor.*, **2008**, *56*, 27–49.
- [11] O. Cinquin, J. Demongeot, Positive and negative feedback : striking a balance between necessary antagonists, *J. Theor. Biol.*, **2002**, *216*, 229–41.
- [12] Z. Gaviola, Ein Fluorometer, Apparat zur Messung von Fluoreszenzabklingungszeiten, *Zeitschrift für Physik*, **1926**, *42*, 853–861.
- [13] P. Herman, H.J. Lin, *et al.*, Lifetime-Based Imaging, *Biomedical Photonics Handbook*, *CRC Press LLC*, **2003**.
- [14] K. Suhling, P. French, *et al.*, Time-resolved fluorescence microscopy, *Photochem. and Photobiol. Sci.*, **2005**, *4*, 13–22.
- [15] V. Barzda, C. de Grauw, *et al.*, Fluorescence lifetime heterogeneity in aggregates of LHCII revealed by time-resolved microscopy, *Biophys. J.*, **2001**, *81*, 538–546.

- [16] M. Böhmer, F. Pampaloni, *et al.*, Time-resolved confocal scanning device for ultrasensitive fluorescence detection, *Review of Scientific Instruments*, **2001**, *72*, 4145–4152.
- [17] A. Lemarchand, H. Berthoumieux, *et al.*, Chemical mechanism identification from frequency response to small temperature modulation, *J. Phys. Chem A*, **2012**, *116*, 8455–8463.
- [18] N. Bohr, The quantum postulate and the recent development of atomic theory, *Nature*, **1928**, *121*, 580–590, reproduit par J. A. Wheeler, W. H. Zurek, Quantum theory and measurement, *Princeton University Press*, **1983**.
- [19] G. Gamow, The principle of uncertainty, *Scientific American*, **1958**, *198*, 51–57.
- [20] M. Eigen, L. DeMaeyer, Relaxation methods, **1963**, dans Techniques of organic chemistry – investigation of rates and mechanism of reactions, part II, *8*, 895–1029, Wiley Interscience, New-York.
- [21] B. Nölting, Protein folding kinetics, *Springer : Berlin (2nd ed.)*, **2006**.
- [22] C. M. Dobson, A. Sali, *et al.*, Protein folding : a perspective from theory and experiment, *Angew. Chem.Int. Ed.*, **1998**, *37*, 869–875.
- [23] D. Baurecht, I. Porth, *et al.*, A new method of phase sensitive detection in modulation spectroscopy applied to temperature induced folding and unfolding of RNase A, *Vibr. Spectrosc.*, **2002**, *30*, 85–92.
- [24] L. M. Gloss, Equilibrium and kinetic approaches for studying oligomeric protein folding, *Methods Enzymol.*, **2009**, *466*, 325–357.
- [25] A. Weissberger, Investigation of Rates and Mechanisms of Reactions, *Wiley : New York Part II, (2nd ed.)*, **1963**.
- [26] H. Strehlow, W. Koche, Fundamentals of Chemical Relaxation, *Verlag Chemie : Weinheim*, **1977**.
- [27] M. Guo, Y. Xu, *et al.*, Temperature dependence of protein folding kinetics in living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, *109*, 17863–17867.
- [28] R. S. Phillips, E. W. Miles, *et al.*, Pressure and temperature jump relaxation kinetics of the conformational change in Salmonella typhimurium tryptophan synthase L-serine complex : large activation compressibility and heat capacity changes demonstrate the contribution of solvation, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 13580–13588.
- [29] R. Callender, R. B. Dyer, Time-resolved approaches to characterize the dynamical nature of enzyme catalysis, *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 3031–3042.
- [30] I. Schoen, H. Krammer, *et al.*, Hybridization kinetics is different inside cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, *106*, 21649–21654.

- [31] T. Sanden, G. Persson, *et al.*, Monitoring Kinetics of Highly Environment Sensitive States of Fluorescent Molecules by Modulated Excitation and Time-Averaged Fluorescence Intensity Recording, *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, 3330–3341.
- [32] M. Forster, K. Loth, *et al.*, Kinetic study of the photooxidation of pyrocatechol by modulated electronic excitation IR and ESR spectroscopy (MEIR and MESR), *Chem. Phys.*, **1976**, *17*, 59–80.
- [33] D. Braun, A. Libchaber, Lock-In by molecular multiplication, *Appl. Phys. Lett.*, **2003**, *83*, 5554–5556.
- [34] M. S. Halfon, H. Kose, *et al.*, Targeted gene expression without a tissue specific promoter : creating mosaic embryos using laser-induced single-cell heat shock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 6255–6260.
- [35] E. Jen, Robust design : a repertoire of biological, ecological and engineering case studies, *Oxford University Press*, Santa fe Institute Studies in Sciences of Complexity.
- [36] C. Auffray, L. Nottale, Scale relativity theory and integrative systems biology : founding principles and scale laws, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **2008**, *97*, 79–114.
- [37] C. Auffray, I. M. Adcock, *et al.*, Understanding pulmonary diseases to an integrative systems biology approach, *Chest*, **2010**, *137*, 1410–1416.
- [38] L. Jullien, A. Lemarchand, *et al.*, Diffusion of reactive species tuned by modulated external field : application to high performance chromatography, *J. Chem. Phys.*, **2000**, *112*, 8293–8301.
- [39] H. Berthoumieux, L. Jullien, *et al.*, Temporal modulation of a spatially periodic potential for kinetically governed oriented motion, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, *111*, 2045–2051.
- [40] H. Berthoumieux, L. Jullien, *et al.*, Response to a temperature modulation as a signature of chemical mechanisms, *Phys. Rev. E*, **2009**, *76*, 056112–056119.
- [41] K. Zrelli, T. Barilero, *et al.*, Temperature modulation and quadrature detection for selective titration of two-state exchanging reactants, *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, 2476–2484.
- [42] J. R. Lakowicz, H. Szmajnski, *et al.*, Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, *89*, 1271–1275.
- [43] T. W. J. Gadella Jr, T. M. Jovin, *et al.*, Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) Spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale, *Biophys. Chem.*, **1993**, *48*, 221–239.

- [44] G. Velte-Casquillas, C. Fu, *et al.*, Fast microfluidic temperature control for high resolution live cell imaging, *LabChip*, **2010**, *11*, 484–489.
- [45] N. L. Jeon, H. Baskaran, *et al.*, Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device, *Nat. Biotechnol.*, **2002**, *20*, 6826–6830.
- [46] S. K. W. Dertinger, D. T. Chiu, *et al.*, Generation of Gradients Having Complex Shapes Using Microfluidic Networks, *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 1240–1246.
- [47] C. J. Wang, X. Li, *et al.*, A microfluidics-based turning assay reveals complex growth cone responses to integrated gradients of substrate-bound ECM molecules and diffusible guidance cues, *LabChip*, **2008**, *8*, 227–237.
- [48] S. Paliwal, P. A. Iglesias, *et al.*, MAPK-mediated bimodal gene expression and adaptive gradient sensing in yeast, *Nature*, **2007**, *446*, 46–51.
- [49] T. B. Jones, Electromechanics of particles, Cambridge University Press, **1995**.
- [50] G. Lippmann, Relation entre les phénomènes électriques et capillaires, *Ann. Chim. Phys.*, **1875**, *5*, 494–549.
- [51] C. Y. Lee, C. C. Yu, *et al.*, Acelectro-osmosis mixing induced by non-contact external electrodes, *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, *22*, 563–567.
- [52] T. H. Wang, P. Wong, *et al.*, Electrokinetic bioprocessor for concentrating cells and molecules, *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 6908–6913.
- [53] T. Jackson, M. Uppalapati, *et al.*, Microtubule alignment and manipulation using ac electrokinetics, *Small*, **2008**, *4*, 1371–1381.
- [54] U. Zimmermann, Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena, *Biochim. Biophys. Acta*, **1982**, *694*, 227–277.
- [55] S. Nowotschin, A. K. Hadjantonakis, Photomodulatable fluorescent proteins for imaging cell dynamics and cell fate, *Organogenesis*, **2009**, *5*, 217–226.
- [56] Y. Mei, F. Zhang, Molecular Tools and Approaches for Optogenetics, *Biol. Psychiatry*, **2012**, *71*, 1033–1038.
- [57] S. Nowotschin, A. K. Hadjantonakis, Use of KikGR a photoconvertible green-to-red fluorescent protein for cell labeling and lineage analysis in ES cells and mouse embryos, *BMC Dev. Biol.*, **2009**, *9*, 49–61.
- [58] L. E. Barrett, J. Y. Sul, *et al.*, Region directed phototransfection reveals the functional significance of a dendritically synthesized transcription factor, *Nat. Methods*, **2006**, *3*, 455–460.

- [59] U. K. Tirlapur, K. Konig, Targeted transfection by femtosecond laser, *Nature*, **2002**, *418*, 290–301.
- [60] E. M. Callaway, R. Yuste, Stimulating neurons with light, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **2002**, *12*, 587–592.
- [61] W. Denk, Two-photon scanning photochemical microscopy : mapping ligand-gated ion channel distributions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 6629–6633.
- [62] A. Vaziri, V. Emiliani, Reshaping the optical dimension in optogenetics, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **2012**, *22*, 128–137.
- [63] K. Truong, M. Ikura, The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes *in vivo*, *Curr Opin Struct Biol*, **2001**, *11*, 573–578.
- [64] M. Hetzer, O. J. Gruss, *et al.*, The Ran GTPase as a marker of chromosome position in spindle formation and nuclear envelope assembly, *Nat. Cell. Biol.*, **2002**, *4*, E177–E184.
- [65] N. Vartak, P. Bastiaens, Spatial cycles in G-protein crowd control, *EMBO J.*, **2010**, *29*, 2689–2699.
- [66] R. J. Mannix, S. Kumar, *et al.*, Nanomagnetic actuation of receptor-mediated signal transduction, *Nature Nanotech.*, **2008**, *3*, 36–40.
- [67] Y. W. Jun, J. W. Seo, *et al.*, Nanoscaling laws of magnetic nanoparticles and their applicabilities in biomedical sciences, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 179–189.
- [68] N. Desprat, W. Supatto, *et al.*, Tissue Deformation Modulates Twist Expression to Determine Anterior Midgut Differentiation in Drosophila Embryos *Dev. Cell.*, **2008**, *15*, 470–477.
- [69] G. F. Weber, M. A. Bjerke, *et al.*, Mechanoresponsive Cadherin-Keratin Complex Directs Polarized Protrusive Behavior and Collective Cell Migration, *Dev. Cell.*, **2012**, *22*, 104–115.
- [70] M. H. Cho, E. J. Lee, *et al.*, A magnetic switch for the control of cell death signalling in *in vitro* and *in vivo* systems, *Nature Mater.*, **2012**, *11*, 1038–1043.
- [71] M. B. Steketee, S. N. Moysidis, *et al.*, Microtubule assembly : Switched on with magnets, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **2011**, *108*, 19042–19047.
- [72] H. Huang, S. Delikanli, *et al.*, Remote-controlled genes trigger insulin production, *Nature Nanotech.*, **2010**, *5*, 602–606.
- [73] N. Wang, J. P. Butler, *et al.*, Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton, *Science*, **1993**, *260*, 1124–1127.

- [74] S. Hughes, S. McBain, *et al.*, Selective activation of mechanosensitive ion channels using magnetic particles, *J. R. Soc. Interface*, **2008**, 5, 855–863.
- [75] C. Hoffmann, E. Mazari, *et al.*, Spatiotemporal control of microtubule nucleation and assembly using magnetic nanoparticles, *Nature Nanotech.*, **2013**, 8, 199–205.
- [76] A. G. Hendricks, E. L. Holzbaur *et al.*, Force measurements on cargoes in living cells reveal collective dynamics of microtubule motors, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **2012**, 109, 18447–18452.
- [77] E. Hannak, R. Heald, Investigating mitotic spindle assembly and function in vitro using *Xenopus laevis* egg extracts, *Nature Protoc.*, **2012**, 1, 2305–2314.
- [78] Capteur de pression sanguine jetable par la société Foxboro/ICT (Honeywell) prix :\$40.
- [79] R. P. Feynmann, There's plenty of room at the bottom, *Journal MEMS*, **1992**, 1, transcription de l'allocution donnée par Richard Feynmann à la réunion annuelle de l'American Physical Society à 26 Décembre 1959.
- [80] G. M. Whitesides, The origins and the future of microfluidics, *Nature*, **2006**, 442, 368–373.
- [81] A. Manz, N. Graber, *et al.*, Miniaturized total chemical-analysis systems - a novel concept for chemical sensing, *Sens. Actu. B Chem.*, **1990**, 1, 244–248.
- [82] H. Andersson, A. van den Berg, Microfluidic devices for cellomics : a review, *Sens. Actu. B Chem.*, **2003**, 92, 315–325.
- [83] T. Fink, M. Azioune, *et al.*, Comparative study and improvement of current of current cell micro-patterning, *Lab Chip*, 2007, 7, 672–680.
- [84] O. Cugat, Micro-actionneurs électromagnétiques MAGMAS, *Hermès Science*, **2002**.
- [85] P. Tabeling, Introduction à la microfluidique, *Belin*, **2003**.
- [86] D. Bartolo, G. Degre, *et al.*, Microfluidic stickers, *Lab Chip*, **2008**, 8, 274–279.
- [87] E. Karsenti, Self-organization in cell biology : a brief history, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2008**, 9, 255–262.
- [88] N. B. Kholodenko, J. F. Hancock, W. Kolch, Signalling ballet in space and time, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2010**, 11, 414–424.
- [89] A. Desai, T. J. Mitchison, Microtubule polymerization dynamics, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **1997**, 13, 83–117.
- [90] I. Arnal, I. Sassoon, *et al.*, Dynamique du fuseau : vers une cible anticancéreuse, *Med. Sci.*, **2002**, 18, 1227–1235.

- [91] H. P. Sablin, Kinesins and microtubules : their structures and motor mechanisms, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **2000**, *12*, 35–41.
- [92] M. Mitchison, M. Kirschner, Dynamic instability of microtubule growth, *Nature*, **1984**, *312*, 237–242.
- [93] L. D. Belmont, A. A. Hyman, *et al.*, Realtime visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts, *Cell*, **1990**, *62*, 579–589.
- [94] F. Verde, M. Dogterom, *et al.*, Control of microtubule dynamics and length by cyclin A- and cyclin B dependent kinases in *Xenopus* egg extracts, *J. Cell. Biol.*, **1992**, *118*, 1097–1108.
- [95] M. Kirschner, T. Mitchison, Beyond self-assembly : from microtubules to morphogenesis, *Cell*, **1986**, *45*, 329–342.
- [96] T. J. Mitchison, Microtubule dynamics and kinetochore function in mitosis, *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **1988**, *4*, 27–49.
- [97] K. E. Sawin, T. J. Mitchison, Mitotic spindle assembly by two different pathways *in vitro*, *J. Cell. Biol.*, **1991**, *11*, 925–940.
- [98] P. Bastiaens, M. Caudron, *et al.*, Gradients in the selforganization of the mitotic spindle, *Trends Cell Biol.*, **2006**, *16*, 125–134.
- [99] T. Wittmann, M. Wilm, *et al.*, TPX2, A novel *xenopus* MAP involved in spindle pole organization, *J Cell Biol.*, **2000**, *149*, 1405–1418.
- [100] O. J. Gruss, I. Vernos, The mechanism of spindle assembly : functions of Ran and its target TPX2, *J Cell Biol.*, **2004**, *166*, 949–955.
- [101] E. Karsenti, Mitotic spindle morphogenesis in animal cells, *Semin. Cell. Biol.*, **1991**, *2*, 251–260.
- [102] J. C. Waters, E. Salmon, *et al.*, Pathways of spindle assembly, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **1997**, *9*, 37–43.
- [103] S. S. Andersen, Balanced regulation of microtubule dynamics during the cell cycle : a contemporary view, *Bioessays*, **1999**, *21*, 53–60.
- [104] A. A. Hyman, E. Karsenti, Motors involved in spindle assembly and chromosome segregation, *Cell*, **1996**, *84*, 401–410.
- [105] M. Dogterom, M. A. Félix, *et al.*, Influence of M-Phase chromatin on the anisotropy of microtubule asters, *J. Cell. Biol.*, **1996**, *133*, 125–140.
- [106] A. Khodjakov, R. W. Cole, *et al.*, Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates, *Curr. Biol.*, **2000**, *10*, 59–67.
- [107] E. H. Hinchcliffe, F. J. Miller, *et al.*, Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase, *Science*, **2001**, *291*, 1547–1550.

- [108] R. Heald, R. Tournebize, *el al.*, Self-organization of microtubules into bipolar spindles, *Nature*, **1996**, *382*, 420–425.
- [109] M. V. Nachury, T. J. Maresca, *el al.*, Importin β is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly, *Cell*, **2001**, *104*, 95–106.
- [110] C. E. Walczak, I. Vernos, *el al.*, A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity, *Curr. Biol.*, **1998**, *8*, 903–913.
- [111] T. Wittmann, A. A. Hyman, *el al.*, The spindle : a dynamic assembly of microtubules and motors, *Nat. Cell. Biol.*, **2001**, *3*, E28–34.
- [112] T. Hunt, Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase, *Curr. OpinCell. Biol.*, **1989**, *1*, 268–274.
- [113] M. Doree, Control of M-phase by maturation-promoting factor, *Curr. OpinCell. Biol.*, **1990**, *2*, 269–273.
- [114] M. J. Lokha, J. L. Maller, Induction of nuclear envelope breakdown, chromosome condensation, and spindle formation in cell-free extracts, *J. Cell. Biol.*, **1985**, *101*, 518–523.
- [115] A. W. Murray, Cell cycle extracts, *Methods Cell. Biol.*, **1991**, *36*, 581–605.
- [116] A. Desai, A. Murray, *el al.*, The use of *Xenopus* egg extracts to study mitotic spindle assembly and function in vitro, *Methods Cell. Biol.*, **1999**, *61*, 385–412.
- [117] E. Karsenti, J. Newport, *el al.*, Interconversion of metaphase and interphase microtubule arrays, as studied by the injection of centrosomes and nuclei into *Xenopus* eggs, *J. Cell. Biol.*, **1984**, *98*, 1730–1745.
- [118] Y. Takai, T. Sasaki, *el al.*, Small GTP-binding proteins, *Physiol. Rev.*, **2001**, *81*, 153–208.
- [119] I. W. Mattaj, L. Englmeier, Nucleocytoplasmic transport : the soluble phase, *Annu. Rev. Biochem.*, **1998**, *67*, 265–306.
- [120] D. Görlich, U. Kutay, Transport between the cell nucleus and the cytoplasm, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **1999**, *15*, 607–660.
- [121] M. Kunzler, E. Hurt, Targeting of Ran : variation on a common theme ?, *J. Cell. Sci.*, **2001**, *114*, 3233–3241.
- [122] R. E. Carazo-Salas, G. Guarguaglini, *el al.*, Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation, *Nature*, **1999**, *400*, 178–181.
- [123] T. Ohba, T., M. Nakamura, *el al.*, Self-organization of microtubule asters induced in *Xenopus* egg extracts by GTP-bound Ran, *Science*, **1999**, *284*, 1356–1358.

- [124] P. Kalab, T. Pu, *et al.*, The Ran GTPase regulates mitotic spindle assembly, *Curr. Biol.*, **1999**, *9*, 1481–484.
- [125] A. Wilde, Y. Zheng, Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran, *Science*, **1999**, *284*, 1359–1362.
- [126] O. J. Gruss, R. E. Carazo-Salas, *et al.*, Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity, *Cell*, **2001**, *104*, 83–93.
- [127] A. Wilde, S. B. Lizarraga, *et al.*, Ran stimulates spindle assembly by altering microtubule dynamics and the balance of motor activities, *Nat. Cell. Biol.*, **2001**, *3*, 221–227.
- [128] R. E. Carazo-Salas, Ran ou le parfum de la chromatine, *Med. Sci.*, **2001**, *17*, 1056–1060.
- [129] P. Kalab, K. Weis, *et al.*, Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts, *Science*, **2002**, *295*, 2452–2456.
- [130] P. Niethammer, P. Bastiaens, *et al.*, Stathmin-tubulin interaction gradients in motile and mitotic cells, *Science*, **2004**, *303*, 1862–1866.
- [131] R.E. Carazo-Salas, E. Karsenti, Long-range communication between chromatin and microtubules in *Xenopus* egg extracts, *Curr. Biol.*, **2003**, *13*, 1728–1733.
- [132] D. Görlich, M. J. Seewald, *et al.*, Characterization of Ran-driven cargo transport and the RanGTPase system by kinetic measurements and computer simulation, *Embo J.*, **2003**, *22*, 1088–1100.
- [133] G. Riddick, I. G. Macara, A systems analysis of importin- α - β mediated nuclear protein import, *J. Cell. Biol.*, **2005**, *168*, 1027–1038.
- [134] M. Caudron, G. Bunt, *et al.*, Spatial coordination of spindle assembly by chromosome-mediated signaling gradients, *Science*, **2005**, *309*, 1373–1376.
- [135] Y. Rondelez, Competition for catalytic resources alters biological networks dynamics, *Phys. Rev. Lett.*, **2012**, *108*, 018102.
- [136] K. Totani, Y. Ihara, *et al.*, Effects of macromolecular crowding on glycoprotein processing, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 2101–2107.
- [137] A. Dhar, A. Samiotakis, *et al.*, Structure, function, and folding of phosphoglycerate kinase are strongly perturbed by macromolecular crowding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, *107*, 17586–17591.
- [138] A. Paradise, M. K. Levin, *et al.*, Significant proportions of nuclear transport proteins with reduced intracellular mobilities resolved by fluorescence correlation spectroscopy, *J. Mol. Biol.*, **2007**, *365*, 50–65.

- [139] B. Catimel, T. Teh, *el al.*, Biophysical characterization of interactions involving importin- β during nuclear import, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 34189–34198.
- [140] M. Rexach, G. Blobel, Protein import into nuclei : association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins, *Cell*, **1995**, *83*, 683–692.
- [141] J. Gaetz, Z. Gueroui, *el al.*, Examining how the spatial organization of chromatin signals influences metaphase spindle assembly, *Nature Cell Biol.*, **2006**, *8*, 924–932
- [142] T. D. Pollard, J. A. Cooper, Actin : a Central Player in Cell Shape and Movement, *Science*, **2009**, *326*, 1208–1212
- [143] M. Pinot, F. Chesnel, *el al.*, Effects of Confinement on the Self-Organization of Microtubules and Motors, *Curr. Biol.*, **2009**, *19*, 954–960.
- [144] R. K. Doot, H. Hess, *el al.*, Engineered networks of oriented microtubule filaments for directed cargo transport, *Soft Matter*, **2007**, *3*, 349–356.
- [145] B. H. Gibbons, I. R. Gibbons, Vanadate-sensitized cleavage of dynein heavy chains by 365-nm irradiation of demembranated sperm flagella and its effect on the flagellar motility, *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 8354–8359.
- [146] A. M. Jimenez, M. Roché, *el al.*, Towards high throughput production of artificial egg oocytes using microfluidics, *Lab Chip* **2011**, *11*, 429–434.
- [147] J. Wu, A. H. Corbett, and al., The intracellular mobility of nuclear import receptors and NLS cargoes ?, *Biophys. J.*, **2009**, *97*, 3840–3849.
- [148] A. Abu-Arish, P. Kalab, *el al.*, Spatial distribution and mobility of the Ran GTPase in live interphase cell, *Biophys. J.*, **2009**, *97*, 2164–2178.
- [149] T. W. Traut, The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites, *Mol. cell. Biochem.*, **1994**, *140*, 1–22.
- [150] R. J. Ellis, Macromolecular crowding : an important but neglected aspect of the intracellular environment, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2001**, *11*, 114–119.
- [151] M. J. Morelli, R. J. Allen, *el al.*, Effects of macromolecular crowding on genetic switches, *Biophys. J.*, **2011**, *101*, 2882–2891.
- [152] C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry, Part III*, Freeman, New York, 1980.
- [153] D. A. Beard, H. Qian, *Chemical Biophysics : Quantitative Analysis of Cellular Systems*, Cambridge University Press, Cambridge, 2008.
- [154] A. S. Verkman, *Trends Biochem. Sci.*, **2002**, *27*, 27–33.

- [155] H. Fischer, I. Polikarpov, *et al.*, Average protein density is a molecular-weight-dependent function, *Prot. Sci.*, **2004**, *13*, 2825–2828.
- [156] C. Klebe, H. Prinz, A. Wittinghofer, R. S. Goody, The kinetic mechanism of Ran–nucleotide exchange catalyzed by RCC1, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 12543–12552.
- [157] M. J. Seewald, A. Kraemer, *et al.*, Biochemical Characterization of the Ran-RanBP1-RanGAP System : Are RanBP Proteins and the Acidic Tail of RanGAP Required for the Ran-RanGAP GTPase Reaction ?, *Mol. Cell. Biol.*, **2003**, *23*, 8124–8136.
- [158] J. Kulhmann, I. Macara, *et al.*, Dynamic and equilibrium studies on the interaction of Ran with its effector, RanBP1, *Biochemistry* **1997**, *36*, 12027–12035.
- [159] F. R. Bischoff, D. Görlich, RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin beta-related nuclear transport factors, *FEBS Lett.*, **1997**, *419*, 249–254.
- [160] C. I. Villa Braslavsky, C. Nowak, *et al.*, Different structural and kinetic requirements for the interaction of Ran with the Ran-binding domains from RanBP2 and importin-beta ?, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 11629–11639.
- [161] P. Fanara, M. R. Hodel, *et al.*, Quantitative analysis of nuclear localization signal (NLS)-importin alpha interaction through fluorescence depolarization. Evidence for autoinhibitory regulation of NLS binding, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21218–21223.
- [162] J. Moroianu, G. Blobel, *et al.*, Nuclear protein import : Ran-GTP dissociates the karyopherin axf8, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, *93*, 7059–7062.
- [163] I. Palacios, K. Weis, *et al.*, RAN/TC4 mutants identify a common requirement for snRNP and protein import into the nucleus, *J. Cell Biol.* **1996**, *133*, 485–494.
- [164] F. R. Bischoff, H. Krebber, *et al.*, Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1, *EMBO J.* **1995**, *14*, 705–715.
- [165] K. Ribbeck, G. Lipowsky, *et al.*, NTF2 mediates nuclear import of Ran, *EMBO J.* **1998**, *17*, 6587–6598
- [166] D. Jiles, *Introduction to Magnetism and Magnetic Materials 2nd Ed.* , Chapman and Hall, London, **1998**.
- [167] D. J. Strauss, *Magnetic Drug Targeting in Cancer Therapy*, FEMLAB model gallery, **2004**.

- [168] B. B. Yellen, G. Fridman, *el al.*, Ferrofluid lithography, *Nanotechnology*, **2004**, *15*, S562-S565.
- [169] R. M. Erb, D. S. Sebba, *el al.*, Magnetic field induced concentration gradients in magnetic nanoparticle suspensions : Theory and experiment, *J. Appl. Phys.*, **2008**, *103*, 063916-063925.
- [170] L. J. Onsager, Electric moments of molecules in liquids, *J. Am. Chem. Soc.*, **1936**, *58*, 1486-1493.
- [171] W. F. Brown, *Phys. Rev.*, Thermal fluctuations of a single-domain particle, **1963**, *130*, 1677-1686.
- [172] W. R. Bowen, Y. Liang, *el al.*, Gradient diffusion coefficients-theory and experiment, *Chem. Eng. Sci.*, **2000**, *55*, 2359-2377.
- [173] R. Becker, *Electromagnetic Fields and Interactions*, Dover, New York, **1982**.
- [174] J. Lipfert, X. Hao, *el al.*, Quantitative Modelling and Optimization of Magnetic Tweezers, *BioPhys. J.*, **2009**, *96*, 5040-5049.
- [175] B. D. Matthews, D. A. LaVan, *el al.*, Electromagnetic needles with sub-micron pole tip radii for nanomanipulation of biomolecules and living cells, *Appl. Phys. Lett.*, **2004**, *85*, 2968-2970.
- [176] D. W. Inglis, R. Riehn, *el al.*, Continuous microfluidic immunomagnetic cell separation, *Appl. Phys. Lett.*, **2004**, *85*, 5093-5095.
- [177] .M. Oldenburg, S.E. Borglin, *el al.*, Experimental studies of the flow of ferrofluid in porous media, *Trans. P. Med.*, **2000**, *38*, 319-344.
- [178] R. Wirix-Speetjens, W. Fyen, *el al.*, A force study of onchip magnetic particle transport based on tapered conductors, *IEEE. Trans. Magn.*, **2001**, *41*, 4128-4133.
- [179] V. Schaller, U. Kraling, *el al.*, Motion of nanometer sized magnetic particles in a magnetic field gradient, *J. Appl. Phys.*, **2008**, *104*, 093918-1-093918-14.
- [180] K. Vann Ommering, J. H. Nieuwenhuis, *el al.*, *Appl. Phys. Lett.*, **2006**, *89*, 142511-142517.
- [181] K. I. Morozov, M. I. Shliomis, *Magnetic Fluid as an Assembly of Flexible Chains*, in *Ferrofluids : Magnetically Controllable Fluids and Their Applications*, S. Odenbach, Berlin, **2002**.
- [182] M. A. M Gijs, F. Lacharme, *el al.*, Microfluidic Applications of Magnetic Particles for Biological Analysis and Catalysis, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 1518-1563.
- [183] N. Pamme, Magnetism and microfluidics, *Lab. Chip.*, **2006**, *6*, 24-8.

- [184] M. Zborowski, L. Sun, *el al.*, Continuous cell separation using novel magnetic quadrupole flow sorter, *J. Magn. Magn. Mat.*, **1999**, *194*, 224–230.
- [185] D. W. Inglis, R. Riehn, *el al.*, Microfluidic high gradient magnetic cell separation *J. Appl. Phys.*, **2006**, *99*, 08K101–08K106.
- [186] J. C. Giddings, *Unified separation science*, John Wiley and Sons Inc, New-York, **1991**.
- [187] J. Berthier, J. Pham, *el al.*, Numerical modeling of superparamagnetic sub-micronic particles trajectories under the coupled action of 3D force fields, *EPJ-APPL. PH.*, **2001**, 211–216.
- [188] A. H. Latham, R. S. Freitas, *el al.*, Capillary magnetic field flow fractionation and analysis of magnetic nanoparticles, *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, 5055–5062.
- [189] J. Bibette, Monodisperse ferrofluid emulsions, *J. Magn. Magn. Mat.* , **1993**, *122*, 37–41.
- [190] F. Montagne, O. Mondain-Monval, *el al.*, Preparation and characterization of narrow sized (o/w) magnetic emulsion, *J. Magn. Magn. Mat.*, **2002**, *250*, 302–312.
- [191] A. Koenig, *Etude de la dynamique d'un polymère semiflexible à l'aide de colloïdes magnétiques. Exemple de l'ADN*, Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, **2004**.
- [192] L. Cohen-Tannoudji, *Cinétique de réactions ligand-recepteur en surface - étude fondée sur l'utilisation de colloïdes magnétiques*, Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, **2006**.
- [193] A. L. Gassner, M. Abonnenc, *el al.*, Magnetic forces produced by rectangular permanent magnets in static microsystems, *Lab. Chip.*, **2009**, *16*, 2356–2363.
- [194] C. B. Murray, D. J. Norris, *el al.*, Liquid phase synthesis of CdSe quantum dots, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 8706–8715.
- [195] X. G. Peng, M. C. Schlamp, *el al.*, Epitaxial growth of highly luminescent CdSe/CdS core/shell nanocrystals with photostability and electronic accessibility, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 7019–7029.
- [196] L. Néel, Théorie du traînage magnétique des ferromagnétiques en grains fins avec applications aux terres cuites, *Ann. Géophys.*, **1949**, *5*, 99–136.
- [197] F. Boulmedais, P. Bauchat, *el al.*, Water-soluble pegylated quantum dots : from a composite hexagonal phase to isolated micelles, *Langmuir*, **2006**, *22*, 9797–9803.

- [198] S. C. McBain, U Griesenbach, *el al.*, Magnetic nanoparticles as gene delivery agents : enhanced transfection in the presence of oscillating magnet arrays, *Nanotechnology*, **2008**, *40*, 405102–405108.
- [199] A. E. Saliba, N. Minc, *el al.*, Magnetic beads self-organization on ni pattern : Application to long DNA electrophoresis, *LA HOUILLE BLANCHE*, **2007**, *6*, 34–39.
- [200] J. Dobson, Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles, *Nature Nanotech.*, **2008**, *3*, 139–143.
- [201] D. Axelrod, D. E. Koppel, *el al.*, Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics, *Biophys. J.*, **1976**, *16*, 1055–1069.
- [202] J. Davoust, P. F. Devaux, and L. Leger Fringe pattern photobleaching, a new method for the measurement of transport coefficients of biological macromolecules, *EMBO. J.*, **1982**, *1*, 1233–1238.
- [203] E. Mirowski, J. Moreland, *el al.*, Integrated microfluidic isolation platform for magnetic particle manipulation in biological systems, *Appl. Phys. Lett.*, **2004**, *84*, 1786–1789.
- [204] M. T. Valentine, Z. E. Perlman, *el al.*, Mechanical Properties of Xenopus Egg Cytoplasmic Extracts, *Biophys. J.*, **2005**, *88*, 680–689.
- [205] R. E. Carazo-Salas, O. J. Gruss, *el al.*, Ran-GTP coordinates regulation of microtubule nucleation and dynamics during mitotic-spindle assembly, *Nat. Cell. Biol.*, **2001**, *3*, 228–234.
- [206] C. E. Walczak, R. Heald, Mechanisms of mitotic spindle assembly and function, *Int. Rev. Cytol.*, **2008**, *255*, 111–158.
- [207] T. J. Maresca, A. C. Groen, *et al.*, Spindle assembly in the absence of a RanGTP gradient requires localized CPC activity, *Curr. Biol.*, **2009**, *19*, 1210–1215.
- [208] G. Goshima, M. Mayer, *et al.*, Augmin : a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle, *J. Cell. Biol.*, **2008**, *181*, 421–429.
- [209] G. Goshima, A. Kimura, New look inside the spindle : microtubule-dependent microtubule generation within the spindle, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **2010**, *22*, 44–49.
- [210] M. E. Janson, T. G. Setty, *et al.*, Efficient formation of bipolar microtubule bundles requires microtubule-bound gamma-tubulin complexes, *J. Cell. Biol.*, **2005**, *169*, 297–308.
- [211] M. Pinot, V. Steiner, *el al.*, Confinement induces actin flow in a meiotic cytoplasm, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **2012**, *109*, 11705–11710.

- [212] T. Wittmann, M. Wilm, *et al.*, A novel *Xenopus* MAP involved in spindle pole organization, *J Cell Biol*, **2001**, *149*, 1405–1418.
- [213] J. Rossant, P. P. Tam, Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse, *Development*, **2009**, *136*, 701–713.
- [214] L. Strizzi, K. M. Hardy, *et al.*, Nodal expression and detection in cancer : experiences and challenges, *Cancer. Res.*, **2012**, *8*, 1915–1920.
- [215] L. Strizzi, K. M. Hardy, *et al.*, Development and cancer : at the crossroads of Nodal and Notch signaling, *Cancer. Res.*, **2009**, *18*, 7131–7134.
- [216] B. T. Vo, S. A. Khan, *et al.*, Expression of Nodal and nodal receptors in prostate stem cells and prostate cancer cells : autocrine effects on cell proliferation and migration, *Prostate*, **2011**, *10*, 1084–1096.
- [217] S. J. Arnold, E. J. Robertson, Making a commitment : cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2009**, *10*, 91–103.
- [218] K. Takaoka, H. Hamada, Cell fate decisions and axis determination in the early mouse embryo, *Development*, **2012**, *139*, 3–14.
- [219] A. Camus, A. Perea-Gomez, *et al.*, Absence of Nodal signaling promotes precocious neural differentiation in the mouse embryo, *Dev. Biol.*, **2006**, *295*, 743–755.
- [220] C. Kimura-Yoshida, H. Nakano, *et al.*, Canonical Wnt signaling and its antagonist regulate anterior-posterior axis polarization by guiding cell migration in mouse visceral endoderm, *Dev. Cell*, **2005**, *9*, 639–650.
- [221] I. Migeotte, T. Omelchenko, *et al.*, Rac1-dependent collective cell migration is required for specification of the anterior-posterior body axis of the mouse, *PLoS Biol.*, **2010**, *8*, e1000442.
- [222] A. Perea-Gomez, F. D. Vella, *et al.*, Nodal antagonists in the anterior visceral endoderm prevent the formation of multiple primitive streaks, *Dev. Cell*, **2002**, *3*, 745–756.
- [223] A. S. Rakeman, K. V. Anderson, Axis specification and morphogenesis in the mouse embryo require Nap1, a regulator of WAVE-mediated actin branching, *Development*, **2006**, *133*, 3075–3083.
- [224] P. Rorth, Collective guidance of collective cell migration, *Trends Cell Biol.*, **2007**, *17*, 575–579.
- [225] M. M. Shen, Nodal signaling : developmental roles and regulation, *Development*, **2007**, *134*, 1023–1034.

- [226] K. Takaoka, M. Yamamoto M, *et al.*, Origin and role of distal visceral endoderm, a group of cells that determines anterior-posterior polarity of the mouse embryo, *Nat. Cell. Biol.*, **2011**, *13*, 743–752.
- [227] A. K. Tarkowski, Mouse chimaeras developed from fused eggs, *Nature*, 1961, *190*, 857–860.
- [228] B. Mintz, Formation of genetically mosaic mouse embryos and early development of «lethal (T12/T12)-normal» mosaics, *J. Exp. Zool.*, 1964, *157*, 273–292.
- [229] M. Parameswaran, P. P. Tam, Regionalisation of cell fate and morphogenetic movement of the mesoderm during mouse gastrulation, *Dev. Genet.*, **1995**, *17*, 16–28.
- [230] K. A. Lawson, R. A. Pedersen, Cell fate, morphogenetic movement and population kinetics of embryonic endoderm at the time of germ layer formation in the mouse, *Development*, **1987**, *101*, 627–652.
- [231] K. A. Lawson, J. J. Meneses, *et al.*, Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo, *Development*, **1991**, *113*, 891–911.
- [232] J. A Rivera-Pérez, J. Mager, *et al.*, Dynamic morphogenetic events characterize the mouse visceral endoderm, *Developmental Biology*, **2003**, *261*, 470–487.
- [233] S. Srinivas, T. Rodriguez, *et al.*, Active cell migration drives the unilateral movements of the anterior visceral endoderm, *Development*, **2004**, *131*, 1157–1164.
- [234] J. Collignon, I. Varlet, *et al.*, Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning, *Nature*, **1996**, *381*, 155–158.
- [235] P. C. Orban, D. Chui, *et al.*, Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, *89*, 6861–6865.
- [236] D. Metzger, P. Chambon, Site- and time-specific gene targeting in the mouse, *Methods*, **2001**, *24*, 71–80.
- [237] R. Kuhn, F. Schwenk, *et al.*, Inducible gene targeting in mice, *Science*, **1995**, *269*, 1427–1429.
- [238] E. Coucouvanis, G. R. Martin, Signal for death and survival : a two-steps mechanism for cavitation in the vertebrate embryo, *Cell*, **2005**, *83*, 279–287.
- [239] R. S. Beddington, E.J. Robertson, Axis development and early asymmetry in mammals, **1999**, *Cell*, **95**, 195–209.

- [240] P. Q. Thomas, A. Brown, *et al.*, Hex : a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors, *Development*, **1998**, *125*, 85–94.
- [241] V. Franklin, P. L. Khoo, *et al.*, Regionalisation of the endoderm progenitors and morphogenesis of the gut portals of the mouse embryo, *Mech. Dev.*, **2008**, *125*, 587–600.
- [242] S. L. Griswold, K. C. Sajja, *et al.*, Generation and characterization of iUBC-KikGR photoconvertible transgenic mice for live time-lapse imaging during development, *Genesis*, **2011**, *49*, 591–598.
- [243] M. Yamamoto, Y. Saijoh, *et al.*, Nodal antagonists regulate formation of the anteroposterior axis of the mouse embryo, *Nature*, **2004**, *428*, 387–392.
- [244] N. Eynard, S. Sixou, *et al.*, Fast kinetics studies of Escherichia coli electrotransformation, *Eur. J. Biochem.*, **1992**, *209*, 431–436.
- [245] H. Wolf, M. P. Rols, *et al.*, Control by impulsion parameters of electric field mediated gene transfer in mammalian cells, *Biophys. J.*, **1994**, *66*, 524–531.
- [246] M. Golzio, M.P. Rols, *et al.*, *In vitro* and *in vivo* electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression, *Methods*, **2004**, *33*, 126–135.
- [247] J. M. Escoffre, T. Portet, *et al.*, Electromediated formation of DNA complexes with cell membranes and its consequences for gene delivery, *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, *1808*, 1538–1543.
- [248] M. Golzio, J. Teissié, *et al.*, Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 1292–1297.
- [249] C. Faurie, M. Rebersek, *et al.*, Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation, *J. Gene Med.*, **2010**, *12*, 117–125.
- [250] M. Golzio, J. Teissié, *et al.*, Control by membrane order of voltage-induced permeabilization, loading and gene transfer in mammalian cells, *Bioelectrochemistry*, **2001**, *53*, 25–34.
- [251] G. L. Lukacs, P. Haggie, *et al.*, Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus, *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 1625–1629.
- [252] E. E. Vaughan, D. A. Dean, Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules, *Mol. Ther.*, **2006**, *13*, 422–428.
- [253] E. E. Vaughan, R. C. Geiger, *et al.*, Microtubule acetylation through HDAC6 inhibition results in increased transfection efficiency, *Mol. Ther.*, **2008**, *16*, 1841–1847.

- [254] J. E. Hagstrom, J. J. Ludtke, *et al.*, Nuclear import of DNA in digitonin-permeabilized cells, *J. Cell. Sci.*, **1997**, *110*, 2323–2331.
- [255] J. J. Ludtke, G. Zhang, *et al.*, A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA, *J. Cell. Sci.*, **1999**, *112*, 2033–2041.
- [256] H. G. Coster, A quantitative analysis of the voltage current relationships of fixed charge membranes and the associated property of "punch-through", *Biophys. J.*, **1965**, *5*, 669–686.
- [257] J. M. Crowley, Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability, *Biophys. J.*, **1973**, *13*, 711–724.
- [258] E. Neumann, K. Rosenheck, Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes, *J. Membr. Biol.*, **1972**, *10*, 279–290.
- [259] K. Jr. Kinoshita, T. Y. Tsong, Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane, *Nature*, **1977**, *268*, 438–441.
- [260] K. Jr. Kinoshita, T. Y. Tsong, Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1977**, *471*, 227–242.
- [261] K. Jr. Kinoshita, T. T. Tsong, Hemolysis of human erythrocytes by transient electric field, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, *74*, 1923–1927.
- [262] A. J. Sale, W. A. Hamilton, Effects of high electric fields on microorganisms 3. Lysis of erythrocytes and protoplasts, *Biochim Biophys Acta*, **1968**, *163*, 37–43.
- [263] U. Zimmermann, G. Pilwat, *et al.*, Dielectric breakdown of cell membranes, *Biophys. J.*, **1974**, *14*, 881–899.
- [264] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, *et al.*, Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields, *Embo J.*, **1982**, *1*, 841–845.
- [265] A. E. Sowers, M. R. Lieber, Electropore diameters, lifetimes, numbers, and locations in individual erythrocyte ghosts, *FEBS Lett.*, **1986**, *205*, 179–184.
- [266] S. Y. Ho, G. S. Mittal, Electroporation of Cell Membranes : A Review, *Critical Reviews in Biotechnology*, **1996**, *16*, 349–362.
- [267] D. P. Tieleman. The molecular basis of electroporation, *BMC Biochem.*, 2004, *5*, 10–21.
- [268] D. C. Chang, T. S. Reese, Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy, *Biophys. J.*, **1990**, *58*, 1–12.
- [269] T. K. Wong, E. Neumann, Electric field mediated gene transfer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1982**, *107*, 584–587.

- [270] M. P. Rols, J. Teissié, Experimental evidence for the involvement of the cytoskeleton in mammalian cell electroporation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, *1111*, 45–50.
- [271] J. Teissié, T. Y. Tsong, Electric field induced transient pores in phospholipid bilayer vesicles, *Biochemistry*, **1981**, *20*, 1548–1554.
- [272] T. Portet, Électroporabilité de Systèmes Modèles, Thèse de doctorat de l'université Toulouse III, 2011.
- [273] A. Lopez, M. P. Rols, *et al.*, Phosphorus-31 NMR analysis of membrane phospholipid organization in viable, reversibly electroporated Chinese hamster ovary cells, *Biochemistry*, **1988**, *27*, 1222–1228.
- [274] L. M. Mir, M. F. Bureau, *et al.*, High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 4262–4267.
- [275] C. Bloquel, E. Fabre, *et al.*, Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression : new methodological developments and applications, *J. Gene Med.*, **2004**, *6*, S11–S23.
- [276] L. M. Mir, S. Orlowski, *et al.*, Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses, *European journal of cancer*, **1991**, *27*, 68–72.
- [277] L. M. Mir, Application of Electroporation Gene Therapy : Past, Current, and Future, *Methods in Molecular Biology*, **2008**, *423*, 3–17.
- [278] N. Itasaki, S. Bel-Vialar, *et al.*, Shocking developments in chick embryology : electroporation and in ovo gene expression, *Nat. Cell. Biol.*, **1999**, *1*, E203–E207.
- [279] T. Ogura, *In vivo* electroporation : a new frontier for gene delivery and embryology, *Differentiation*, **2002**, *70*, 163–171.
- [280] M. Swartz, J. Eberhart, *et al.*, Sparking new frontiers : using *in vivo* electroporation for genetic manipulations, *Developmental Biology*, **2001**, *233*, 13–21.
- [281] T. J. Van Raay, R. T. Lassiter, *et al.*, Electroporation strategies for genetic manipulation and cell labeling, *Methods in Molecular Biology*, **2008**, *438*, 305–317.
- [282] G. A. Cerda, J. E. Thomas, *et al.*, Electroporation of DNA, RNA, and morpholinos into zebrafish embryos, *Methods*, **2006**, *39*, 207–211.
- [283] C. Teh, S. W. Chon, *et al.*, DNA delivery into anterior neural tube of zebrafish embryos by electroporation, *Biotechniques*, **2003**, *35*, 950–954.

- [284] T. Inoue, T. Tanaka, *et al.*, Role of cadherins in maintaining the compartment boundary between the cortex and striatum during development, *Development*, **2001**, *128*, 561–569.
- [285] M. L. Soares, M. E. Torres-Padilla, M. Zernicka-Goetz, Bone morphogenetic protein 4 signaling regulates development of the anterior visceral endoderm in the mouse embryo, *Dev. Growth. Differ.*, **2008**, *50*, 615–621.
- [286] G. Mellitzer, M. Hallonet, *et al.*, Spatial and temporal «knock down» of gene expression by electroporation of double-stranded RNA and morpholinos into early postimplantation mouse embryos, *Mech. Dev.*, **2002**, *118*, 57–63.
- [287] H. Nakamura, T. Katahira, *et al.*, Gain- and loss-of-function in chick embryos by electroporation, *Mech. Dev.*, **2004**, *121*, 1137–1143.
- [288] C. D. Stern, The chick ; a great model system becomes even greater, *Dev. Cell.*, **2005**, *8*, 9–17.
- [289] T. Muramatsu, Y. Mizutani, *et al.*, Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, *230*, 376–380.
- [290] C. Chesnutt, L. Niswander, Plasmid-based short-hairpin RNA interference in the chicken embryo, *Genesis*, **2004**, *39*, 73–78.
- [291] R. M. Das, N. J. Van Hateren, *et al.*, A robust system for RNA interference in the chicken using a modified microRNA operon, *Dev. Biol.*, **2006**, *294*, 554–563.
- [292] T. Katahira, H. Nakamura, Gene silencing in chick embryos with a vector-based small interfering RNA system, *Dev. Growth Differ.*, **2003**, *45*, 361–367.
- [293] K. Haas, K. Jensen, *et al.*, Targeted electroporation in *Xenopus* tadpoles *in vivo*—from single cells to the entire brain, *Differentiation*, **2002**, *70*, 148–154.
- [294] K. S. Huang , Y. C. Lin, *et al.*, Electroporation microchip system for the transfection of zebrafish embryos using quantum dots and GFP genes for evaluation, *Biomed Microdevices*, **2007**, *9*, 761–768.
- [295] B. P. Davidson, T. E. Tsang, *et al.*, Introduction of cell markers into germ layer tissues of the mouse gastrula by whole embryo electroporation, *Genesis*, **2003**, *35*, 57–62.
- [296] P. P. Tam, Postimplantation mouse development : whole embryo culture and micro-manipulation, *Int. J. Dev. Biol.*, **1998**, *42*, 895–902.
- [297] M. Takahashi, T. Nomura, *et al.*, Transferring genes into cultured mammalian embryos by electroporation, *Dev. Growth Differ.*, **2008**, *50*, 485–497.

- [298] P. L. Khoo, V. J. Franklin, *et al.*, Fate-mapping technique : Targeted whole-embryo electroporation of DNA constructs into the germ layers of mouse embryos 7-7.5 days post-coitum, *CSH Protocols*, **2007**, doi :10.1101/pdb.prot4893.
- [299] J. M. Escoffre, T. Portet, *et al.*, What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissue, *Mol. Biotechnol.*, **2009**, *41*, 286–295.
- [300] C. Chen, S. W. Smye, *et al.*, Membrane electroporation theories : a review. *Med. Biol. Eng. Comput.*, **2006**, *44*, 5–14.
- [301] A. A. Gurtovenko, I. Vattulainen, Molecular mechanism for lipid flip-flops, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, *111*, 13554–13559.
- [302] C. W. M. Haest, D. Kamp, *et al.*, Transbilayer reorientation of phospholipid probes in the human erythrocyte membrane. Lessons from studies on electroporated and resealed cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, *1325*, 17–33.
- [303] D. P. Tieleman, H. Leontiadou, *et al.*, Simulation of pore formation in lipid bilayers by mechanical stress and electric fields, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 6382–6383.
- [304] R. A. Böckmann, B. L. de Groot, *et al.*, Kinetics, statistics, and energetics of lipid membrane electroporation studied by molecular dynamics simulations, *Biophys. J.*, **2008**, *95*, 1837–1850.
- [305] M. Tarek, Membrane electroporation : a molecular dynamics simulation, *Biophys. J.*, **2005**, *88*, 4055–4053.
- [306] U. Pliquett, R. P. Joshi, *et al.*, High electrical field effects on cell membranes, *Bioelectrochemistry*, **2006**, *70*, 275–282.
- [307] B. Henslee, A. Morss, *et al.*, Electroporation dependence on cell size : optical tweezers study, *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, 3998–4003.
- [308] B. Gabriel, J. Teissié, Control by electrical parameters of short- and long-term cell death resulting from electroporation of Chinese hamster ovary cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, *1266*, 171–178.
- [309] B. Rubinsky, Irreversible electroporation in medicine, *Technol. Cancer. Res. Treat.*, **2007**, *6*, 255–260.
- [310] B. Al-Sakere, F. André, *et al.*, Tumor ablation with irreversible electroporation, *PLoS One*, **2007**, *2*, e1135.
- [311] F. Loste, N. Eynard, *et al.*, Direct monitoring of the field strength during electropulsation, *Bioelectrochem Bioenerg.*, **1998**, *47*, 119–127.
- [312] T. R. Gowrishankar, J. C. Weaver, An approach to electrical modeling of single and multiple cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 3203–3208.

- [313] T. Kotnik, D. Miklavcic, Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells, *Biophys. J.*, **2000**, *79*, 670–679.
- [314] J. Teissié, M. P. Rols, An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation, *Biophys. J.*, **1993**, *65*, 409–413.
- [315] J. Teissié, M. Golzio, *et al.*, Mechanisms of cell membrane electroporation : a minireview of our present (lack of?) knowledge, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2005**, *1724*, 270–280.
- [316] M. P. Rols, Electroporation, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2006**, *1758*, 423–428.
- [317] P. P. Tam, P. L. Khoo, *et al.*, Regionalization of cell fates and cell movement in the endoderm of the mouse gastrula and the impact of loss of Lhx1(Lim1) function, *Dev. Biol.*, **2004**, *274*, 171–187.
- [318] P. P. Tam, P. L. Khoo, *et al.*, Sequential allocation and global pattern of movement of the definitive endoderm in the mouse embryo during gastrulation, *Development*, **2007**, *134*, 251–260.
- [319] S. I. Sukharev, V. A. Klenchin, *et al.*, Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells, *Biophys. J.*, **1992**, *63*, 1320–1327.
- [320] B. Gabriel, J. Teissié, Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electroporated cell membrane, *Biophys. J.*, **1997**, *73*, 2630–2637.
- [321] M. Golzio, J. Teissié, *et al.*, Cell synchronization effect on mammalian cell permeabilization and gene delivery by electric field, *Biochim Biophys Acta*, **2002**, *1563*, 23–28.
- [322] <http://www.wikilectures.eu/index.php/RestingMembranePotential>
- [323] E. Neumann, A. E. Sowers, *et al.*, Electroporation and electrofusion in cell biology, *Plenum*, New York, **1989**.
- [324] N. Eynard, M. P. Rols, *et al.*, Electrotransformation pathways of procaryotic and eucaryotic cells : recent developments, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1997**, *44*, 103–110.
- [325] H. Lu, *et al.*, SU8-Based micro neural probe for enhanced chronic in-vivo recording of spike signals from regenerated axons, in *5th IEEE Sensors Conference*, **2006**, IEEE : Daegu, South Korea.
- [326] G. Voskericiana, M. S. Shive, *et al.*, Biocompatibility and biofouling of MEMS drug delivery devices, *Biomaterials*, **2003**, *24*, 1959–1967.

- [327] Geoffrey Kotzara, M. Freas, *et al.*, Evaluation of MEMS materials of construction for implantable medical devices, *Biomaterials*, **2002**, *23*, 2737–2750.
- [328] D. Bartolo, M. Morel, *et al.*, Microfluidic stickers for cell and tissue-based assays in microchannels, *Lab Chip*, **2009**, *9*, 1011–1013.
- [329] Patrick Abgrall, K. Chuda, *et al.*, A novel fabrication method of flexible and monolithic 3D microfluidic structures using lamination of SU-8 films, *J. Micromech. Microeng.*, **2006**, *16*, 113–121.
- [330] D. Hegemann, H. Brunner, *et al.*, Plasma treatment of polymers for surface and adhesion improvement, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B*, **2003**, *208*, 281–286.
- [331] S. Satkavkas, M. F. Bureau, *et al.*, Slow accumulation of plasmid in muscle cells : supporting evidence for a mechanism of DNA uptake by receptor-mediated endocytosis, *Mol. Ther.*, **2001**, *4*, 317–323.
- [332] C. Rosazza, E. Phez, *et al.*, Cholesterol implications in plasmid DNA electrotransfer : evidence for the involvement of endocytotic pathways, *Int. J. Pharmaceut.*, **2012**, *423*, 134–143.
- [333] C. Rosazza, J.M. Escoffre, *et al.*, The actin cytoskeleton has an active role in the electrotransfer of plasmid DNA in mammalian cells, *Mol. Ther.*, **2011**, *5*, 913–921.
- [334] A. Paganin-Gioanni, E. Bellard, Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, *108*, 10443–10447.
- [335] M. P. Rols, D. Coulet, *et al.*, Highly efficient transfection of mammalian cells by electric field impulses. Application to large volumes of cell culture by using a flow system, *Eur. J. Biochem.*, **1992**, *206*, 115–121.
- [336] T. Kotnik, G. Pucihar, *et al.*, Role of pulse shape in cell membrane electroporation, *Biochim. Biophys. Acta*, **2003**, *1614*, 193–200.
- [337] M. P. Rols, J. Teissie, Modulation of electrically induced permeabilization and fusion of Chinese hamster ovary cells by osmotic pressure, *Biochemistry*, **1990**, *29*, 4561–4567.
- [338] M. F. Bureau, J. Gehl, *et al.*, Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer, *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, *1474*, 353–359.
- [339] F. Andre, J. Gehl, *et al.*, Efficiency of high and low voltage impulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor and skin, *Hum Gene Ther* **2008**.

- [340] E. P. Boukany, A. Morss, *et al.*, Nanochannel electroporation delivers precise amounts of biomolecules into living cells, *Nature Nanotech.*, **2011**, *6*, 747–754.
- [341] I. Varlet, J. Collignon, *et al.*, Nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation, *Development*, **1997**, *124*, 1033–1044.
- [342] J. Brennan, D. P. Norris, *et al.*, Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo, *Nature*, **2001**, *411*, 965–969.
- [343] F. L. Conlon, K. M. Lyons, *et al.*, A primary requirement for Nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse, *Development*, **1994**, *7*, 1919–1928.
- [344] H. Adachi, Y. Saijoh, *et al.*, Determination of left/right asymmetric expression of nodal by a left side-specific enhancer with sequence similarity to a lefty-2 enhancer, *Genes Dev.*, **1999**, *13*, 1589–1600.
- [345] D. P. Norris, E. J. Robertson, Asymmetric and node-specific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements, *Genes Dev.*, **1999**, *13*, 1575–1588.
- [346] U. Friedrich, N. Stachowicz, *et al.*, High efficiency electrotransfection with aluminum electrodes using microsecond controlled pulses, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1998**, *47*, 103–111.
- [347] U. Zimmermann, J. Vienken, Electric field-induced cell-to-cell fusion, *J. Membr. Biol.*, **1982**, *67*, 165–182.
- [348] K. Jr. Kinoshita, M. Hibino, *et al.*, Events of membrane electroporation visualized on a time scale from microsecond to seconds, *In Guide to Electroporation and Electrofusion*, D.C. Chang, B. M. Chassy, J. A. Saunders, A. E. Sowers, *Academic Press Inc.*, (New York), **1992**, 29–46.
- [349] M. P. Rols, M. Golzio, *et al.*, *In vitro* delivery of drugs and others molecules to cells, *In Jaroszeski, M. J. Heller, R. Gilbert, R. editors*, Electrochemotherapy, electrogenetherapy and transdermal drug delivery : electrically mediated delivery of molecules to cells, *Orlowski S : Humana press*, **2000**, 83–98.
- [350] M. P. Rols, J. Teissié, Electroporabilization of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon, *Biophys. J.*, **1990**, *58*, 1089–98.
- [351] M. P. Rols, J. Teissié, Modulation of electrically induced permeabilization and fusion of Chinese hamster ovary cells by osmotic pressure, *Biochemistry*, **1990**, *29*, 4561–4567.
- [352] J. C. Weaver, Electroporation : a general phenomenon for manipulating cells and tissues, *J. Cell. Biochem.*, **1993**, *51*, 426–435.

- [353] E. Mazari, Développement de protocoles d'électroporation localisée chez l'embryon de souris, Rapport de stage de M2R, **2009**.
- [354] S. Orlowski, L. M. Mir, Cell electroporabilization : a new tool for biochemical and pharmacological studies, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1993**, *1154*, 51–63.
- [355] R. Benz, U. Zimmermann, The resealing process of lipid bilayers after reversible electrical breakdown, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1981**, *640*, 169–78.
- [356] M. L. Escande-Geraud, M. P. Rols, *et al.*, Reversible plasma membrane ultrastructural changes correlated with electroporabilization in Chinese hamster ovary cells, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1988**, *939*, 247–259.
- [357] M. S. Bier, S. M. Hammer, *et al.*, Kinetics of sealing for transient electropores in isolated mammalian skeletal muscle cells, *Bioelectromagnetics*, **1999**, *20*, 194–201.
- [358] J. Gehl, T. Skovsgaard , *et al.*, Vascular reactions to *in vivo* electroporation : characterization and consequences for drug and gene delivery, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2002**, *1569*, 51–58.
- [359] M. P. Rols, C. Delteil, *et al.*, Control by ATP and ADP of voltage-induced mammalian-cell-membrane permeabilization, gene transfer and resulting expression, *Eur. J. Biochem.*, **1998**, *254*, 382–388.
- [360] J. Gehl, T. H. Sorensen, *et al.*, *In vivo* electroporation of skeletal muscle : threshold, efficacy and relation to electric field distribution, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1999**, *1428*, 233–240.
- [361] R. V. Davalos, I. L. Mir, *et al.*, Tissue ablation with irreversible electroporation, *Ann. Biomed. Eng.*, **2005**, *33*, 223–231.
- [362] G. Trichas, B. Joyce, *et al.*, Nodal dependent differential localisation of dishevelled-2 demarcates regions of differing cell behaviour in the visceral endoderm, *PLoS Biol.*, **2011**, *9*, e1001019.
- [363] G. Trichas, A. M. Smith, *et al.*, Multi-cellular rosettes in the mouse visceral endoderm facilitate the ordered migration of anterior visceral endoderm cells, *Plos Biol.*, **2012**, *10*, e1001256.
- [364] Y. I. Wu, D. Frey, *et al.*, A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells, *Nature*, **2009**, *461*, 104–108.