



HAL
open science

Contrôle spatial et temporel des systèmes biologiques in vitro

Théo Cambier

► **To cite this version:**

Théo Cambier. Contrôle spatial et temporel des systèmes biologiques in vitro. Autre [cond-mat.other]. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENY078 . tel-01159476

HAL Id: tel-01159476

<https://theses.hal.science/tel-01159476>

Submitted on 3 Jun 2015

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique pour les sciences du vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Théo CAMBIER

Thèse dirigée par **Laurent BLANCHOIN** et **Manuel THERY**

préparée au sein du **Cytomorpholab**

dans l'**École Doctorale de Physique**

Contrôle spatial et temporel des systèmes biologiques *in vitro*.

Thèse soutenue publiquement le « **16 octobre 2014** »,
devant le jury composé de :

Mr Vincent STUDER

Chargé de Recherche chez CNRS, Institut Interdisciplinaire de
Neuroscience, Bordeaux. (Rapporteur)

Mr Vincent SENEZ

Directeur Scientifique IEMN-CNRS et Professeur à l'Institut Supérieur de
l'Electronique et du Numérique, Lille. (Rapporteur)

Mr Young CHEN

Directeur de Recherche première classe, Département Chimie de l'École
Normale Supérieure, Paris. (Membre)

Mr Manuel THERY

Directeur de Recherche chez CEA, Unité de Thérapie Cellulaire de l'Hôpital
Saint-Louis, Paris. (Membre)

Mr Laurent BLANCHOIN

Directeur de Recherche chez CEA, Laboratoire de physiologie Cellulaire et
Végétale, Grenoble. (Membre)

Mr Johann Collot

Professeur de physique à l'université Grenoble Alpes. Membre de la
collaboration ATLAS au CERN. Directeur de l'école doctorale de physique de
Grenoble. (Président)



Remerciements

Ma gratitude va d'abord au laboratoire de physiologie cellulaire et végétale et au laboratoire des technologies de la micro-électronique du CEA Grenoble, sans lesquels ce travail n'aurait pu voir le jour.

Je remercie chaleureusement mes directeurs de thèse : Mr *Laurent Blanchoin* qui m'a transmis sa rigueur dès le début de mes travaux et qui m'a incité à me surpasser, je mesure la patience dont il a fait preuve ; tout comme Mr *Manuel Thery* à qui j'exprime toute ma reconnaissance pour le soutien qu'il m'a apporté et pour toutes les suggestions et les remarques qui ont toujours stimulé ma réflexion. Leur aide complémentaire m'a été indispensable.

Je veux aussi exprimer ma reconnaissance et dire tout mon respect pour Mr *Johann Collot*, directeur de l'Ecole Doctorale de physique de Grenoble. Qu'il soit remercié pour l'intérêt qu'il a accordé à mes travaux et pour sa bienveillance toute professionnelle.

J'ai également lieu de saluer *Christophe Guerin, Jérémie Gaillard, Fabrice Senger, Laetitia Kurzawa* et *Rajaa Boujema-Paterski*. Je les remercie pour leur aide précieuse au quotidien et leurs conseils avisés.

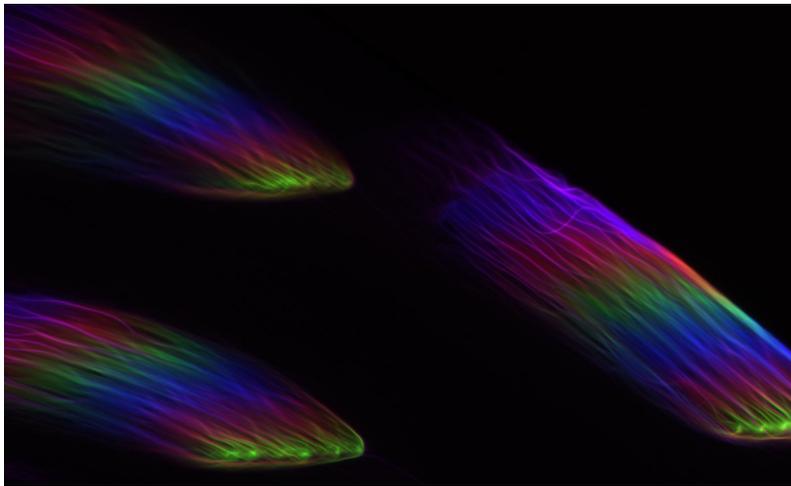
Je remercie *Francesca Farina, James Sillibourne* et *Aldo Leal*, post-doctorants au Cytomorpholab avec qui j'ai pris grand plaisir à travailler.

Bien sûr, je remercie mes camarades anciens étudiants, *Anne-cécile Reymann, Cristian Suarez, Didier Portran, Timothée Vignaud*, et mes camarades encore étudiants, *Gaëlle Letort, Laurène Gressin, Hajer Hennomani, Mithila Burute, Laura Schaedel* et *Aleksandra Icheva* avec qui j'ai vécu cette aventure.

Je remercie mes proches : ma mère, Pascal, ma soeur Gentiane, Thibaud, mon oncle Christophe, et mes amis : Tao, Benjamin, Adrien, Flora, Boris, Alexis, Nicolas, Lionel, Mathieu. Chacune de ces personnes, à sa manière, m'a permis de bénéficier d'un encouragement et d'un soutien sans faille.

Je remercie Mr *Daniel Heimendinger* qui a été un repère salutaire dans mon parcours.

Et enfin, je dédie ce travail à mon père, qui aurait sans doute été heureux d'en voir l'aboutissement.



" Pas d'idées justes, juste des idées. "

Gilles Deleuze.

Avant-propos

Le travail présenté dans cette thèse est davantage un travail de développement technologique ouvrant des perspectives nouvelles pour l'étude des systèmes biologiques *in vitro* qu'un travail de biologie cellulaire pure. Néanmoins, les techniques mises au point permettent de mettre en évidence toute la clarté de certains mécanismes biologiques, accélérant considérablement la compréhension de l'expérimentateur qui les observe. Les micro-technologies pour la biologie sont pensées pour être biomimétiques. C'est-à-dire qu'elles cherchent à reproduire les mécanismes sous-jacents à la bio-complexité en termes de robustesse, d'efficacité énergétique et d'auto-organisation. Dans cet état d'esprit, j'ai travaillé à reproduire l'organisation spatiale et la régulation temporelle des systèmes biomoléculaires allant du filament d'actine individuel à la cellule entière en utilisant les outils de la micro-structuration de surface et de la microfluidique. En 1994, le micro-patterning de surface est utilisé pour contrôler l'adhésion des cellules *in vitro* [150]. En 1999, la comète d'actine de *Lysteria Monocytogenese* est reconstituée *in vitro* à partir de la surface d'une bille en polystyrène [101]. En 2010, nous associons ces deux techniques pour contrôler la géométrie de nucléation des filaments du cytosquelette d'actine, ce qui aboutit à la reconstitution, entre lame et lamelle, d'architectures d'actine comme le lamellipode, jouant un rôle majeur dans la motilité cellulaire, les fibres de stress qui assurent l'intégrité mécanique de la cellule, l'anneau de cytokinèse responsable de la séparation du cytoplasme pendant la division cellulaire (Section 2.1). Dans le but de reproduire la dynamique avec laquelle ces architectures évoluent *in vivo*, nous associons l'expérience entre lame et lamelle avec un système microfluidique capable de contrôler la composition du micro-environnement biochimique sans perturber les structures d'actine. Ce couplage, qui vise à contrôler spatialement et temporellement les systèmes moléculaires du cytosquelette d'actine, permet de leur poser des questions fonctionnelles dans des conditions physiologiques (Section 2.2). Finalement, ce même système microfluidique s'est aussi avéré adaptable pour la culture des cellules non-adhérentes. Bien que l'étude des cellules *in vitro* ne rentre pas dans le cadre de la démarche bottom-up posée dans l'introduction de cette thèse, la composition biochimique contrôlable dans le temps par le circuit microfluidique constitue un environnement biomimétique favorable pour explorer le comportement des cellules souches hématopoïétiques pour lesquelles les moyens d'observation manquent encore aujourd'hui (Section 2.3). Pour terminer cette thèse, j'expose dans les perspectives les projets réalisables dans un futur proche qui me tiennent à coeur et qui permettront de répondre à des questions biologiques d'actualité (Section 3).

Table des matières

1	Introduction	12
1.1	Pourquoi et comment étudier les systèmes biomoléculaires <i>in vitro</i>	12
1.1.1	Problématique	12
1.1.2	Positionnement	16
1.2	Le système biomoléculaire étudié : le cytosquelette d'actine . .	18
1.2.1	Fonctionnement <i>in vivo</i>	18
1.2.2	Reconstitution <i>in vitro</i>	28
2	Résultats	38
2.1	Contrôle spatial de l'assemblage des systèmes d'actine reconstitués <i>in vitro</i>	38
2.1.1	Le micropatterning	38
2.1.2	Le contrôle géométrique de la nucléation de l'actine par la technique du "micropatterning WASP" : <i>Article 1</i> .	41
2.1.3	Le guidage géométrique des filaments d'actine par la technique du "multipatterning"	46
2.1.4	Le contrôle géométrique de la nucléation de l'actine par la technique du "micropatterning mDia"	48
2.1.5	La cohabitation du complexe Arp2/3 et des formines .	53
2.1.6	La reconstitution de l'anneau de cytokinèse par la technique du "micropatterning mDia"	55
2.1.7	conclusion	61
2.2	Contrôle temporel du micro-environnement biochimique des systèmes d'actine reconstitués <i>in vitro</i>	62
2.2.1	La microfluidique	62
2.2.2	Développement d'un système microfluidique à chambres sans flux	75
2.2.3	Contrôle de la cinétique de polymérisation du filament d'actine individuel	99

TABLE DES MATIÈRES

2.2.4	Contrôle de la cinétique d'assemblage des structures d'actine élémentaires	105
2.2.5	Contrôle temporel de la contraction de l'anneau de cytotocinèse	115
2.2.6	conclusion	116
2.3	Adaptation du circuit à chambres sans flux pour la culture des cellules non-adhérentes	117
2.3.1	Une puce à cellules : <i>Brevet</i>	117
2.3.2	Compatibilité de la puce pour la culture et l'observation des cellules	123
2.3.3	Utilisation de la puce pour contrôler les cellules souches hématopoïétiques humaines : <i>Article 2.</i>	131
2.4	Conclusion générale	132
2.5	Protocoles	133
3	perspectives	158
3.1	Mesure des forces contractiles de l'anneau de cytotocinèse	158
3.2	Architectures d'actine sous contrainte hydrodynamique	160
3.3	Commercialisation et utilisation de la puce à cellules	163
3.4	Puce à gradient de flux hydrodynamique pour les cellules adhérentes	165
4	Annexes : Publications et Brevet	188

Chapitre 1

Introduction

Chapitre 1

Introduction

1.1 Pourquoi et comment étudier les systèmes biomoléculaires *in vitro*

1.1.1 Problématique

Les systèmes biomoléculaires *in vivo*

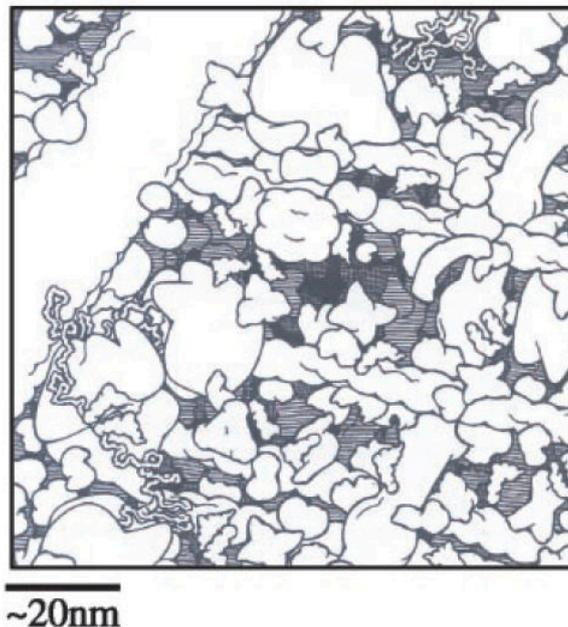


FIGURE 1.1 – Dessin du cytoplasme de *Saccharomyces*, incluant filaments du cytosquelette d'actine, ribosomes, ARNm et protéines solubles, créé en respectant les tailles et les concentrations relatives [52].

Un système moléculaire est un système biochimique autonome qui s'autopropage et s'autorégule et qui est fabriqué à partir d'un ensemble caractéristique et restreint de petites molécules à base de carbone qui sont essentiellement identiques quelque soit l'espèce vivante. Ces petites molécules s'assemblent en macromolécules sous forme de polymères d'acides aminés (protéines) ou de nucléotides (ADN). Les macromolécules s'assemblent à leur tour en structures plus complexes capables de s'adapter dans le temps et dans l'espace aux sollicitations de leur environnement biochimique. Voici quelques exemples de systèmes biochimiques intracellulaires chacun ayant un rôle spécifique dans la cellule : le système de remodelage de la chromatine qui organise la structure tridimensionnelle de l'ADN, le système de recueil de la lumière pour les cellules végétales, le complexe enzymatique respiratoire qui couple le transport des électrons au pompage de H^+ pour assurer le fonctionnement de l'ATP synthase, le système des canaux ioniques d'une synapse qui transmettent l'influx nerveux d'une cellule neuronale à l'autre, le centrosome qui est le centre primaire organisateur des microtubules, les complexes focaux d'adhésion cellulaire qui lient les cellules aux autres cellules et à la matrice extra-cellulaire et le cytosquelette d'actine qui organise la structure tridimensionnelle de la cellule et assure son intégrité mécanique.

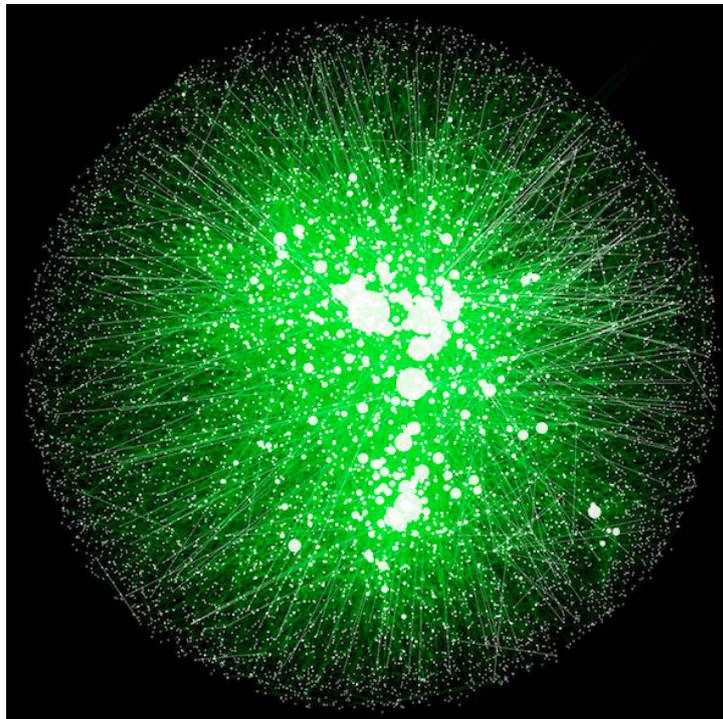


FIGURE 1.2 – Interactome humain. Chaque point blanc représente une protéine et chaque ligne verte représente une interaction entre deux protéines.

Chacun de ces systèmes moléculaires a une importance capitale dans le fonctionnement de la cellule et possède un haut degré d'organisation spatiale et temporelle. Pourtant, quand on regarde l'interactome humain (Figure 2), la première impression qu'il en ressort est un très haut degré de complexité dans l'organisation globale de la cellule. Bien que les systèmes moléculaires intracellulaires paraissent très structurés spatialement et finement régulés temporellement, ils sont intégrés, par un chemin ou par un autre, à la complexité du réseau d'interactions intracellulaires. Un système moléculaire n'est pas isolé du reste de la cellule, il fonctionne, selon des voies d'activation plus ou moins directes, avec l'ensemble des systèmes moléculaires qui constituent la cellule. Chaque système moléculaire intracellulaire peut remodeler son organisation spatiale et temporelle pour répondre aux sollicitations provenant de l'ensemble de la cellule.

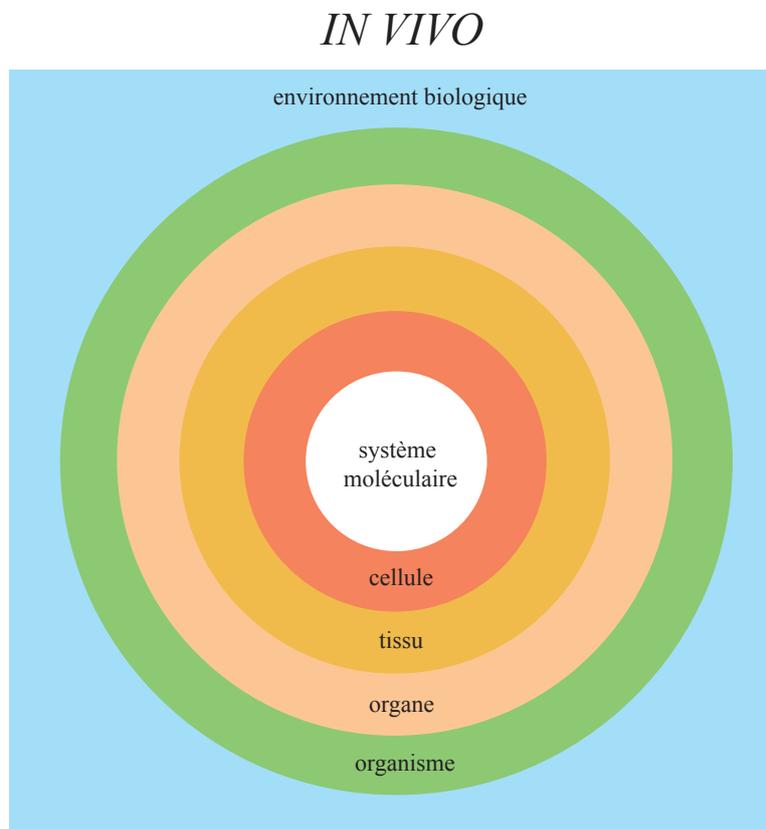


FIGURE 1.3 – Systèmes biomoléculaires *in vivo*.

Aussi, le degré de complexité du fonctionnement cellulaire ne s'arrête pas à la membrane plasmique (Figure 3). En effet, chaque cellule se situe dans ce qu'on appelle un contexte social, ou tissu, dans lequel les cellules communiquent entre elles par des signaux chimiques. les tissus forment à leur

tour des organes qui structurent l'organisme. Ainsi, les réactions de l'organisme aux contraintes physiques et chimiques de l'environnement biologique dans lequel il vit sont transmises de proche en proche jusqu'aux plus petits systèmes moléculaires et *vice versa*. La complexité intégrative du fonctionnement des systèmes moléculaires s'en trouve donc encore largement augmentée. Lorsqu'on fait une étude *in vivo* et qu'on veut connaître, par exemple, l'effet d'une protéine sur le fonctionnement d'un système moléculaire, il y a en général deux solutions : soit bloquer l'activité de cette protéine, soit la sur-exprimer. Mais dans les deux cas, la complexité des interactions *in vivo* est si importante qu'il est difficile de discerner, dans la réponse du système moléculaire, les effets provenant de la protéine modifiée des effets provenant de l'ensemble des interactions environnementales dans lequel le système moléculaire est intégré.

L'étude des systèmes biomoléculaires *in vitro*

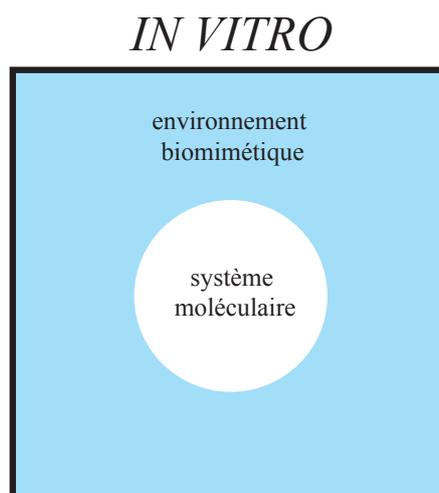


FIGURE 1.4 – Systèmes biomoléculaires *in vitro* .

Travailler *in vitro* permet d'isoler un système moléculaire de son contexte *in vivo* et donc de s'abstenir de cette complexité. *In vitro*, on reconstitue l'environnement biologique du système moléculaire étudié de façon simplifiée en le plaçant dans les conditions physico-chimiques nécessaires et suffisantes à son fonctionnement, on parlera alors d'environnement biomimétique. L'environnement biomimétique est facilement contrôlable et quantifiable par l'expérimentateur. Il est en effet possible de reproduire un environnement biologique *in vitro* à l'identique d'une expérience à l'autre et cette reproductibilité induit une reproductibilité dans l'organisation des systèmes biomoléculaires

qu'on observe. En modifiant un paramètre (physique ou biochimique) l'impact de cette modification sur le fonctionnement du système biologique étudié apparaît plus clairement qu'*in vivo*. En répétant un grand nombre de fois une expérience *in vitro*, on aura donc rapidement accès à des données statistiques issues de l'observation des comportements reproductibles des systèmes moléculaires et on pourra plus facilement dégager les facteurs clés qui sont à l'origine de leurs mécanismes de fonctionnement. En se basant sur ces données d'observation, on peut modéliser les systèmes biologiques par des lois mathématiques et déterminer les lois physiques qui dirigent l'organisation d'un système biologique vers un rôle précis.

1.1.2 Positionnement

Contrôle spatial et temporel

Les lois physiques fondamentales qui régissent l'organisation des systèmes biomoléculaires sont l'agitation thermique et les forces d'attraction. L'agitation thermique gouverne la diffusion des biomolécules et rend possible leur rencontre, c'est-à-dire leur rapprochement spatial. Les forces d'attraction permettent aux biomolécules qui se rencontrent de s'associer en structures organisées (impliquant des transferts d'énergie matérialisés par des changements de conformation tridimensionnelle). La dissociation des biomolécules d'une structure organisée est régie elle aussi par les fluctuations thermiques. Un système biologique est un équilibre dynamique entre trois paramètres : la diffusion, l'association et la dissociation des biomolécules qui le composent. Or, ces trois paramètres sont des fonctions des concentrations massiques C_i de chaque biomolécule et de chaque complexe biomoléculaire existant dans la cellule. On peut donc ramener la description d'un système biomoléculaire à un agencement dans l'espace \mathbf{x} et dans le temps t des concentrations massiques $C_i(\mathbf{x}, t)$ de ses constituants i .

$$\text{Système biomoléculaire} \sim f[C_i(\mathbf{x}, t)].$$

Contrôler un système biomoléculaire *in vitro* revient donc à contrôler les $C_i(\mathbf{x}, t)$ des composés biochimiques i mis en jeu dans l'établissement de l'équilibre dynamique du système biologique considéré. En effet, un seul composé d'un système biomoléculaire peut influencer l'organisation de tous les autres composés qui contribuent à l'équilibre du système biomoléculaire. Par conséquent, contrôler la $C(\mathbf{x}, t)$ d'un composé, c'est orienter l'organisation du système biomoléculaire dans le temps et dans l'espace et c'est l'objectif général de cette thèse.

Démarche "bottom-up"

La démarche scientifique globale que nous suivons pour étudier les systèmes moléculaires intracellulaires *in vitro* est la démarche bottom-up. La démarche bottom-up vise à simplifier les systèmes biomoléculaires par rapport à l'état de complexité dans lequel ils fonctionnent *in vivo* et rendre ainsi possible la compréhension des phénomènes existant au sein de ces systèmes. Pour y parvenir, la stratégie est de purifier les composés biochimiques constituant le système et de les agencer dans l'espace et dans le temps en les ajoutant un par un pour observer leurs effets respectifs sur le fonctionnement du système biomoléculaire. On parle alors de système moléculaire reconstitué *in vitro* que l'on abrègera par "SMRIV".

L'objectif général de cette thèse est de développer des technologies qui permettent de contrôler, à l'échelle microscopique, les équilibres dynamiques des SMRIVs dans l'espace et dans le temps en suivant la démarche bottom-up. Pour accéder au contrôle de $C(\mathbf{x})$: la concentration massique des composés biochimiques dans l'espace, nous utiliserons la technologie du "micropatterning" (micro structuration de surface). Pour accéder au contrôle de $C(t)$: la concentration massique des composés biochimiques dans le temps, nous utiliserons la technologie de la microfluidique.

Le cytosquelette d'actine est sans doute l'un des meilleurs exemples de système biomoléculaire adaptatif : il est en permanence en train de se réorganiser dans l'espace et dans le temps pour assurer ses diverses fonctions. Le cytosquelette d'actine est lui-même composé de sous-systèmes moléculaires qu'il est possible de reconstituer *in vitro* selon la démarche bottom-up. Pour cela, nous irons jusqu'à coupler le contrôle de $C(\mathbf{x})$ et le contrôle de $C(t)$ en associant le micropatterning et la microfluidique.

1.2 Le système biomoléculaire étudié : le cytosquelette d'actine

1.2.1 Fonctionnement *in vivo*

Le cytosquelette d'actine dans son ensemble

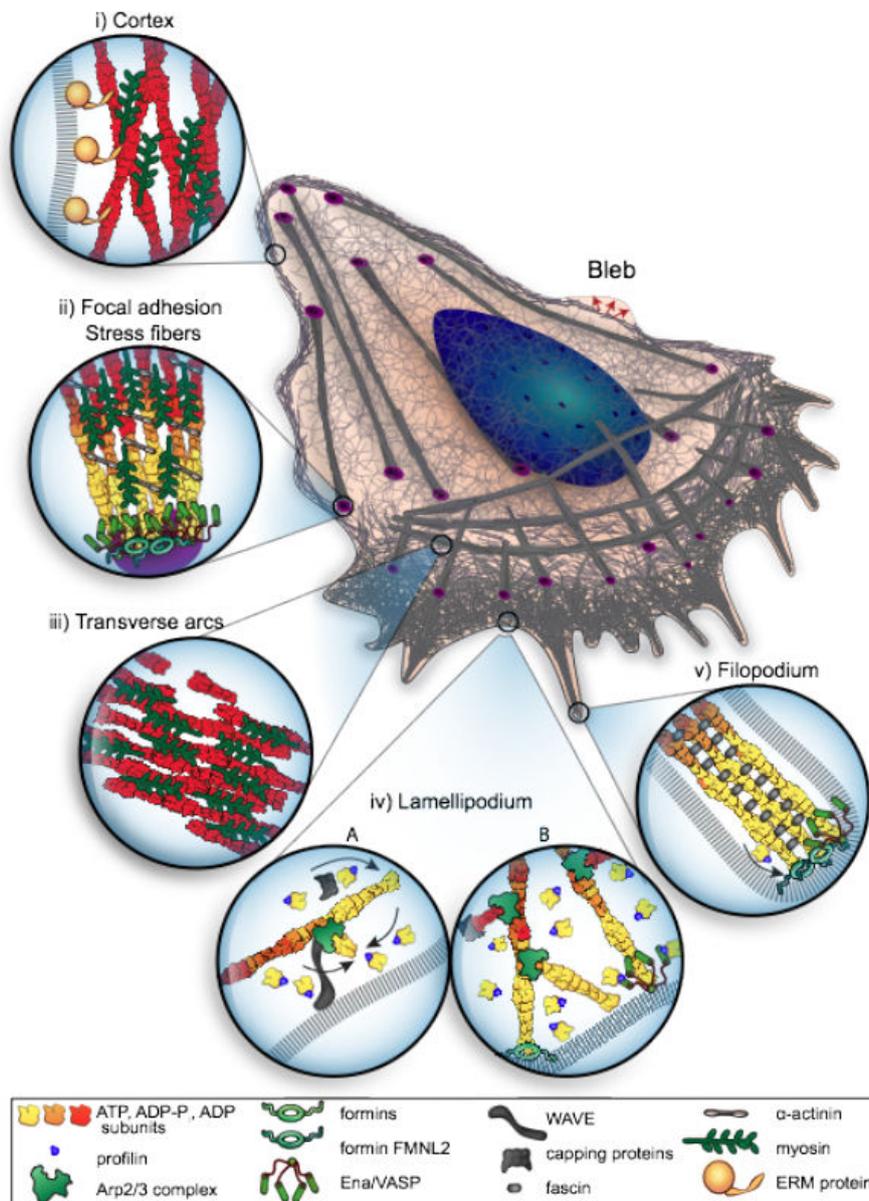


FIGURE 1.5 – Organisation du cytosquelette d'actine *in vivo* [?]

Le cytosquelette d'actine est l'acteur principal de la morphogénèse, il est à la base de nombreux processus comme la motilité cellulaire, l'établissement de la polarité des cellules, la division cellulaire. Le cytosquelette d'actine donne à la cellule sa forme en s'organisant spatialement en fonction des échanges de signaux chimiques entre la cellule et son environnement [?, 11, 132, 133]. L'actine se réorganise très rapidement dans le temps pour remodeler l'espace intérieur et extérieur à la membrane plasmique et contribue ainsi à ce que la cellule atteigne l'équilibre biochimique vers lequel elle tend. La machinerie moléculaire du cytosquelette d'actine est un ensemble de protéines dont la plus importante est l'actine. L'actine est une protéine globulaire qui polymérise en filaments selon différentes architectures : en réseaux branchés, en structures liées, en réseaux parallèles, en réseaux antiparallèles, en structures contractiles. Les différences d'organisation spatiale entre ces architectures d'actine traduisent une différence dans le rôle que ces architectures ont pour la cellule. L'ensemble des protéines qui participent à l'édification d'une architecture n'est pas le même pour chaque architecture. Et enfin, la dynamique des interactions entre les protéines qui constituent une architecture est spécifique de cette architecture.

Dans le bord avant de la cellule, un réseau branché et des structures liées forment le lamellipode (quasi bidimensionnel) qui est l'acteur principal du mouvement cellulaire. Du lamellipode naissent des structures de filaments parallèles liés en câbles fins appelés filopodes (quasi unidimensionnels) importants dans la directionnalité du mouvement cellulaire. Le cortex d'actine formant un fin réseau continu sous la membrane plasmique maintient la forme globale de la cellule. Le reste de la cellule contient un enchevêtrement de filaments d'actine liés et de structures contractiles dont les fibres de stress qui connectent le cytosquelette à la matrice extra-cellulaire au niveau des adhésions focales. Le lamellipode et les filopodes pilotent la motilité cellulaire alors que les structures contractiles comme les fibres de stress, les arcs transverses ou le cortex assurent l'intégrité mécanique et la cohérence du mouvement de la cellule dans son ensemble. L'anneau de cytokinèse est un cas particulier car il apparaît seulement au moment de la division cellulaire. Sa contraction entraîne la membrane plasmique et la sépare en deux espaces formant les deux cellules filles.

Les sous-systèmes moléculaires du cytosquelette d'actine

Filament d'actine individuel

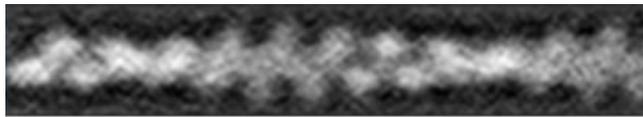


FIGURE 1.6 – Structure du filaments d’actine individuel (microscopie électronique) [123]

L’élément de base du cytosquelette est le monomère d’actine, protéine de 42 kDa hautement conservée dans l’évolution des eucaryotes. Les monomères d’actine s’assemblent les uns à la suite des autres en double hélice pour former un filament [48, 123]. Les filaments d’actine sont des polymères semi-flexibles [55], c’est-à-dire qu’en dessous de $10 \mu m$ ils réagissent mécaniquement comme des poutres rigides et au delà de $10 \mu m$ ils peuvent se courber sous l’effet de l’agitation thermique. Cette longueur de 10 micromètres est la longueur de persistance du filament d’actine individuel. La cinétique d’assemblage du filament d’actine est thermodynamiquement limitée par une étape de nucléation qui consiste en la formation d’un dimère puis d’un trimère d’actine. Dès l’étape de nucléation passée, le filament s’allonge rapidement, la vitesse d’élongation étant proportionnelle à la concentration de monomères dans l’environnement proche. Les filaments d’actine sont polarisés, ils possèdent une extrémité barbée et une extrémité pointue. L’extrémité barbée est plus dynamique que l’extrémité pointue, la vitesse de polymérisation et de dépolymérisation y est dix fois plus grande qu’à l’extrémité pointue [130]. Dans les cellules, la concentration d’actine est $300 \mu M$, par conséquent la vitesse de polymérisation atteint 3000 sous-unités par seconde, amenant les filaments à s’allonger à la vitesse de $5 \mu m.s^{-1}$ [132], l’ordre de grandeur d’une cellule étant de 10 à 50 micromètres. La polymérisation des monomères d’actine aux extrémités des filaments est suivie par l’hydrolyse de l’ATP (dans la poche nucléotidique du monomère) à un taux de $0.3 s^{-1}$, puis par la dissociation du phosphate à un taux de $0.002 s^{-1}$ [88]. Un filament ATP, un filament ADP-Pi et un filament ADP n’ont pas la même conformation ; les protéines associées n’y interagissent pas avec les mêmes cinétiques.

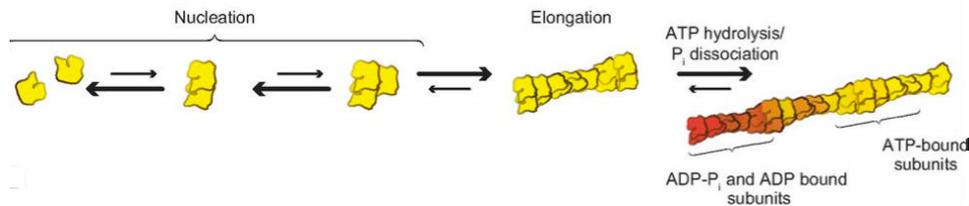


FIGURE 1.7 – Nucléation de l’actine, polymérisation et hydrolyse de l’ATP [?]

De ce fait le filament a un âge qui constitue un paramètre temporel important dans l’organisation du cytosquelette. La polymérisation de l’actine est thermodynamiquement défavorable, mais, si un noyau d’actine parvient à se former (dimère, trimère) il y a polymérisation spontanée si la concentration en monomères d’actine est plus grande que la concentration critique. La concentration critique, qui est $0.1 \mu M \cdot s^{-1}$ [132], est la concentration en monomères d’actine pour laquelle la vitesse de polymérisation de l’extrémité barbée est égale à la vitesse de polymérisation de l’extrémité pointue. La longueur du filament d’actine est alors constante au cours du temps, c’est ce qu’on appelle "treadmilling". La concentration critique peut être atteinte dans les cellules dont le réservoir d’actine cytoplasmique est de l’ordre de 10 à 100 μM selon le type cellulaire. La profiline, une protéine de liaison à l’actine abondante dans le cytoplasme, joue un rôle important dans l’homéostasie. Elle se fixe à tous les monomères d’actine libres et inhibe la formation de dimères ou de trimères empêchant ainsi la polymérisation spontanée [132]. Dans les cellules, la polymérisation de filaments ne peut alors être déclenchée que par nucléation dite *de novo*. La nucléation *de novo* est catalysée par des nucléateurs, dont les plus importants sont : le complexe Arp 2/3 et les formines.

Filaments d’actine liés

Nous définissons comme "réseau de filaments liés", toute structure de filaments d’actine connectés par des protéines dites "de liaison croisée" formant des pontages entre les filaments (hormis le complexe Arp2/3). Les architectures liées ont une meilleure tenue mécanique et participent collectivement au maintien de l’intégrité mécanique de la cellule. [47, 181]. Contrairement au complexe Arp2/3 impliqué aussi bien dans l’assemblage des filaments que dans l’organisation spatiale du réseau, les protéines de liaison croisée n’interviennent pas dans l’assemblage de l’actine mais connectent les filaments entre eux en les organisant dans l’espace. Les protéines de liaison croisée alignent les filaments d’actine en structures linéaires compactes appelées câbles. Selon le type de protéine de liaison croisée, les filaments dans les câbles peuvent

être d'orientation identique ou d'orientation opposée. Des résultats récents montrent que la vitesse de polymérisation des filaments d'actine dans une structure liée peut influencer la façon dont les protéines de liaison croisée organisent la structure, et de façon réciproque la concentration de protéines de liaison croisée influence la vitesse de polymérisation des filaments dans la structure mise en place [45].

Réseau branché (lamellipode)

La présence du complexe nucléateur Arp2/3, protéine composée de sept sous-unités [119,140], est à l'origine de la formation du réseau branché d'actine, que l'on trouve principalement dans le lamellipode [161,178]. Le processus de formation d'un réseau branché commence à partir du bord d'un premier filament "primer", sur lequel interagit le complex Arp2/3 lui même activé par le promoteur de nucléation WSAP (Wiskott-Aldrich Syndrome protein) [106]. Une fois fixé sur le côté du filament, le complexe Arp2/3 déclenche l'élongation d'un second filament d'actine polymérisant par son extrémité barbée dans une direction de 72 degrés par rapport au filament "primer", formant ainsi une branche [20]. Le réseau d'actine constituant le lamellipode est donc un réseau branché qu'on peut voir très clairement en microscopie électronique [159] (Figure 8).

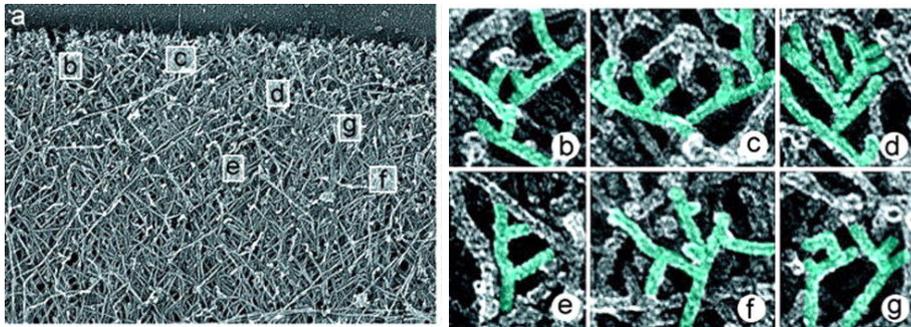


FIGURE 1.8 – Réseau branché d'actine dans le lamellipode cellulaire (microscopie électronique) [159]. A droite : b, c, d, e, f, et g sont les zooms des encadrés figurant sur l'image de gauche.

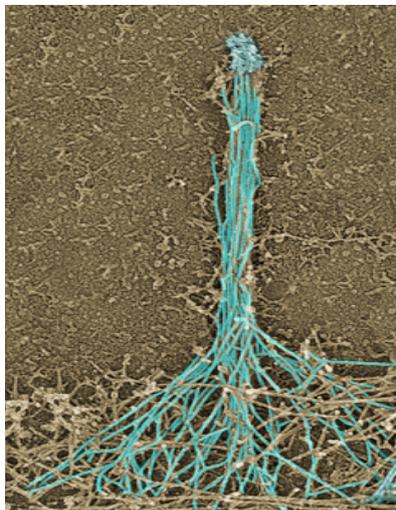
Réseaux de filaments d'actine parallèles à orientation identique (filopodes)

FIGURE 1.9 – Assemblage d'un filopode d'actine au bord avant de la cellule (microscopie électronique). On peut observer la masse de protéines associées à l'extrémité des filaments d'actine (recolorés en bleu). [Svitkina, conférence]

Les réseaux de filaments parallèles à orientation identique se retrouvent dans un grand nombre de contextes cellulaires : les filopodes, les microvillis, les cheveux membranaires, le cil primaire [18, 181, 188]. La plupart du temps, les filaments de ces réseaux ont leur extrémité barbée face à la membrane plasmique [34]. La façon dont un réseau de filaments parallèles à orientation identique est formé est une question ouverte. Deux mécanismes non exclusifs sont généralement admis : l'un incluant le complexe Arp2/3 et l'autre mettant en jeu des facteurs d'élongation comme les formines [33, 56] et/ou la protéine VASP (Ena/VASP) [90, 143]. Dès que les filaments s'organisent en structures parallèles, ils sont liés par des protéines de liaison croisée, comme la fascine, de façon à stabiliser la structure et à augmenter sa rigidité mécanique. Les formines sont une large famille de protéines caractérisées par la présence d'un domaine FH1 (formin homology 1) et d'un domaine FH2 (formin homology 2), le domaine FH1 fonctionnant comme un recruteur de complexes profiline-actine et le domaine FH2 interagissant avec l'extrémité barbée des filaments d'actine [4, 33]. Pour la plupart des formines, le domaine FH2 reste fixé sur l'extrémité barbée et accélère sa polymérisation par cinq [175] selon un mécanisme processif [2, 59, 141]. La protéine VASP interagit aussi avec l'extrémité barbée des filaments d'actine empêchant la fixation des protéines de coiffe mais autorisant la polymérisation [6, 26, 128]. Ce mode de fonctionnement peut induire la naissance d'un filopode au sein

du réseau branché du lamellipode. Le rôle du complexe Arp2/3 doit aussi être revisité, au vu d'expériences récentes dans lesquelles des filopodes sont formés alors que le complexe Arp2/3 est bloqué dans la cellule [158]. Selon le modèle de convergence des filaments d'actine entre eux, la simple répartition spatiale du complexe Arp2/3 suffit à réguler la formation de filopodes. Selon le modèle de nucléation à l'extrémité barbée, l'intervention des formines et/ou de la protéine VASP suffit à déclencher la formation de filopodes [188].

Réseaux de filaments d'actine parallèles à orientations opposées (fibres de stress)

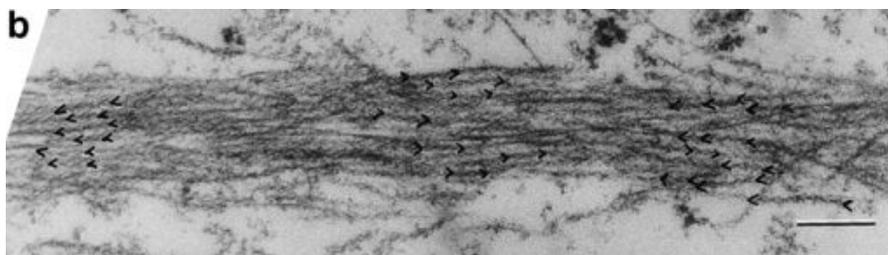


FIGURE 1.10 – Orientation des filaments d'actine dans une fibre de stress (microscopie électronique) [38]

Une fibre de stress est un câble de filaments d'actine parallèles dont les intersections sont antiparallèles [38], ainsi, des moteurs moléculaires, les myosines, s'y associent pour rendre la structure contractile. Les fibres de stress contractiles sont utiles pour la division cellulaire dans le processus de cytokinèse et pour le maintien de l'intégrité mécanique des cellules dans l'établissement des jonctions cellule-cellule [27, 168]. Comme dans tout réseau parallèle, des protéines de liaison croisée interviennent pour stabiliser la structure [164]. L'alpha-actinine et la fimbrine sont de bons candidats d'association aux structures antiparallèles [91]. La longueur des filaments d'actine dans les structures à orientation aléatoire a un impact direct sur les propriétés contractiles et le nombre de têtes de myosine par unité de longueur de fibre fait varier les forces de tension le long de la structure [165]. L'orientation des filaments d'actine dans un réseau contractile joue un rôle déterminant dans le contrôle de la vitesse de contraction [35, 86]. Aussi, la cinétique de polymérisation et de dépolymérisation des filaments d'actine doit être prise en compte, en plus de l'activité des myosines, pour expliquer des phénomènes comme la contraction de l'anneau de cytokinèse lors de la division cellulaire [194]. Il s'avère nécessaire de travailler davantage sur la corrélation entre l'organisation géométrique des structures parallèles à orientation opposée, la composition de leur environnement biochimique, et leurs propriétés contractiles. Exclues du

lamellipode [61], les fibres de stress sont présentes dans tout le reste de la cellule [129]. Il existe deux principales catégories de fibres de stress : les fibres de stress ventrales orientées perpendiculairement au mouvement de la cellule, qui jouent un rôle clé dans la sensibilité mécanique de la cellule *via* les adhésions focales, et les fibres de stress transverses orientées parallèlement au bord avant de la cellule, juste derrière le lamellipode, qui lient entre elles les fibres de stress ventrales. Annuler l'assemblage des fibres de stress empêche la motilité cellulaire et la maturation des contacts focaux d'adhésion. Les fibres de stress musculaires ont un degré d'organisation spatial très élevé. Elles sont segmentées en unités contractiles et chaque unité contractile comporte un nombre précis de filaments d'actine de longueur identique qui s'intersectent selon une géométrie quasi cristalline (Figure 11). L'exemple des fibres musculaires met en évidence l'importance de l'organisation géométrique des réseaux parallèles dans les propriétés contractiles des fibres de stress.

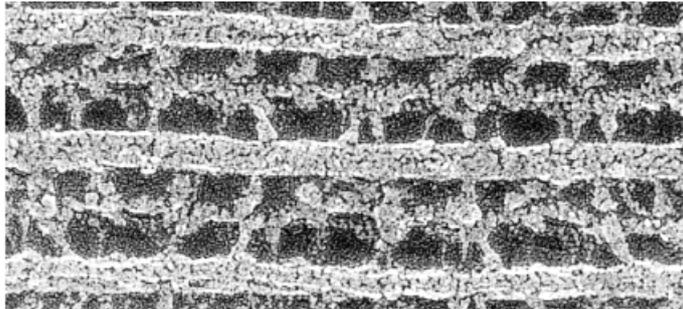


FIGURE 1.11 – Organisation sarcomérique d'une fibre de stress musculaire (microscopie électronique) [Lodish, conférence]

Anneau de cytokinèse

L'anneau de cytokinèse est une fibre de stress circulaire composée de filaments d'actine d'orientation aléatoire [72, 131]. La cytokinèse est un cas intéressant sur le plan du degré d'ordre temporel. Un grand nombre de protéines, dont les myosines II et les formines, participent à la formation et à la contraction de l'anneau d'actine. Au total plus de 50 gènes contribuent à la cytokinèse [134, 185]. Et malgré tout, l'ordre dans lequel les protéines interviennent est finement régulé dans le temps : à chacune des étapes clés de la cytokinèse correspond le recrutement, à la minute près, d'un lot de protéines spécifiques : séparation des fuseaux mitotiques ($t=0$), début et fin de l'anaphase ($t=10$ minutes et $t=30$ minutes), début et fin de la contraction ($t=37$ minutes et $t=67$ minutes) [186].

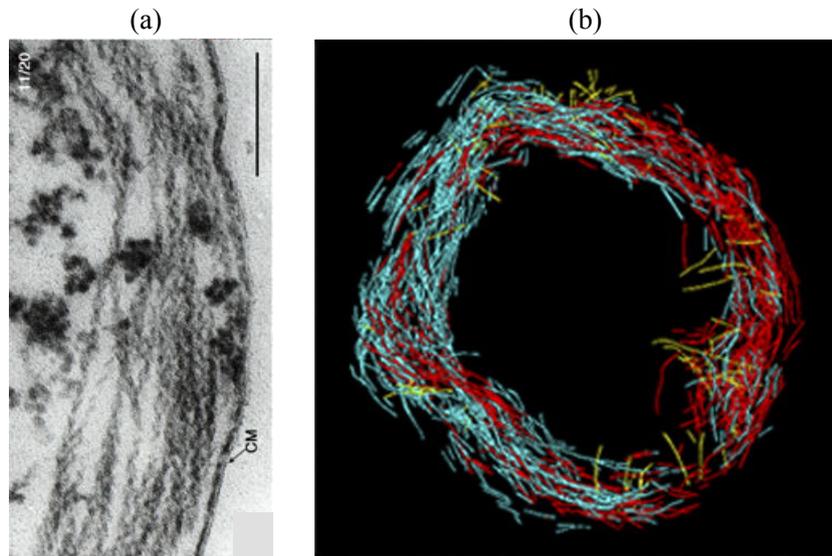


FIGURE 1.12 – (a) : Arrangement spatial des filaments d'actine sur une section d'anneau contractile (microscopie électronique). (b) reconstitution tridimensionnelle de filaments d'actine dans l'anneau de cytokinèse (à partir des tranches d'images de microscopie électronique) [72]

Ainsi, de nombreuses questions relèvent de l'intégration entre l'organisation spatiale des architectures d'actine et la séquence temporelle d'intervention des protéines qui les constituent. Comment l'âge nucléotidique du filament individuel influence-t-il l'interaction des protéines qui s'associent sur ses bords ?

Dans la construction d'une structure de filaments d'actine liés, on sait que la cinétique de polymérisation des filaments d'actine et l'action de pontage des protéines de liaison sont deux processus qui s'influencent mutuellement. Il serait intéressant alors d'observer comment les structures se remodelent dans l'espace en faisant intervenir ces deux processus selon des ordres chronologiques différents.

Pour expliquer la formation d'un filopode à partir du réseau branché du lamellipode, deux modèles se distinguent : le modèle de convergence selon lequel une modification de la répartition spatiale des complexes Arp2/3 à la membrane plasmique suffit à faire converger les filaments d'actine en un câble et le modèle de nucléation basé sur l'intervention d'un groupe de protéines (formines, VASP, ...) à l'extrémité barbée des filaments d'actine. Comment vérifier expérimentalement chacun des modèles ? Comment savoir quels mécanismes sont indispensables pour former un filopode et quels sont ceux qui sont secondaires ? Quel est l'ordre chronologique des mécanismes ?

Dans une fibre de stress, par exemple, de nombreux paramètres spatiaux sont importants : La longueur des filaments d'actine, leur orientation, la densité de myosines et leur répartition le long de la fibre. Comment ces paramètres changent-ils les propriétés contractiles de la fibre de stress ?

Dans la cytokinèse, quelle est l'importance de l'ordre temporel dans lequel les protéines interviennent pour assembler et contracter l'anneau ?

Les architectures d'actine présentées (filaments individuel, réseaux parallèles etc..) sont des sous-systèmes moléculaires du cytosquelette d'actine. Nous pouvons les reconstituer *in vitro*. Nous verrons alors, dans la partie résultats, comment les technologies de contrôle spatial (micropatterning) et de contrôle temporel (microfluidique) peuvent permettre de répondre à ces questions ouvertes. Mais avant cela, passons en revue l'état de l'art concernant l'étude du cytosquelette *in vitro*.

1.2.2 Reconstitution *in vitro*

Les systèmes d'actine reconstitués *in vitro* se sont complexifiés au fur et à mesure des années, pour mimer de la façon la plus réaliste possible les mécanismes moléculaires du cytosquelette cellulaire.

Dans le cadre de la démarche bottom-up, ces systèmes d'actine reconstitués vont du système le plus simple, à savoir le filament d'actine individuel, au système le plus complexe possible. Le but étant de reproduire le plus fidèlement possible les réseaux de filaments d'actine qu'il y a dans une cellule vivante. La reconstitution du cytosquelette d'actine *in vitro* doit tenir compte non seulement de la géométrie des structures d'actine qu'il existe dans la cellule, mais aussi de leur dynamique d'évolution comme la vitesse d'élongation des filaments, la cinétique d'interaction des protéines associées, la vitesse de contraction d'un réseau etc.

L'arrivée de la microscopie à onde évanescente a permis d'observer en temps réel la dynamique d'élongation des filaments d'actine individuels [1] (Figure 13A). Cette technique de microscopie est encore utilisée aujourd'hui pour mesurer les paramètres cinétiques dans l'assemblage moléculaire d'un filament d'actine individuel [2, 3, 6].

Plus complexe maintenant, des réseaux de filaments d'actine libres déposés sur un substrat non adhérent constituent des systèmes modèles simplifiés pour l'étude de la contractilité acto-myosine [45, 120, 179].

En augmentant encore la complexité, il est possible de reconstituer *in vitro* des filopodes en générant leur nucléation sur une bicouche lipidique à partir d'extraits cellulaires [95]. Ce type de reconstitution a permis d'étudier la complémentarité entre l'activité du complexe Arp2/3 et l'activité des formines dans la formation d'un filopode (Figure 13B).

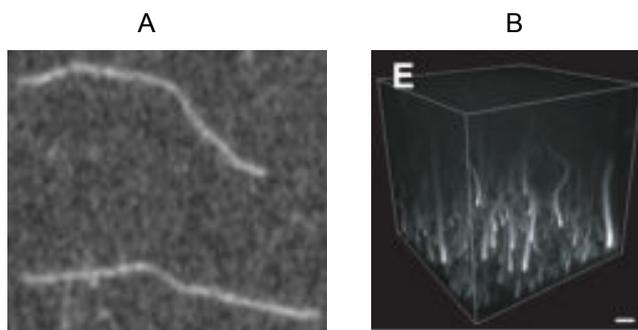


FIGURE 1.13 – A : Filaments d'actine individuels visualisés au microscope à onde évanescente par fluorescence des monomères d'actine B : Image en trois dimensions de câbles de filaments d'actine de type filopode générés à partir du substrat inférieur et s'allongeant vers le haut.

La formation des filopodes au contact de la membrane plasmique de la cellule a aussi pu être reconstituée *in vitro* dans une vésicule lipidique [99]. Ce qui permet d'observer clairement la transition entre le réseau branché du lamellipode et les protrusions membranaires que sont les filopodes (Figure 14A).

La découverte de la bactérie *Listeria Monocytogene* a été une étape importante dans la dynamique de recherche bottom-up sur le cytosquelette d'actine *in vitro*. Cette bactérie est capable de se propulser dans le cytoplasme d'une cellule hôte en polymérisant une comète d'actine à partir de sa membrane externe. En greffant, sur la surface d'une bille en polystyrène, les protéines de la membrane externe de la bactérie qui déclenchent la polymérisation de l'actine, la bille produit une comète d'actine qui la propulse dans la solution *in vitro* [30, 189] (Figure 14B). Ce système biomimétique qui contient les éléments de la machinerie du lamellipode cellulaire a permis de mieux comprendre les mécanismes du cytosquelette d'actine qui sont à la base de la motilité cellulaire [9, 126, 171], en étudiant la transition entre réseau branché du lamellipode et réseaux parallèles de type filopodes [57, 177], et en ajoutant, une par une, les protéines qui remodelent la structure de la comète et régulent la dynamique de son élongation [98, 139, 169].

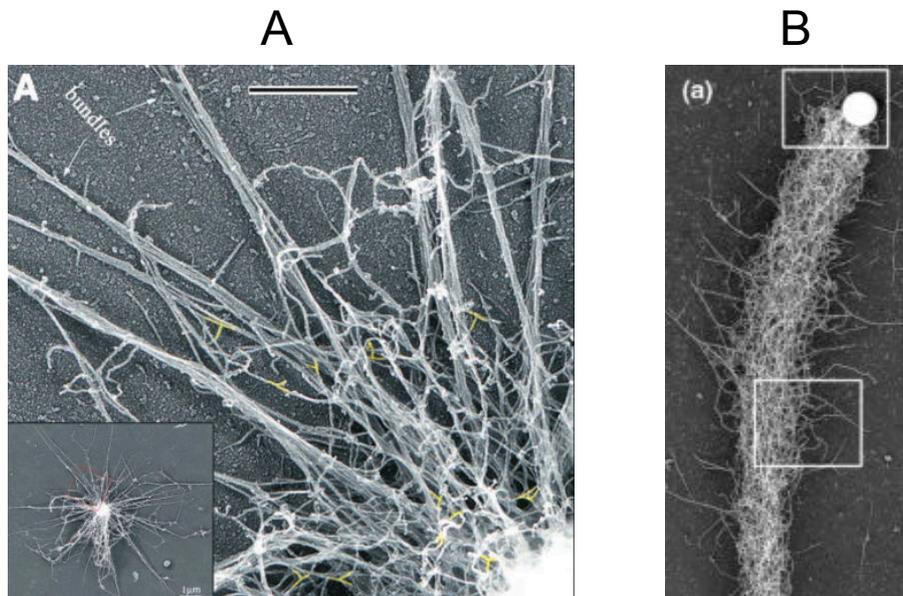


FIGURE 1.14 – A : Bille en polystyrène générant un réseau branché d'actine à sa surface et des câbles d'actine de type filopodes émanant de la bille de façon isotrope. L'image principale est un zoom de l'encadré en bas à gauche. B : Bille en polystyrène propulsée par une comète d'actine constituée d'un réseau branché dense.

Concernant le cortex d'actine cellulaire, des systèmes reconstitués sur une bicouche lipidique [120, 179] ou sur la paroi interne d'un liposome [135] sont apparus comme de bons modèles biomimétiques pour étudier les mécanismes d'expansion et de contraction du réseau d'actine cortical.

Concernant les réseaux de filaments d'actine antiparallèles, Todd Thoresen est parvenu, en utilisant des billes, à reconstituer des câbles d'actine comprenant plusieurs unités de filaments d'actine antiparallèles de façon à étudier leurs propriétés contractiles en fonction de leurs paramètres structuraux et des différentes isoformes de moteurs moléculaires [164, 165]. Ces systèmes reproduisent la formation des fibres de stress avec une orientation aléatoire des filaments d'actine parallèles, comme dans la cellule. Bien que se rapprochant de la réalité (Figure 15), cependant le degré d'ordre de ces systèmes biomimétiques est encore assez pauvre.

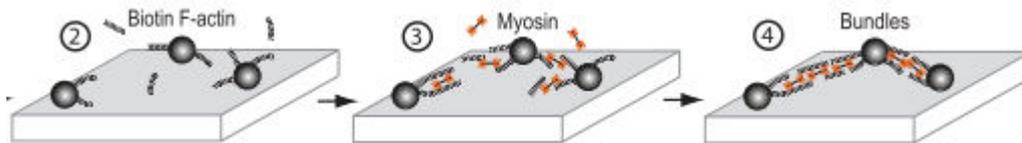


FIGURE 1.15 – Schéma de formation d'un câble de filaments d'actine de polarité aléatoire de type fibre de stress à partir de deux billes servant de points d'ancrage aux premiers filaments qui forment le câble. Les myosines intègrent le câble d'actine en mettant les filaments d'actine sous tension entre les deux câbles.

Deux études récentes démontrent qu'il est possible d'organiser les réseaux d'actine *in vitro* bien mieux que ça en contrôlant avec précision la géométrie bidimensionnelle des filaments d'actine, générant ainsi des réseaux strictement parallèles et compacts avec des filaments de longueur identique et qui peuvent se rencontrer selon des angles précis et contrôlés. [138]. A partir de cette même méthode, une étude complémentaire a permis de reproduire, entre deux lamelles en verre, la contraction d'un anneau d'actine contenant une série de points générant chacun un certain nombre de filaments d'actine qui se croisent de façon antiparallèle [137] (Figure 16).

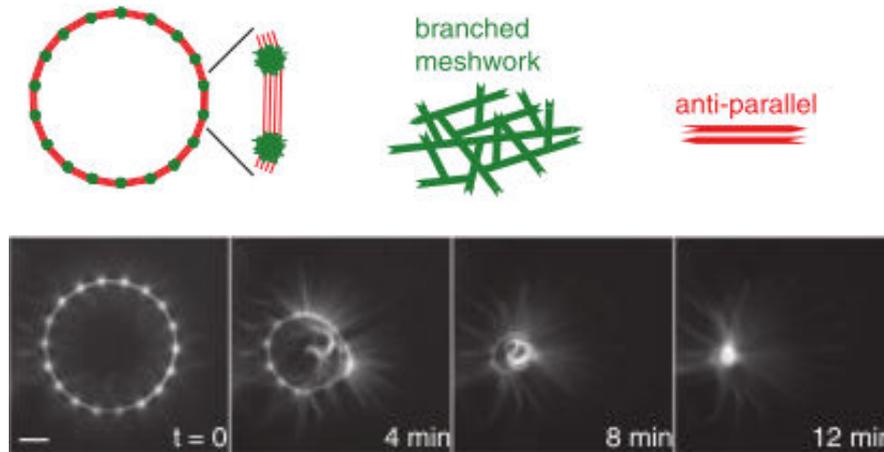


FIGURE 1.16 – Cercle composé de petits disques micropatternés sur un substrat plat et générant chacun un réseau branché. Les filaments qui sortent de ces disques se croisent de façon antiparallèle entre chaque disque. Le schéma du haut montre l’organisation spatiale des filaments d’actine sur la structure circulaire. La cinétique du bas montre l’effet des moteurs moléculaires sur la structure.

De manière générale, la reconstitution du cytosquelette d’actine *in vitro* en systèmes biomimétiques permet de répondre à des questions biologiques importantes avec une précision moléculaire. Cependant, l’ensemble de ces systèmes biomoléculaires reconstitués pour lesquels on peut se référer à la revue de Daniel Fletcher [46] ont une limitation commune : ils ne contiennent pas un moyen de contrôler le micro-environnement biochimique du système au cours du temps. Contrôler le micro-environnement biochimique d’un filament d’actine au cours du temps signifie contrôler les ajouts et les retraits des monomères et des autres protéines associées au filament dans la solution dans laquelle le filament se situe. Comment, par exemple, peut-on contrôler au cours du temps l’apparition de branches d’actine à partir d’un filament individuel ? En 2000, Laurent Blanchoin trouve un moyen de le faire mais il s’agit de fixer les filaments à la phalloïdine avant d’ajouter à la solution la protéine Arp2/3 qui génère des branches [23] (Figure 17).

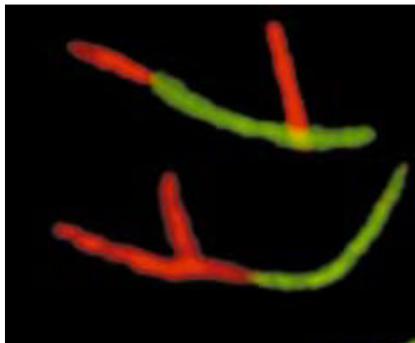


FIGURE 1.17 – Filaments d’actine marqués en vert puis fixés à la phalloïdine, puis ajout de monomères rouges et de la protéine Arp2/3 dans la même solution, créant ainsi de nouvelles branches d’actine à partir du côté des filaments vert pré-existant.

Le dynamisme de polymérisation des filaments d’actine est donc perdu. En 2004, Daniel Fletcher imagine une technique de photo-patterning pour contrôler le déclenchement de la formation des branches d’actine à partir d’un filament individuel mais les traitements aux UVs et les traitements chimiques nécessaires altèrent les structures naturelles [98]. Ajouter ou enlever une (des) protéine(s) à un système d’actine au cours de sa propre croissance paraissait donc impossible. Or dans la cellule, c’est ce qu’il se passe : un grand nombre de protéines ayant chacune un rôle différent agissent de concert sur les architectures d’actine en intervenant et en se retirant des structures à des temps différents et bien précis. Ce n’est qu’avec l’arrivée de la microfluidique qu’il a été possible de contrôler en temps réel le micro-environnement biochimique des systèmes d’actine reconstitués *in vitro* sans avoir recours à des traitements nocifs pour les fragiles filaments d’actine que l’on observe. La microfluidique, c’est le maniement des fluides à l’échelle submicrométrique, c’est-à-dire à des échelles qui se rapprochent étroitement du système biologique étudié, à savoir les filaments d’actine. La microfluidique permet de modifier au cours du temps la solution biochimique d’un système biologique reconstitué de deux manières différentes : par convection ou par diffusion. La convection consiste à remplacer la solution par un flux et la diffusion consiste à renouveler la solution en utilisant comme seul moteur de mouvement l’agitation thermique. Encore très peu de systèmes d’actine reconstitués exploitent les possibilités offertes par la microfluidique et on peut les distinguer selon deux catégories : les filaments d’actine individuels et les réseaux de filaments d’actine.

L’élément de base du cytosquelette d’actine est le filament individuel libre (libre voulant dire que le filament est libre de tout mouvement et qu’il est soumis uniquement aux fluctuations thermiques). L’étude du filament libre est essentiel pour connaître les propriétés intrinsèques au filament d’actine.

C'est pourquoi les premières études utilisant la microfluidique ont porté sur l'identification des mécanismes microscopiques en lien avec les configurations énergétiques du filament d'actine individuel libre [55, 75, 89]. L'inconvénient majeur de ces études est l'impossibilité de renouveler la solution au cours du temps sans que cela ait un effet sur les mouvements du filament d'actine.

Le seul moyen de renouveler la solution par convection, sans provoquer de mouvement sur un filament d'actine individuel, est de le fixer au substrat par une ses extrémités. Les filaments d'actine se retrouvent alignés dans le flux et il est facile d'observer et de mesurer les effets des modifications du micro-environnement biochimique (Figure 18) Cette possibilité de modifier sous flux la biochimie de la solution a permis de contrôler les cycles de polymérisation et de dépolymérisation de filaments d'actine individuels, révélant le mécanisme de dissociation du phosphate [70] et l'existence de pauses temporelles au cours de leur dépolymérisation [124].

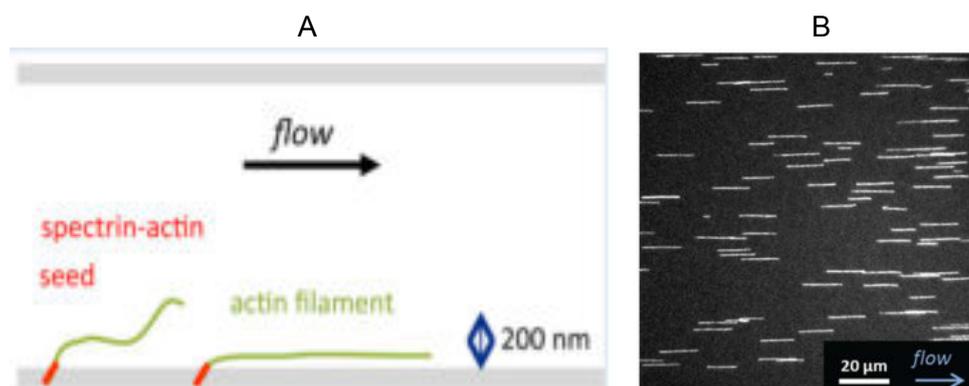


FIGURE 1.18 – A : Canal microfluidique dans lequel s'écoule un flux de gauche à droite. Les filaments d'actine sont fixés au substrat par leur extrémité pointue un complexe spectrine-actine. B : Filaments d'actine sous flux visualisés par fluorescence des monomères d'actine.

Aussi, les forces de friction de l'ordre du picoNewton exercées de façon homogène sur tout le contour du filament sous flux a permis la mesure et l'explication de la mécano-sensibilité de la formine mDia lors de son travail processif d'élongation du filament d'actine [71]. Seulement, les filaments d'actine fixés à une extrémité ne sont pas des filaments libres. De plus, les contraintes hydrodynamiques exercées sur eux en permanence modifient leur conformation naturelle (celle qu'ils ont dans la cellule).

Quelques travaux utilisent la microfluidique pour reproduire des structures d'actine plus complexes que le filament individuel [5, 170, 184]. Mais le contrôle temporel par convection de la solution biochimique contenant ces structures ne peut se faire sans les détériorer ou les emporter.

Il est donc indispensable que le contrôle temporel du micro-environnement biochimique d'un système d'actine reconstitué *in vitro* doive se faire par diffusion et non par convection. Une seule étude existe à l'heure actuelle utilisant des chambres à diffusion pour changer la solution sur des filaments d'actine libres. Cette étude permet de réaliser le processus réversible par lequel les filaments d'actine se regroupent et se dissocient en ajoutant et en retirant à la solution des sels de magnésium [39] (Figure 19).

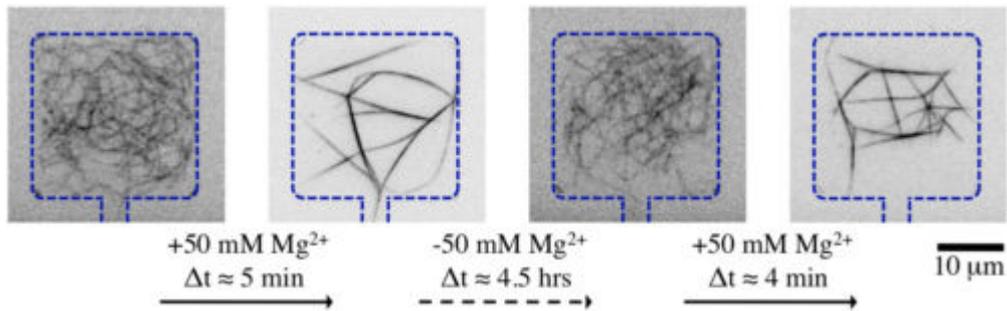


FIGURE 1.19 – Chambre microfluidique (délimitée par les pointillés bleus) protégée du flux. Les filaments d'actine contenus initialement dans la chambre sont successivement soumis à : l'ajout de magnésium, le retrait du magnésium, l'ajout du magnésium.

Chapitre 2

Résultats

Chapitre 2

Résultats

2.1 Contrôle spatial de l'assemblage des systèmes d'actine reconstitués *in vitro*

2.1.1 Le micropatterning

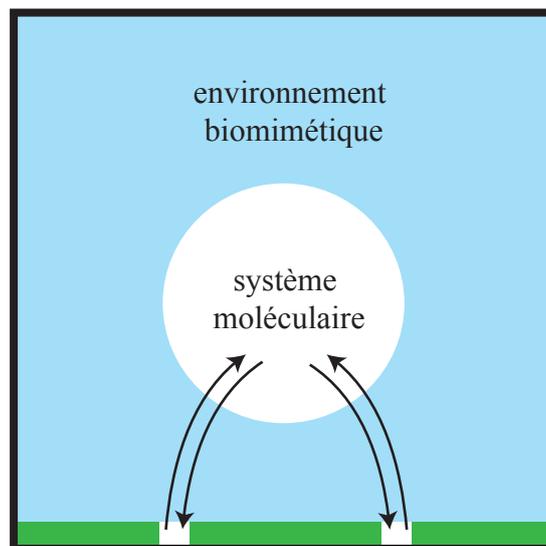


FIGURE 2.1 – Micropatterning et SMRIV : Zones vertes : zones non-adhérentes (PEG). Carrés blancs : biomolécules fixées. Les flèches indiquent que le SMRIV (cercle blanc) s'organise en fonction des constituants fixés sur la surface de l'échantillon.

Le principe du micropatterning pour un système biomoléculaire *in vitro* est de fixer dans l'espace les molécules biologiques qui lui sont associées *in vivo* et qui participent à son assemblage. Pour cela, il faut créer des

zones adhésives (chimiquement réactives) sur lesquelles se greffent les molécules biologiques, et des zones non adhésives (bio-inertes) qui empêchent leur adhésion. La technique du micropatterning est utilisée depuis vingt ans avec l'apparition du "microcontact-printing" [117, 118, 150] qui permettait déjà de contrôler l'adhésion des cellules dans l'espace 2D en greffant les protéines de la matrice extra-cellulaire de façon géométriquement contrôlée sur un substrat plan [163]. Aujourd'hui la technologie du micropatterning est considérablement plus simple et plus rapide, elle est basée sur l'utilisation du PEG (polyéthylène glycol) [114] et des UV profonds (ultra violets aux environs de 180 nm) [14, 176]. La méthode est la suivante :

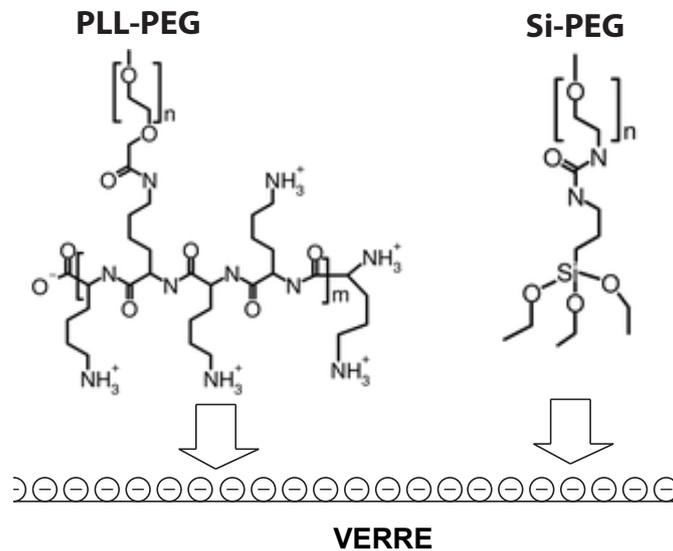


FIGURE 2.2 – Fixation du PLL-PEG (polylysine-polyéthylène glycol) ou du Si-PEG (silane-polyéthylène glycol) sur une surface de verre électronégative. La fixation des chaînes de PLL-PEG se fait par attraction électrostatique tandis que la fixation d'une chaîne de Si-PEG est une liaison covalente.

On greffe des chaînes de PEG sur une surface de verre activée au plasma [146] (Figure 2). Si la densité des chaînes de PEG est suffisante, celles-ci s'organisent en brosse et piègent étroitement les molécules d'eau [64, 190], empêchant toute autre biomolécule d'interagir avec la surface [193] (Figure 3).

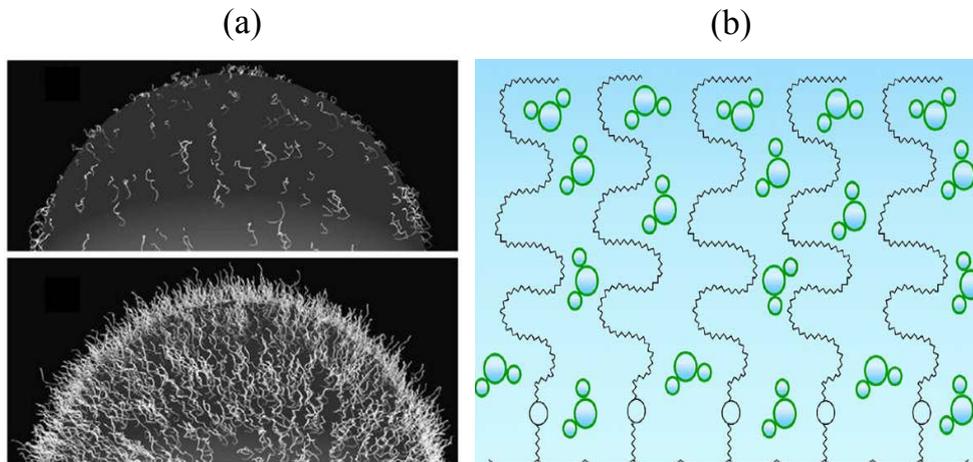


FIGURE 2.3 – (a) La densité des chaînes de PEG est un paramètre crucial pour les propriétés antiadhésives du PEG. (b) Piégeage des molécules d’eau dans une brosse de chaînes de PEG.

Ensuite on expose la surface de PEG aux UV profonds selon des géométries micrométriques à travers un masque en chrome. Les zones insolées qui contiennent des groupements chimiques réactifs constituent les micropatterns sur lesquels on peut greffer des biomolécules [14].

Le micropatterning permet donc de contrôler, dans l’espace bidimensionnel de l’échantillon, la concentration massique $C(\mathbf{x})$ des composés biochimiques des SMR IV . Dans l’état d’esprit d’une démarche bottom-up, nous travaillons au laboratoire à reconstituer, *in vitro*, les réseaux dynamiques du cytosquelette d’actine. Dans la cellule, toute architecture d’actine est initiée par la nucléation *de novo* de filaments d’actine par des protéines de nucléation de l’actine. Si on souhaite reconstituer une architecture d’actine *in vitro*, il faut donc commencer par contrôler spatialement les zones de nucléation *de novo* des filaments d’actine. Autrement dit, il faut contrôler spatialement la concentration massique des protéines de nucléation de l’actine. Nous allons montrer comment l’utilisation du micropatterning nous a permis d’y parvenir et quelles sont les architectures d’actine que nous sommes parvenus à reconstituer.

2.1.2 Le contrôle géométrique de la nucléation de l'actine par la technique du "micropatterning WASP" : *Article 1*

Article 1 (cf. Annexes) :

Reymann A.C., Martiel J.L., Cambier T. et al. Nat Mater, 2010.

Dans les études de cellules adhérentes *in vitro*, la protéine que l'on greffe sur les micropatterns est en général la fibronectine, que l'on trouve dans la matrice extra-cellulaire et qui se fixe aux intégrines des cellules [162]. Ainsi les "micropatterns fibronectine" constituent des zones d'adhésion pour les cellules. Ici (*Article 1*) la protéine que l'on greffe sur les micropatterns est un peptide de la partie C-terminale de la protéine WASP que l'on trouve dans le cytosol au contact de la membrane plasmique. La protéine WASP, associée à un monomère d'actine et au complexe Arp2/3 active la nucléation *de novo* de filaments d'actine. Ainsi, les "micropatterns WASP" constituent des zones de nucléation pour les filaments d'actine.

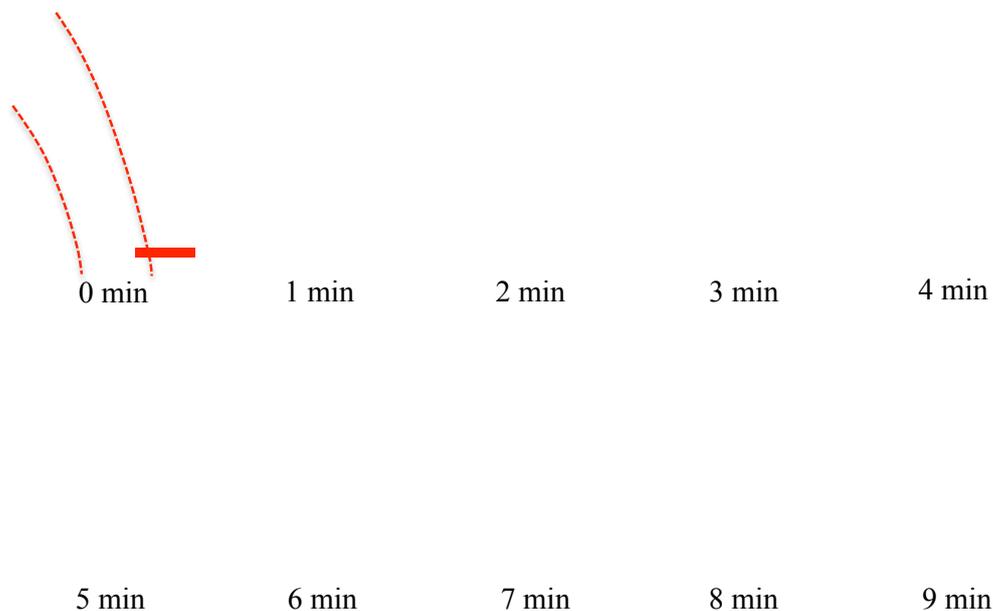


FIGURE 2.4 – Cinétique de polymérisation des filaments d'actine nucléés à partir d'un micropattern WASP. Temps en minutes. Barre d'échelle (rouge) = 5 μm . A $t=0$ min un mini-filament (ou "primer") rentre en contact avec la surface "micropatternnée" recouverte de peptides de la partie C-terminale de WASP. Cette surface est délimitée par les lignes en pointillé rouges sur l'image $t=0$ min. Imagerie : microscopie de fluorescence à onde évanescente (marquage des monomères d'actine par Alexa 568).

Un micropattern WASP engendre la création d'un réseau branché d'actine du type de ceux qu'on peut observer dans un lamellipode cellulaire (Figure 4). Un mini-filament (ou "primer") préexistant dans la solution vient au contact du micropattern WASP ($t=0$), cela active, sur le côté du mini-filament, la formation de complexes moléculaires réunissant chacun les trois protéines suivantes : Arp2/3 ; WASP ; monomère d'actine. Ce complexe moléculaire déclenche la nucléation *de novo* de filaments d'actine depuis le coté du mini-filament primer. Les nouveaux filaments polymérisent ensuite par leur extrémité barbée avec un angle de 70 degrés par rapport au primer. Tant que les filaments sont au contact du micropattern WASP, des branches continuent de se former sur le coté des filaments d'actine. Un réseau branché se constitue alors sur l'ensemble de la surface du "micropattern". Les filaments qui en sortent continuent de s'allonger par leur extrémité barbée mais sans créer de branche.



FIGURE 2.5 – Architecture d'actine reconstituée entre lame et lamelle. La géométrie du micropattern WASP est une bande de $5 \mu m$ de largeur (délimité par les deux lignes en pointillé rouge). En solution : Actine globulaire $2 \mu M$; Arp2/3 100 nM. Imagerie : microscopie de fluorescence classique (marquage des monomères d'actine par Alexa-488). (A) Réseau branché de filaments d'actine au contact du micropattern WASP. (B) Filaments d'actine parallèles à orientation identique. Les lignes en pointillé blanc délimitent l'extrémité barbée des filaments d'actine polymérisant vers l'extérieur du micropattern WASP.

La Figure 5 montre le type d'architecture d'actine obtenu à l'état stationnaire de la polymérisation des filaments d'actine issus d'un micropattern WASP en bande. Un réseau branché dense recouvre toute la surface du

"pattern" et les filaments qui en sortent s'auto-organisent en un réseau parallèle perpendiculaire aux lignes extérieures du "micropattern". Cette auto-organisation compacte est due à l'exclusion stérique que chaque filament d'actine impose à ses voisins. La reproductibilité des architectures d'actine générées par la technique du micropatterning WASP détaillée dans le *protocole 0* est excellente (Figure 6) .

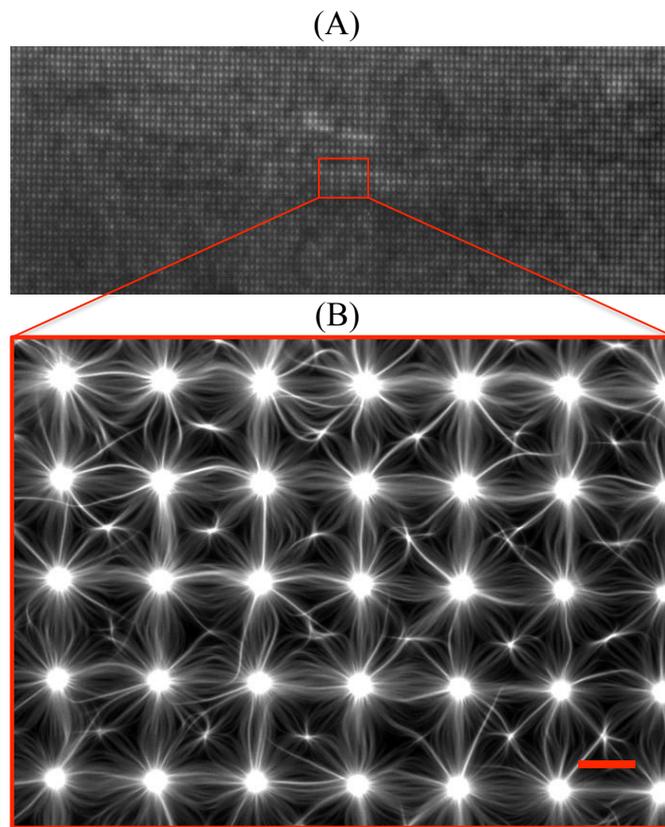


FIGURE 2.6 – Réseau d'actine reconstitué entre lame et lamelle. Le réseau de micropatterns WASP en disques est un réseau carré. L'intersection des filaments est de type antiparallèle. En solution : Actine globulaire $2 \mu M$, Arp2/3 100 nM . Imagerie : microscopie de fluorescence classique (marquages des monomères d'actine par Alexa 568). (A) Observation au grossissement 4x. (B) Zoom de la zone encadré en rouge au grossissement 40x. Barre d'échelle (rouge) = $20 \mu m$

On remarque que l'ordre géométrique des micropatterns (ici un réseau carré de disques) impose un ordre géométrique connexe aux structures d'actine générées. L'actine s'auto-organise en un réseau carré de filaments. Cela peut nous amener à penser que le contrôle de l'ordre géométrique des points de nucléation de l'actine sous la membrane cellulaire est d'une importance

cruciale pour organiser géométriquement le cytosquelette en fonction des sollicitations externes de tout ordre. Nous voyons que les filaments provenant des disques nucléateurs se connectent de façon antiparallèle, par conséquent nous serions curieux d'observer l'effet de moteurs moléculaires sur ce type de d'architecture cristalline.

Protocole 0 (cf. Annexes) :
Micropatterning WASP

Ce protocole est le point de départ de ma thèse. Nous l'utilisons tous au laboratoire et nous l'avons fait évoluer jusqu'à maintenant en termes de spécificité et de reproductibilité. Par spécificité j'entends la spécificité de nucléation des filaments d'actine sur les micropatterns et pas en dehors. Par reproductibilité j'entends la répétabilité des structures d'actine produites par les micropatterns. La spécificité et la reproductibilité étaient bien moins bonnes dans les premiers essais qu'à la fin de ma thèse.

L'amélioration de la spécificité dépend de nombreux facteurs. La concentration en profiline doit être suffisamment grande pour empêcher la nucléation en solution et suffisamment faible pour ne pas la bloquer complètement. La concentration d'actine doit être suffisamment faible pour ne pas qu'il y ait polymérisation en solution et suffisamment grande pour ne pas avoir à attendre trop longtemps pour que la réaction commence sur les micropatterns. L'état de la surface de PEG est aussi importante pour éviter que les agents nucléateurs ne s'y fixent pendant l'étape de coating de pWa. Les chaînes des PEG se dégradent avec le temps, il est donc préférable d'utiliser l'échantillon peu de temps après le coating de PEG. Le volume de la solution doit être ajusté avec précision : s'il est trop faible l'état stationnaire sera atteint trop rapidement, et s'il est trop grand la polymérisation en solution sera favorisée. Pour fixer la densité de pWa sur les micropatterns, le temps d'exposition aux ultra-violets du PEG à travers le masque en chrome est aussi important que la concentration en pWa lors du coating pWa. Plus cette densité sera grande, plus grand sera le nombre d'évènements de nucléation sur les micropatterns.

La reproductibilité s'est acquise au cours des années par l'amélioration de nombreux petits détails d'expérimentation. Le plaquage du masque en chrome sur la lamelle PEG, par exemple, est une étape critique pour la reproductibilité. Si le masque n'est pas assez proche de l'échantillon, il y a amplification du phénomène de diffraction et les micropatterns deviennent plus ronds et plus épais. Si le masque est bien plaqué, les patterns sont fins et les contours sont plus nets. Pour maintenir une bonne reproductibilité sur la géométrie des micropatterns il faut donc prendre toutes les précautions lors du plaquage du masque et de la lamelle PEG. Cette dernière doit être placée

au centre du masque, le vide doit être complet, c'est-à-dire qu'il ne doit pas y avoir de fuites d'air entre le masque et le porte-masque. La gestuelle avec laquelle la lamelle PEG est décollée du masque en chrome après l'insolation est critique dans le maintien d'une bonne reproductibilité de l'homogénéité du PEG et des micropatterns sur la surface de la lamelle. En effet, des parcelles de PEG peuvent s'arracher lors de cette étape.

2.1.3 Le guidage géométrique des filaments d'actine par la technique du "multipatterning"

Le micropatterning WASP consiste en une étape d'insolation aux UV d'une surface de PEG sur laquelle on peut venir greffer les peptides de WASP. Que se passe-t-il si on opère une deuxième étape d'insolation aux UV sur cette échantillon comprenant déjà des micropatterns WASP ? La Figure 7 révèle les résultats obtenus en suivant le *protocole 1*.

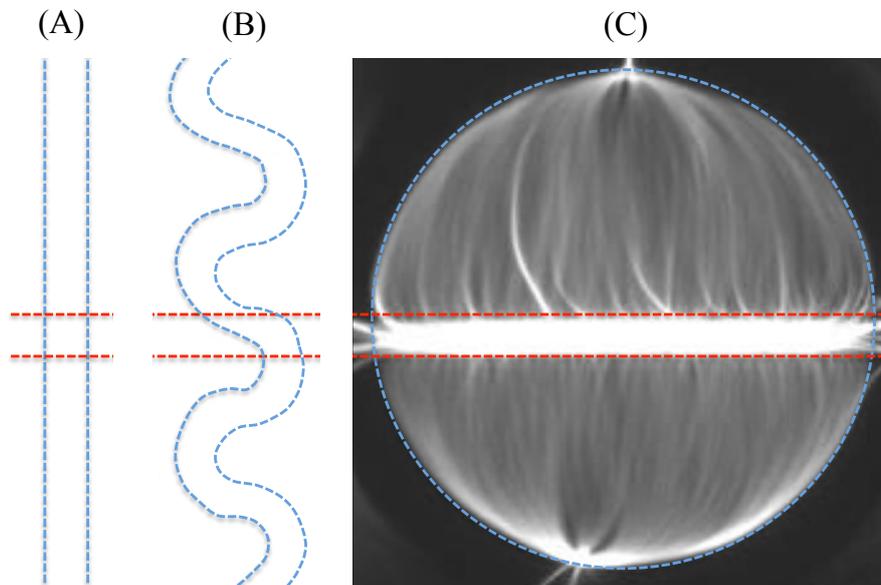


FIGURE 2.7 – "Multipatterning de guidage" des réseaux parallèles de filaments d'actine entre lame et lamelle. Les lignes en pointillé rouges délimitent les micropatterns WASP en bande de $5 \mu\text{m}$ de largeur. A l'extérieur des lignes en pointillé bleus résident des zones de PEG insolées aux UV 180 nm. A l'intérieur des lignes en pointillés bleus subsistent des zones de PEG intacte. Des résultats différents sont obtenus en utilisant différentes géométries de zones PEG insolées aux UV lors de la deuxième étape d'insolation : (A) Filaments perpendiculaires à la bande WASP. (B) Filaments en onde, de période fixe et d'axe principal perpendiculaire à la bande WASP. (C) Filaments compactés en un disque centré sur la bande WASP. Imagerie : microscopie de fluorescence classique (marquage des monomères d'actine par Alexa 568).

La frontière entre les zones de PEG non-insolées et les zones de PEG insolées aux UV constitue une barrière énergétique que les filaments d'actine en polymérisation ne peuvent franchir que s'ils se regroupent en câbles épais pour augmenter leur énergie mécanique et traverser la barrière. Pour les filaments d'actine il est plus favorable énergétiquement de polymériser de façon

individuelle sur les surfaces de PEG que de traverser la frontière PEG/PEG insolé. Les filaments sont contraints de s'allonger uniquement sur les zones de PEG non-insolé et d'éviter les zones de PEG insolé. De cette manière, nous avons créé une méthode de guidage des réseaux de filaments d'actine parallèles émanant des "micropatterns WASP".

Cette technique de guidage obtenue en suivant le *protocole 1* pourrait être utile par exemple pour interconnecter deux réseaux de filaments d'actine parfaitement parallèles l'un à l'autre et contenant le même nombre de filaments d'actine. Autrement dit : deux structures comme celle de la Figure 7A mises bout à bout et qui reconstitueraient, *in vitro*, le système moléculaire élémentaire des fibres musculaires, à savoir le sacromère. Ainsi, nous serions capables de reconstituer les sous-unités élémentaires d'une fibre de stress. En faisant intervenir des moteurs moléculaires sur de telles structures, nous pourrions analyser les propriétés de contractilité d'une fibre de stress en fonction de ses différents paramètres structuraux comme : la longueur des modules contractiles, la densité de filaments dans la fibre, le type de myosine, leur concentration, etc.

Protocole 1 (cf. Annexes) :

Multipatterning pour le guidage géométrique des réseaux parallèles de filaments d'actine à orientation identique

L'idée qui a donné lieu à ce nouveau protocole est d'avoir sur un même échantillon, des micropatterns pWa et d'autres micropatterns contenant d'autres protéines pouvant interagir avec l'actine. Pour réaliser ce protocole, il fallait que le peptide pWa et le PEG soit suffisamment résistant pour rester fonctionnel après deux étapes d'insolation comprenant chacune une étape de plaquage et de décollage de la lamelle PEG sur le masque. Il s'est avéré que c'était bien le cas. Pour faire coïncider la première série de micropatterns avec la deuxième série, on peut tourner la lamelle PEG de 90 degrés entre la première et la deuxième insolation, en ayant prévu l'emplacement des micropatterns pour chaque série, de façon à les faire coïncider perpendiculairement 7.

2.1.4 Le contrôle géométrique de la nucléation de l'actine par la technique du "micropatterning mDia"

L'un des travaux importants de ma thèse a été de mettre au point une technique de "micropatterning formine" : l'objectif étant de greffer, de façon géométriquement contrôlable, des formines sur une surface de PEG. Les premiers essais ont consisté à reproduire le protocole de "micropatterning WASP" en remplaçant les peptides de WASP par des formines mDia purifiées. Après un travail d'optimisation (chimie de surface, volumes et temps d'incubation, concentrations des protéines mises en jeu, échange Calcium/Magnésium, régulation précise du PH, etc.) j'en suis arrivé au *protocole 3* de "micropatterning mDia", accompagné du *protocole 2* mis au point précédemment par Didier Portran [136] :

Une étape clé de la mise au point du *protocole 3* a été de se rendre compte de ce que montre la Figure 8 ci-après.

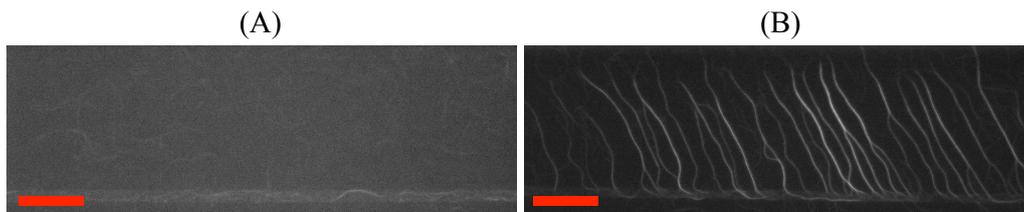


FIGURE 2.8 – Filaments d'actine en cours de polymérisation et issus d'un micropattern en bande contenant des formines mDia. Barre d'échelle = $20 \mu m$ pour (A) et (B). En solution entre lame et lamelle : actine globulaire $2 \mu M$, profiline $6 \mu M$. Imagerie : microscopie de fluorescence classique (marquage des monomères d'actine par Alexa 568). (A) Présence de noyaux d'actine (1 % des monomères d'actine) dans la solution mise au contact des micropatterns mDia. (B) Absence de noyaux d'actine dans la solution mise au contact des micropatterns mDia.

Si on applique le *protocole 3* sans noyaux d'actine dans la solution, on obtient des résultats du type Figure 8A. Avec une solution contenant 99 % de monomères d'actine et 1 % de noyaux préformés d'actine on obtient des résultats du type Figure 8B. Les formines mDia greffées sur les "micropatterns" nécessitent donc la présence de noyaux d'actine préformés en solution pour activer efficacement la polymérisation des filaments d'actine.

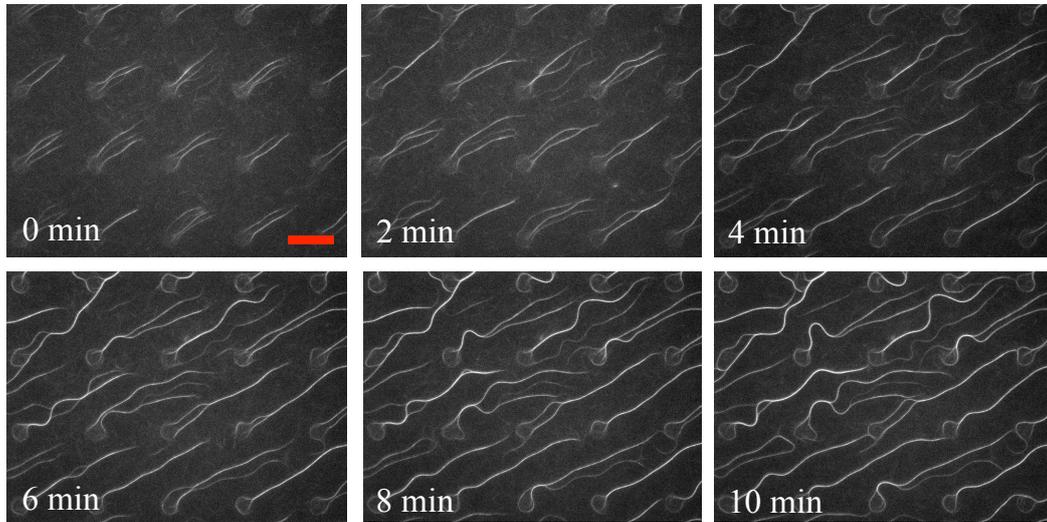


FIGURE 2.9 – Cinétique de polymérisation de filaments d’actine par des micropatterns mDia en disques. Temps en minutes. Barre d’échelle (rouge) = $30 \mu m$. En solution entre lame et lamelle : actine globulaire $1,2 \mu M$, profiline $6 \mu M$. Imagerie : microscopie de fluorescence classique (marquage des monomères d’actine par Alexa 568).

L’utilisation de micropatterns mDia en petits disques permet de mesurer la vitesse de polymérisation des filaments d’actine par les formines mDia présentes sur les micropatterns (Figure 9). La valeur moyenne de cette vitesse sur dix mesures est de 55 sous-unités monomériques d’actine par seconde, soit un taux d’élongation de $44 \mu M^{-1}.s^{-1}$. Cette valeur est en accord avec les mesures de vitesse de polymérisation de l’actine par la formine mDia en solution et sans micropattern [2, 59, 116, 141, 175]. On en conclue que les formines mDia greffées sur les "micropatterns mDia" dans les conditions décrites par le *protocole 3* sont parfaitement fonctionnelles. Le *protocole 3* constitue éventuellement une base pour le "micropatterning" d’autres types de formines.

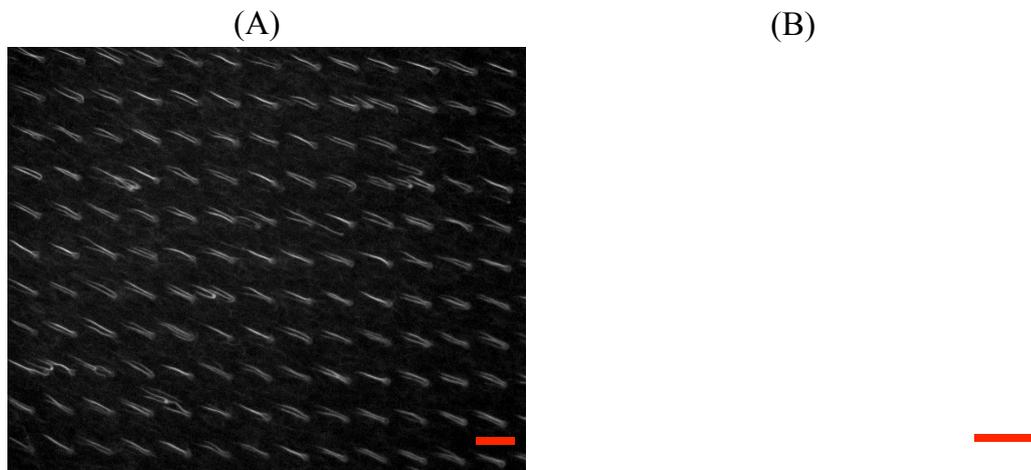


FIGURE 2.10 – Filaments d’actine polymérisant à partir de micropatterns mDia en disques (A) et en bandes (B). Barre d’échelle = $50 \mu m$ pour (A) et (B). En solution entre lame et lamelle : actine globulaire $2 \mu M$, profiline $6 \mu M$. Observation en microscopie de fluorescence classique (monomères d’actine marqués par Alexa 568).

La reproductibilité de la technique du micropatterning mDia est très bonne également (Figure 10). Les filaments d’actine polymérisent spécifiquement depuis les micropatterns mDia et leur vitesse de polymérisation est homogène sur l’ensemble de l’échantillon.

Protocole 2 (cf. Annexes) :

Dépôt d’une couche de Si-PEG 30 kDa sur une lamelle en verre

Ce protocole réalisé par Didier Portran, qui travaillait à la paillasse voisine durant deux ans, à été réalisé dans le but d’augmenter la spécificité de greffage des amorces de microtubules sur les micropatterns car le PLL-PEG n’était pas assez efficace pour cela. Après avoir développé ce protocole, nous avons pu constater que la spécificité était largement meilleure sur du SiPEG 30 kDa que sur du PLL-PEG. La raison de cette différence peut résulter du fait que le greffage du silane repose sur des liaisons covalentes alors que le greffage de la polylysine repose sur des liaisons électrostatiques. Les liaisons covalentes étant plus nombreuses que les liaisons électrostatiques, la densité de Si-PEG est plus importante que la densité de PLL-PEG et par conséquent les propriétés antiadhésives sont meilleurs sur le Si-PEG que sur le PLL-PEG. Lorsque j’ai fait mes premiers essais de coating mDia sur les micropatterns, la spécificité était aussi mauvaise que pour Didier avec les microtubules. A ce moment là il venait de terminer son protocole Si-PEG, je l’ai donc aussitôt utilisé et dès le premier essai nous avons observé une nette amélioration de la spécificité de fixation des formines mDia sur les micropatterns.

Protocole 3 (cf. Annexes) :
Micro-patterning mDia

Le premier point clé pour maîtriser ce protocole est le contrôle du PH de la solution. Il s'est avéré que les formines sur les micropatterns sont sensibles au PH à 0.5 près. Le PH doit être parfaitement à 7 pour que le maximum de formines soient fonctionnelles. Si ce dernier dépasse 7.5 ou est en dessous de 6.5, le nombre de formines fonctionnelles sur le micropattern chute dramatiquement. C'est pourquoi nous calibrons le PH de tous les composants de la solution un par un avant de commencer l'expérience. J'ai aussi observé que le PH influence la vitesse d'élongation des filaments par les formines. Il faut donc prêter une attention particulière au PH lorsqu'on manipule des protéines comme la formine.

Le deuxième point clé est la présence d'amorces de noyaux d'actine dans la solution. Avant de découvrir ce point clé, la solution contenait uniquement des monomères d'actine à 100 % complexés à la profiline, car la formine recrute les monomères d'actine s'il sont complexés à la profiline et, en plus de ça, la profiline inhibe la nucléation en solution et favorise donc la spécificité sur les micropatterns. En travaillant auparavant avec de l'actine fraîchement purifiée, qui contient moins de noyaux d'actine que de l'actine purifiée, nous nous sommes aperçus que l'efficacité des formines était moins bonne : moins il y a de noyaux d'actine dans la solution, moins de filaments d'actine sont allongés à partir des micropatterns, la quantité de filaments en solution étant toujours quasiment nulle dans les deux cas. Nous avons alors ajouté, à une solution de monomères d'actine complexés à la profiline, une quantité contrôlée de noyaux d'actine qui déclenchent l'activation des formines présentes sur le micropattern. Les formines ne semblent donc pas être de véritables nucléateurs de l'actine comme le complexe Arp2/3 mais plutôt des accélérateurs d'élongation des filaments.

La distance entre les micropatterns et la lame en verre est aussi très importante dans la façon dont les structures d'actine vont s'agencer à partir des micropatterns mDia. Plus cette distance est importante, plus les filaments pourront sortir des micropatterns par "buckling". Plus cette distance est faible, plus les filaments d'actine restent à l'intérieur des micropatterns, ce qui est indispensable pour former l'anneau de cytocinèse.

La vitesse d'élongation des filaments d'actine par la formine étant cinq fois plus grande que celle des filaments d'actine sans formines, l'expérience démarre très rapidement après avoir placé la solution entre lame et lamelle. Il est donc difficile d'observer le début de la réaction, notamment celle qui se déroule sur les micropatterns. On peut difficilement pallier à cette difficulté car si on diminue la concentration d'actine, il y a des chances que la longueur

des filaments à l'état stationnaire soit trop faible.

2.1.5 La cohabitation du complexe Arp2/3 et des formines

Dans le but de faire intervenir le complexe Arp2/3 et la formine mDia dans une même solution, nous avons suivi le protocole de micropatterning WASP (*protocole 0*) en remplaçant la solution de polymérisation par celle du protocole de micropatterning mDia (*protocole 3*). La Figure 11 ci-dessous montre les résultats obtenus.

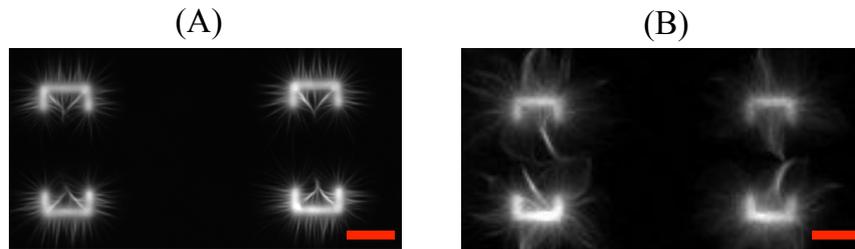


FIGURE 2.11 – (A) Architectures d’actine obtenues par la technique du micropatterning WASP. (B) Architectures d’actine obtenues par la technique du micropatterning WASP en utilisant la solution de polymérisation du *protocole 3*. (A) et (B) Imagerie : microscopie de fluorescence classique. Barre d’échelle = $20 \mu\text{m}$ pour (A) et (B).

Les architectures d’actine sont conservées et reproductibles dans le cas 11A comme dans le cas 11B, ce qui prouve que la formine mDia peut fonctionner normalement conjointement aux micropatterns WASP dans une solution unique. Nous avons alors réalisé une expérience préliminaire dans laquelle nous avons greffé la protéine WASP et la protéine mDia sur le même micropattern (Figure 12).

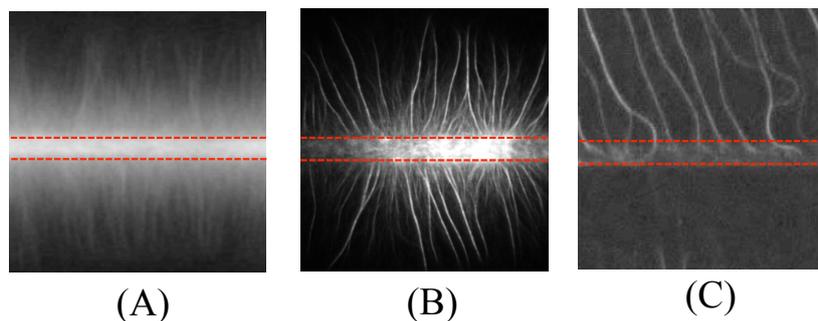


FIGURE 2.12 – (A) Micropatterning WASP. (B) Micropatterning WASP+mDia. (C) Micropatterning mDia. Le micropattern est dans les trois cas une bande de $5 \mu\text{m}$ de largeur.

Les résultats semblent indiquer que la formation de cables d'actine, dans un réseau branché, provient exclusivement de l'activité des formines, mais l'expérience ayant été réalisée sur un seul échantillon, nous ne pouvons confirmer l'hypothèse.

2.1.6 La reconstitution de l'anneau de cytokinèse par la technique du "micropatterning mDia"

En créant des micropatterns mDia en forme de cercles épais, on obtient les résultats suivants (Figure 13).

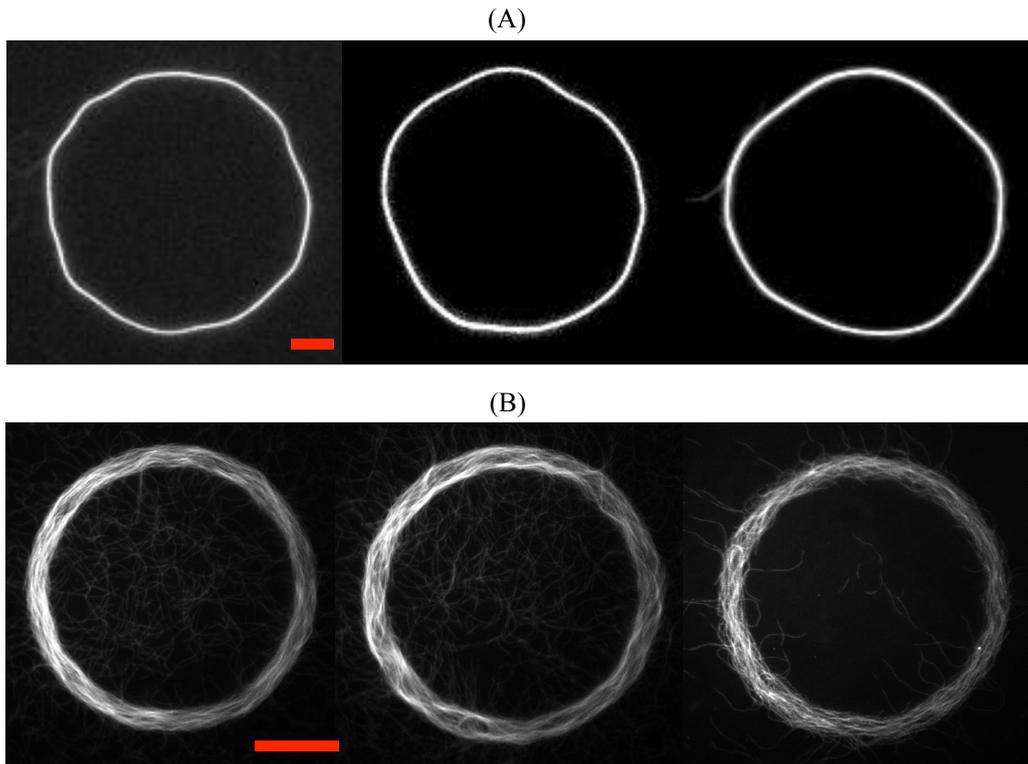


FIGURE 2.13 – Filaments d'actine à l'état stationnaire de leur polymérisation nucléés par des micropatterns mDia en cercles épais. En solution entre lame et lamelle : actine globulaire $2 \mu M$; profiline $6 \mu M$. Imagerie : (A) microscopie de fluorescence classique. (B) microscopie de fluorescence à onde évanescente. (A) et (B) monomères d'actine marqués par Alexa 568. Barre d'échelle = $10 \mu m$ pour (A) et (B).

Les formines réparties de façon homogène sur un micropattern en cercle épais activent l'élongation des filaments d'actine qui s'organisent alors aléatoirement de façon parallèle ou antiparallèle en suivant la courbure du cercle. La barrière énergétique créée par la présence des chaînes de PEG en dehors des "micropatterns" suffit à empêcher les filaments d'actine de polymériser à l'extérieur des micropatterns. Par conséquent, la densité de filaments augmente tout au long de leur polymérisation par les formines. A l'état stationnaire de la polymérisation, l'architecture obtenue est un anneau de filaments d'actine parallèles et de polarité aléatoire, comme dans l'anneau de cytokinèse

in vivo. Une fois formé, l’anneau peut se contracter sous l’action des moteurs moléculaires. Pour tester la contractilité *in vitro*, nous ajoutons la myosine VI à la composition de la solution de polymérisation en suivant le *protocole 4*.

Protocole 4 (cf. Annexes) :

Contraction, entre lame et lamelle, de l’anneau de cytotcinèse in vitro par la myosine VI

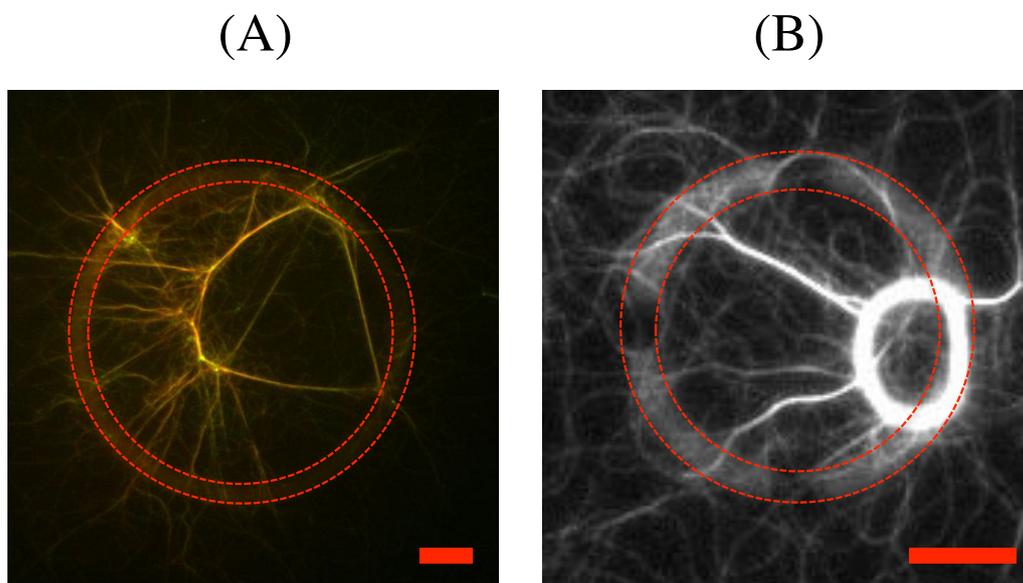


FIGURE 2.14 – Résultat de l’action des myosines VI sur un anneau de filaments d’actine parallèles nucléés par des formines mDia sur un micropattern en cercle épais (délimité par les lignes en pointillées rouges). Barre d’échelle = $10 \mu m$ pour (A) et (B). Solution entre lame et lamelle : actine globulaire $2 \mu M$; profiline $6 \mu M$; Myosine VI $10 nM$. (A) Observation de la fluorescence des monomères d’actine marqués par Alexa 568 (couleur rouge) et de la fluorescence des myosines VI marquées par GFP (couleur verte). Imagerie : microscopie de fluorescence à ondes évanescentes. (B) Observation de la fluorescence des monomères d’actine marqués par Alexa 488 (couleur blanche). Imagerie : microscopie de fluorescence classique.

On observe alors que le câble circulaire d’actine que l’on appelle anneau de cytotcinèse *in vitro* se contracte sous l’action biomécanique des myosines VI (Figure 14). Cependant des imperfections persistent : dans la plupart des expériences menées, la contraction n’est pas efficace. Les filaments d’actine sont mis sous tension entre eux par les myosines VI dès le début de leur polymérisation par les formines, ce qui a pour effet d’effiloche le câble d’actine

circulaire avant que celui-ci soit suffisamment homogène et compact pour se contracter correctement (Figure 15). Autrement dit, les myosines VI font coulisser les filaments d'actine entre eux au lieu de contracter de façon homogène l'ensemble du câble circulaire d'actine. La contraction peine donc à se faire.

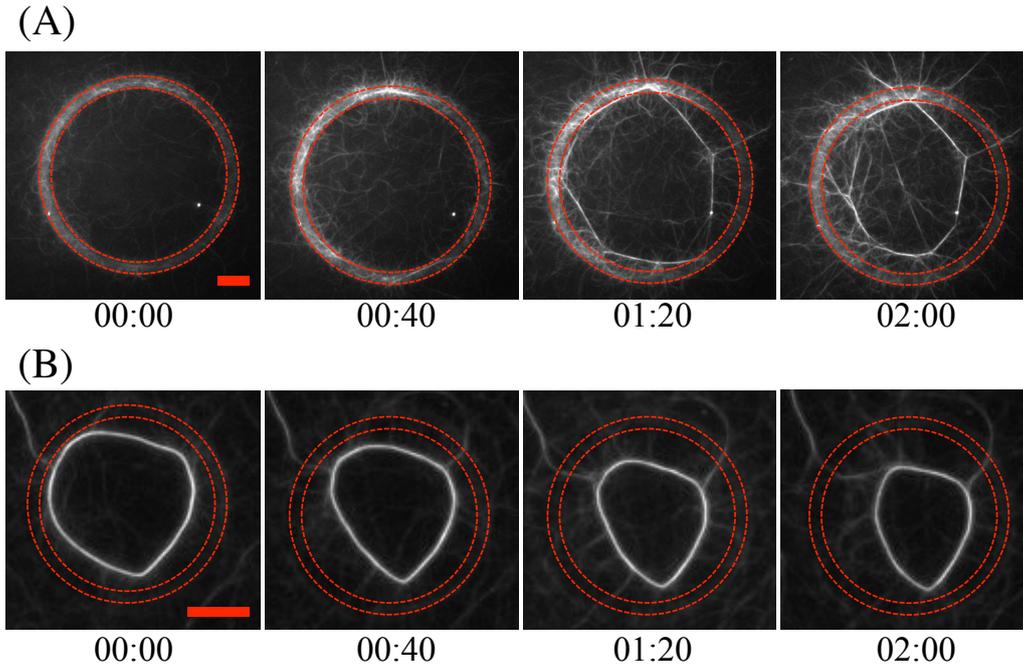


FIGURE 2.15 – Cinétique de l'action des myosines VI sur un anneau de filaments d'actine parallèles nucléés par des formines mDia sur un micropattern en cercle épais (délimité par les lignes en pointillées rouges). Temps en heures : minutes. Barre d'échelle = $10 \mu m$ pour (A) et (B). Solution entre lame et lamelle : actine globulaire $2 \mu M$; profiline $6 \mu M$; myosine VI 10 nM . Observation de la fluorescence des monomères d'actine marqués par Alexa-488 (couleur blanche). (A) Imagerie : microscopie de fluorescence à ondes évanescentes, (B) Imagerie : microscopie de fluorescence classique.

Les anneaux qui se forment à partir des micropatterns mDia en cercle mettent au moins 15 minutes pour atteindre une structure homogène en terme de densité de filaments d'actine. Or, dans les expériences que nous menons entre lame et lamelle, les myosines commencent à exercer leur travail dès le début de l'expérience sur des structures qui comportent encore d'importantes asymétries de densité de filaments d'actine. Nous sommes donc dans le cas (a) décrit par la Figure 16 ou l'anneau d'actine ne peut se contracter jusqu'au bout. Pour être dans le cas (b), qui est le cas *in vivo*, il faudrait faire intervenir les moteurs moléculaires à l'état stationnaire de la polymérisation

de l'actine : c'est-à-dire au moment où la densité surfacique des filaments d'actine est suffisamment importante pour former un anneau composé de filaments d'actine répartis de façon homogène sur toute la surface du micro-pattern circulaire.

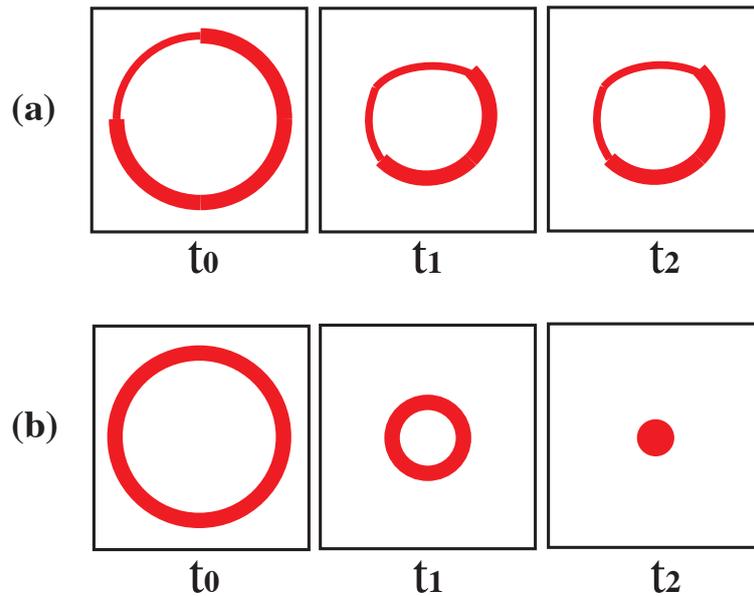


FIGURE 2.16 – Cinétique de contraction d'un anneau de filaments d'actine à orientation aléatoire par des moteurs moléculaires intervenant à partir du temps t_0 sur : (a) Un anneau de filaments d'actine comportant une asymétrie circulaire de densité de filaments (la partie moins épaisse du cercle correspond à une partie moins dense en filaments) ; (b) Un anneau de filaments d'actine ne comportant pas d'asymétrie circulaire de densité de filaments.

Nous avons alors testé, en simulation numérique, l'influence du temps d'intervention des myosines VI sur un anneau de filaments d'actine en cours de polymérisation (Figure 17).

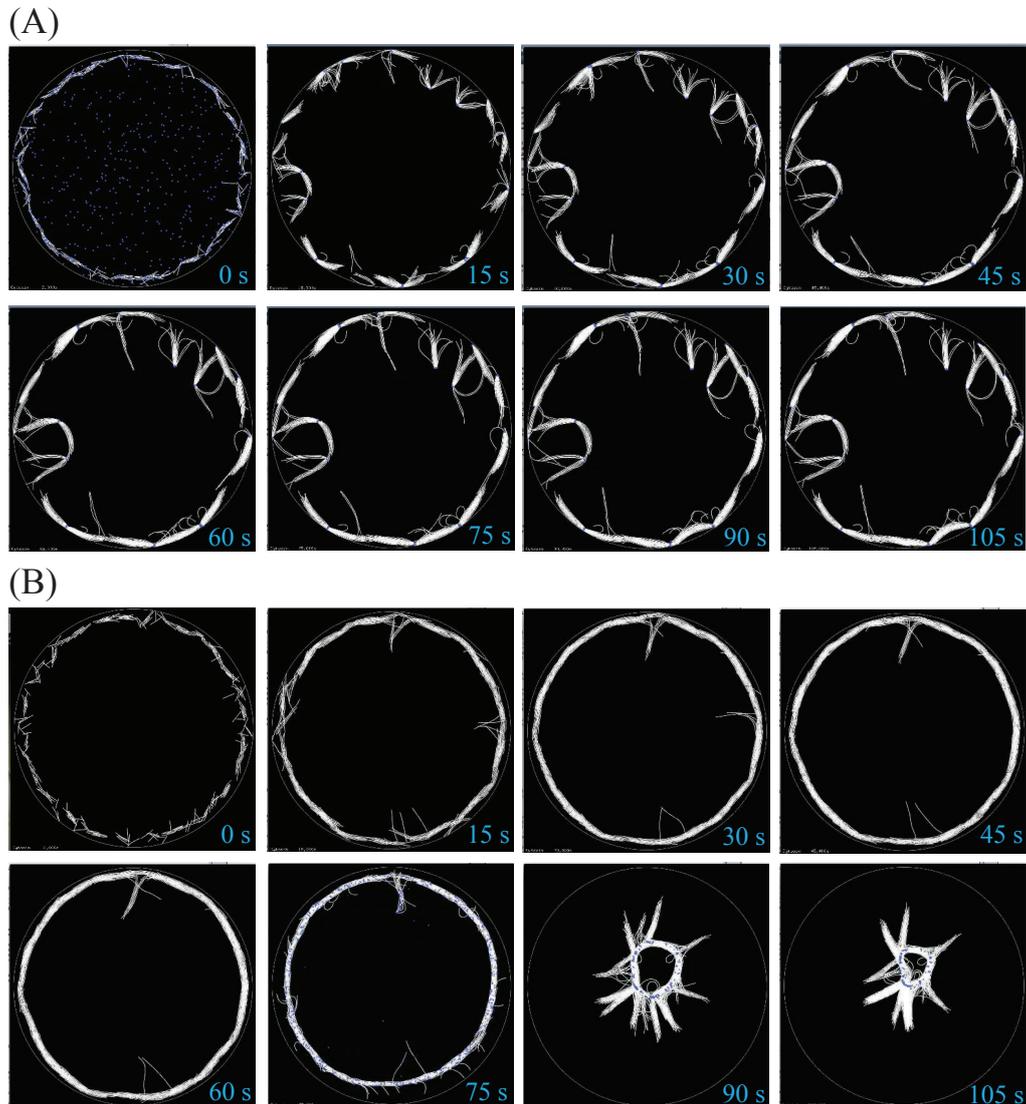


FIGURE 2.17 – Simulation numérique en deux dimensions réalisée avec le programme Cytosim : (A) et (B) Cinétiques d'élongation de filaments d'actine polymérisant pas leur extrémité barbée fixée sur un "micropattern" virtuel. Dans le cas (A) les myosines interviennent au $t = 0$. Dans le cas (B) les myosines interviennent au temps $t = 70$ secondes. Dans les cas (A) et (B) La densité surfacique d'extrémités barbées polymérisant sur le "micropattern", la concentration initiale en monomères d'actine et la concentration de myosines VI sont identiques.

Ces simulations nous montrent que si les moteurs moléculaires interviennent au début de la formation de l'anneau de cytotinèse, celui-ci ne peut se contracter. Si les moteurs interviennent quelques temps après, et c'est ce qu'il se passe dans les cellules, l'anneau se contracte complètement. Les simu-

lations devront aussi être faites en remplaçant la myosine VI par la myosine II impliquée dans la cytokinèse, ces deux moteurs moléculaires n'ayant pas le même mode de fonctionnement (Figure 18).

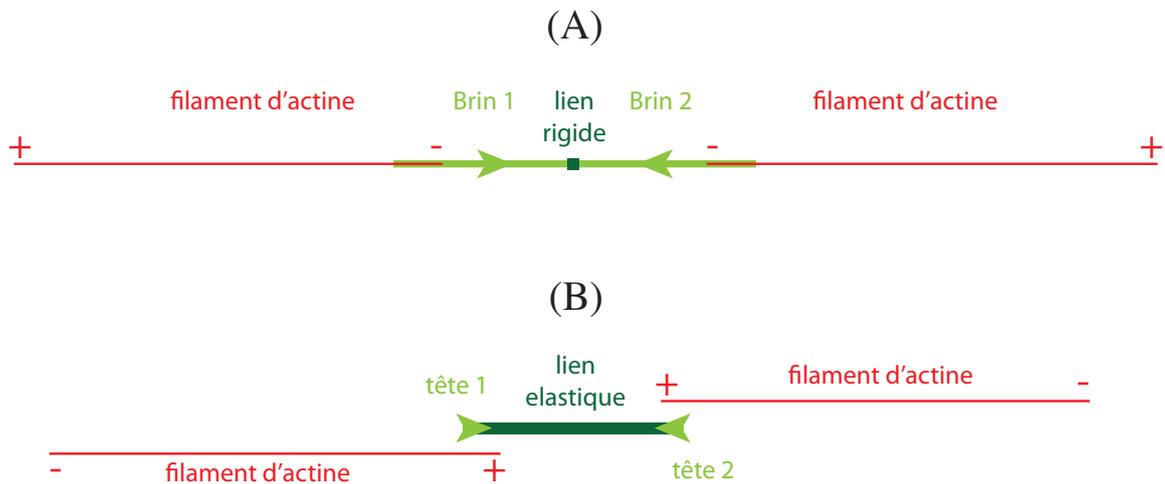


FIGURE 2.18 – (A) Arrangement spatial d'un double brin de myosine II avec les filaments d'actine. (B) Arrangement spatial d'une myosine VI avec les filaments d'actine. Les flèches vertes indiquent la direction des forces exercées par les myosines sur les filaments d'actine. L'extrémité barbée des filaments d'actine est indiquée par le signe + et l'extrémité pointue par le signe - .

Le micropatterning mDia rend possible le contrôle des paramètres clés dans l'organisation structurale de l'anneau de cytokinèse *in vitro*. En modifiant la concentration des formines sur le micropattern, on peut modifier la densité de filaments d'actine dans l'anneau. En jouant sur la géométrie des micropatterns, on peut faire varier l'épaisseur et le diamètre de l'anneau. L'observation des modifications de ces paramètres spatiaux sur les propriétés contractiles de l'anneau de cytokinèse nous permettra de déterminer dans quelle mesure chacun des paramètres agit en faveur ou en défaveur de la contraction.

Quant aux paramètres temporels, nous n'en avons aucun contrôle tant que nous travaillons sur des expériences entre lame et lamelle. En effet, entre lame et lamelle, le système est fermé. La composition des constituants de la solution reste inchangée du début à la fin de l'expérience, leur concentration diminue et le système atteint rapidement un état stationnaire. Pour obtenir un contrôle temporel de la séquence d'intervention des partenaires protéiques sur l'anneau de cytokinèse, nous n'avons pas d'autre choix que d'utiliser la microfluidique.

2.1.7 conclusion

Par des adaptations et des évolutions de la technique du micropatterning, nous avons montré comment le contrôle géométrique des protéines de nucléation de l'actine permet d'orienter l'organisation spatiale des filaments d'actine et générer les architectures complexes que l'on peut observer dans la cellule. Dans la suite de la démarche bottom-up, les protéines associées au cytosquelette d'actine doivent être ajoutées une à une afin de déterminer leurs effets respectifs sur le remodelage des architectures d'actine reconstituées. Pour cela, il faut avoir accès au contrôle temporel de la concentration des constituants biochimiques présents dans la solution. Ceci est l'objet de la section suivante.

2.2 Contrôle temporel du micro-environnement biochimique des systèmes d'actine reconstitués *in vitro*

2.2.1 La microfluidique

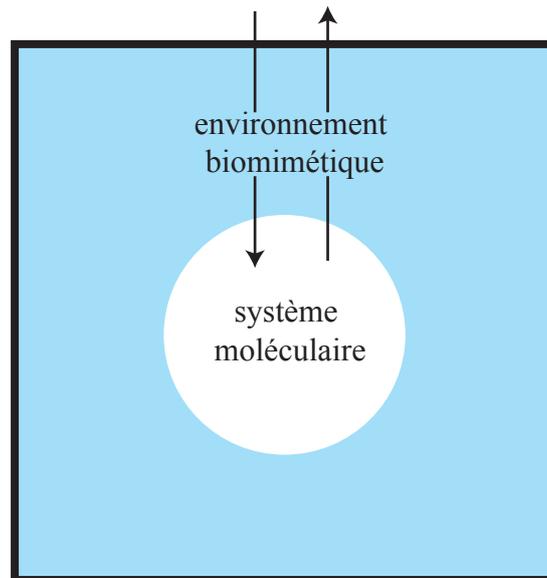


FIGURE 2.19 – Microfluidique et SMRIV. Les flèches indiquent que le SMRIV s'organise en fonction des constituants importés ou exportés entre l'extérieur et l'intérieur de l'environnement biomimétique par des échanges microfluidiques.

Le principe de la microfluidique pour un système biomoléculaire *in vitro* est de renouveler, dans le temps, le micro-environnement biochimique du système afin de recréer les équilibres dynamiques par lesquels il évolue *in vivo*.

Théorie

La microfluidique, qui est née de la microélectronique il y a maintenant quinze ans [42], permet de manipuler les éléments fluides dont la taille est de l'ordre de grandeur du micromètre. A cette échelle, qui est celle de la cellule et des macromolécules qui la composent, ce ne sont plus les lois de l'hydrodynamique qui s'appliquent mais celles de la microhydrodynamique pour lesquelles la diffusion peut être prépondérante sur l'inertie dans le mouvement des particules fluides. Voici les bases mathématiques de la diffusion et de la microhydrodynamique [155, 160].

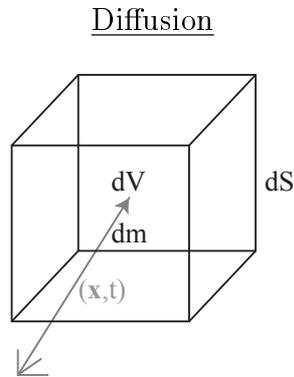


FIGURE 2.20 – \mathbf{x} : vecteur position spatiale. A l'instant t et au point \mathbf{x} , l'élément de volume dV délimité par la surface dS contient une masse dm de diffuseurs.

Considérons une masse dm de diffuseurs (molécules, complexes moléculaires) dans un volume dV de fluide délimité par la surface dS . On définit leur concentration massique au point \mathbf{x} et à l'instant t par :

$$C(\mathbf{x}, t) = \frac{dm}{dV} \quad (2.1)$$

Le flux diffusif de molécules au point \mathbf{x} et au temps t est défini par la loi de Fick :

$$\mathbf{J}(\mathbf{x}, t) = -D\nabla C(\mathbf{x}, t) \quad (2.2)$$

Avec :

\mathbf{J} : vecteur flux de molécules. $[M.T^{-1}.L^{-2}]$

D : coefficient de diffusion moléculaire. $[L^2.T]$

Le coefficient de diffusion moléculaire D peut s'exprimer par la relation de Stokes-Einstein de la façon suivante :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi R\mu} \quad (2.3)$$

Avec :

k : constante de Boltzmann

T : température du fluide $[\Theta]$

μ : viscosité dynamique du fluide $[M.L^{-1}.T^{-1}]$

R : Rayon de la molécule considérée $[L]$

Cette expression permet d'estimer, souvent à mieux que 30 % près, le coefficient de diffusion d'une molécule à partir de son rayon R .

Microhydrodynamique

A l'échelle macroscopique et pour les fluides Newtoniens, l'hydrodynamique est décrite par l'équation de Navier-Stokes de la quantité de mouvement ci-dessous :

$$\rho \frac{D\mathbf{u}}{Dt} = -\mathbf{grad}p + \mu\Delta\mathbf{u} + \mathbf{F} \quad (2.4)$$

Avec :

ρ : masse volumique du fluide [$M.L^{-3}$]

μ : viscosité dynamique du fluide [$M.L^{-3}.T^{-1}$]

\mathbf{u} : vecteur vitesse de l'écoulement du fluide [$L.T^{-1}$]

p : pression [$M.L^{-1}.T^{-2}$]

\mathbf{F} : vecteur force extérieure par unité de volume [$M.T^{-2}.L^{-2}$]

L'opérateur D/Dt est la dérivée matérielle dont l'expression s'écrit en notation indicelle :

$$\frac{D}{Dt} = \frac{\partial}{\partial t} + u_j \frac{\partial}{\partial x_j} \quad (2.5)$$

où, suivant la notation d'Einstein, il y a sommation sur l'indice répété (noté j). En suivant également la notation d'Einstein pour l'ensemble de l'équation (2.4), on obtient l'expression suivante :

$$\rho u_j \frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \rho \frac{\partial u_i}{\partial t} = -\frac{\partial p}{\partial x_i} + \mu \frac{\partial^2 u_i}{\partial x_j^2} + \rho F_i \quad (2.6)$$

où, rappelons-le, u_i est la composante de la vitesse d'écoulement du fluide selon l'axe i , p est la pression et F_i la composante de la force volumique extérieure selon l'axe i .

$\rho u_j \frac{\partial u_i}{\partial x_j}$ est le premier terme d'inertie dont l'ordre de grandeur est $\frac{\rho U^2}{L}$
 $\rho \frac{\partial u_i}{\partial t}$ est le deuxième terme d'inertie dont l'ordre de grandeur est $\frac{\rho U}{\tau}$
 $\frac{\partial^2 u_i}{\partial x_j^2}$ est le terme visqueux dont l'ordre de grandeur est $\frac{\rho U}{L^2}$

U est la vitesse typique de l'écoulement, L est l'échelle de variation caractéristique de la vitesse d'écoulement et τ est le temps caractéristique de variation de la vitesse.

Le rapport du premier terme d'inertie sur le terme visqueux est ce qu'on appelle le nombre de Reynolds :

$$Re = \frac{UL}{\nu} \quad (2.7)$$

Le rapport du second terme d'inertie sur le terme visqueux est :

$$\frac{L^2}{\tau\nu} \quad (2.8)$$

Les systèmes biologiques qu'on manipule sont microscopiques : cellules ($\approx 15 \mu m$) ; filaments d'actine ($\approx 8 \text{ nm}$ de d'épaisseur). Par conséquent, pour avoir un contrôle précis des forces hydrodynamiques sur de tels systèmes, il convient d'utiliser des microsystèmes artificiels mettant en oeuvre des conduites de taille micrométrique ou sub-micrométriques dans lesquelles s'écoulent les fluides : les systèmes microfluidiques. Dans ces systèmes miniaturisés, $Re \ll 1$ et $L^2/\tau\nu \ll 1$ (si on considère que τ n'est pas beaucoup plus petit que le temps de retournement L/U qui constitue le temps naturel de l'écoulement). Ce qui veut dire que, dans l'équation de Navier-Stokes de la quantité de mouvement, les deux termes d'inertie sont négligeables devant le terme visqueux. L'équation (2.4) s'écrit donc de la façon suivante :

$$-\mathbf{grad}p + \mu\Delta\mathbf{u} + \mathbf{F} = 0 \quad (2.9)$$

Les lois de l'hydrodynamique deviennent celles de la microhydrodynamique. Les écoulements régis par cette équation possèdent les propriétés remarquables suivantes :

- Linéarité : Les solutions de l'équation sont linéaires en la vitesse de l'écoulement.

- Réversibilité : Changer t en $-t$ ne modifie pas l'équation. De manière équivalente, changer \mathbf{u} en $-\mathbf{u}$ sur les frontières de l'écoulement inverse la vitesse partout dans l'écoulement.

- Unicité : La solution de l'équation est unique, il ne peut donc y avoir de bifurcations de solution permettant, par exemple, l'apparition d'instabilités hydrodynamiques. Un fluide circulant dans une conduite micrométrique s'écoule de façon parfaitement laminaire de la même manière qu'un fluide de même nature mais de viscosité beaucoup plus importante s'écoulerait dans une conduite macrométrique géométriquement identique.

advection/diffusion

Un nombre important dans les écoulements microfluidiques pour lesquels advection et diffusion cohabitent est le nombre de Peclet défini par :

$$Pe = \frac{UL}{D} \quad (2.10)$$

où U est la vitesse typique de l'écoulement, L est la taille caractéristique du système et D est le coefficient de diffusion.

Tout comme le nombre de Reynolds mesure l'importance relative des termes inertiels vis-à-vis des termes visqueux, le nombre de Peclet mesure l'importance relative des termes d'advection vis-à-vis des termes de diffusion. Nous avons vu que plus le nombre de Reynolds est petit, plus l'influence de la viscosité est prépondérante sur le mouvement des particules fluides par rapport à l'inertie. De la même manière, plus le nombre de Peclet est petit, plus l'influence de l'agitation thermique est prépondérante sur le mouvement des particules fluides par rapport à l'advection. La mesure du nombre de Peclet dans un système microfluidique permet d'obtenir rapidement un ordre de grandeur sur la balance entre l'advection et la diffusion.

Moyens

La microfluidique permet à l'expérimentateur d'introduire, de façon contrôlée dans le temps, de nouveaux composés biochimiques dans l'environnement biomimétique des systèmes biomoléculaires reconstitués *in vitro*. Pour cela, deux moyens sont possibles :

Le premier moyen consiste à renouveler la solution biochimique en générant un flux hydrodynamique. Pour les études du filament d'actine individuel, il faut trouver le moyen de fixer le filament à la surface de l'échantillon par une de ses extrémités, celui-ci s'orientant alors dans la direction des lignes de courant [69]. Le filament d'actine n'est donc pas thermodynamiquement libre et les forces de friction exercées sur sa surface peuvent induire des changements de conformation qui n'existent pas *in vivo*. Aussi, le filament individuel est la seule unité constitutive qui a été étudiée sous flux car c'est une structure unidimensionnelle : les architectures d'actine géométriquement plus complexes que le filament individuel sont bidimensionnelles ou tridimensionnelles et, par conséquent, sont susceptibles d'être perturbées ou détruites par les forces de cisaillement du flux hydrodynamique [68].

Le deuxième moyen est de créer des zones microfluidiques sans flux alimentées par des canaux dans lesquels il y a du flux. De cette manière les

systèmes biomoléculaires fragiles peuvent être protégés des contraintes hydrodynamiques tout en étant alimentés en composés biochimiques par diffusion depuis les canaux à flux adjacents. A l'heure actuelle, il existe un seul système microfluidique utilisant la diffusion pour contrôler l'environnement biochimique des systèmes d'actine reconstitués *in vitro*. Il s'agit du travail de Thomas Pfohl [39] qui lui a permis d'observer le phénomène de réversibilité entre les filaments d'actine individuels et leur association en câbles, par ajouts et retraits successifs de Mg^{2+} dans une chambre microfluidique à géométrie d'exclusion de flux.

La majorité des travaux de développement sur les systèmes microfluidiques qui visent à protéger les systèmes biologiques des forces créées par le flux hydrodynamique a été réalisée pour la culture cellulaire. Tout au long de ma thèse je me suis inspiré de ces systèmes pour concevoir le mien. Il m'est apparu que ces systèmes peuvent être classés selon trois catégories : les systèmes microfluidiques à faible réduction de flux, les systèmes microfluidiques à forte réduction de flux et les systèmes microfluidiques sans flux. L'ensemble de ces systèmes vise à réduire le flux au maximum, en intégrant ceux-ci dans un dispositif le moins complexe possible.

Parmi les systèmes à faible réduction de flux, il y a :

- Les gouttes [16, 17]. sont de volume contrôlé, leurs déplacements sont contrôlés électriquement, ce qui permet leur rencontre et leur fusion. De cette manière les mélanges de solution se font bien mais les flux sont conséquents lors des fusions du fait de la présence des tensions de surface (Figure 21).

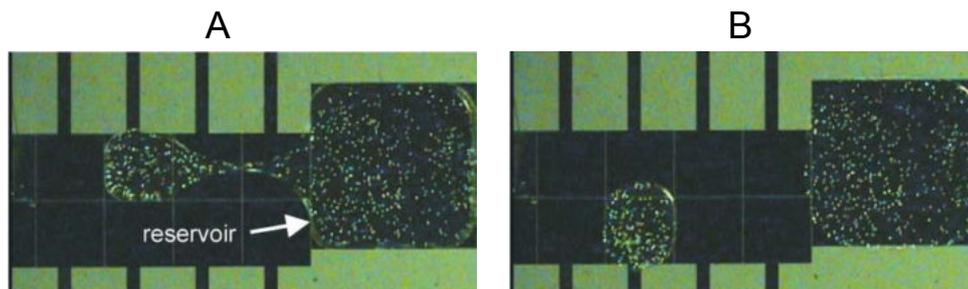


FIGURE 2.21 – Les électrodes carrés (noires) contrôlent la position des gouttes qui contiennent les objets biologiques. Une goutte peut se désolidariser du réservoir (A) puis se déplacer vers un autre site pour interagir avec une autre goutte (B).

Autrement que par le contrôle électrique, la force de capillarité des gouttes peut être utilisée pour compenser leur poids et ainsi former des petits réservoirs pour la culture cellulaire [110] (Figure 22). Pour modifier le micro-

environnement des cellules, il suffit d'utiliser une simple pipette. Par contre les cellules ne sont pas complètement protégées du flux et l'évaporation des gouttes est très difficile à maîtriser.

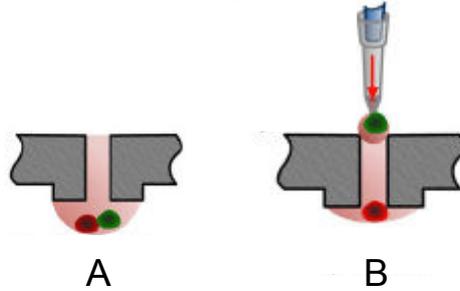


FIGURE 2.22 – A : Une goutte en suspension contenant 2 cellules. B : Une pipette peut prélever une cellule individuelle dans son milieu de culture.

- Les pièges à cellules [40, 43, 44, 60, 80, 85, 92, 97, 144, 152, 191]. Dans ces systèmes, les cellules chariées par le flux sont piégées individuellement dans le creux de structures en forme de "U" (Figure 23A) ou dans des aspérités des parois des canaux (Figure 23B) ou encore dans des étranglements de canal (Figure 23C).

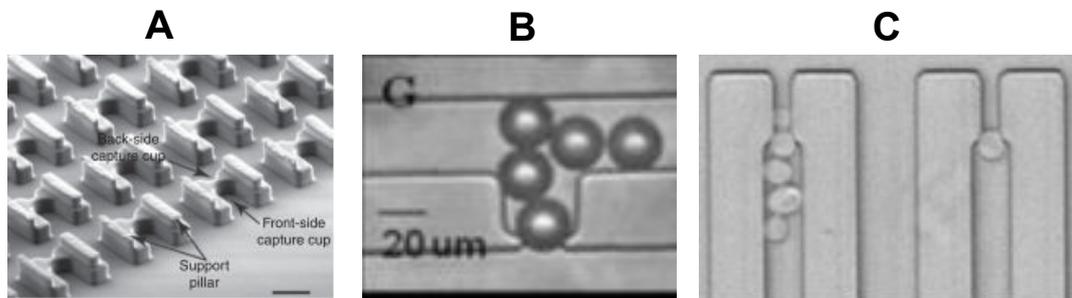


FIGURE 2.23 – A : Pièges à cellules individuelles orientées face au flux. B : Piège à cellules individuelles orientées de façon perpendiculaire au flux. C : Piège à cellules individuelles alignées dans le flux.

- Les barrières à flux [12, 125, 167, 187, 192]. Les barrières à flux séparent les canaux d'alimentation de la zone qui contient les objets biologiques. Elles limitent partiellement le flux provenant des canaux d'alimentation vers la zone d'observation des objets biologiques (Figure 24).

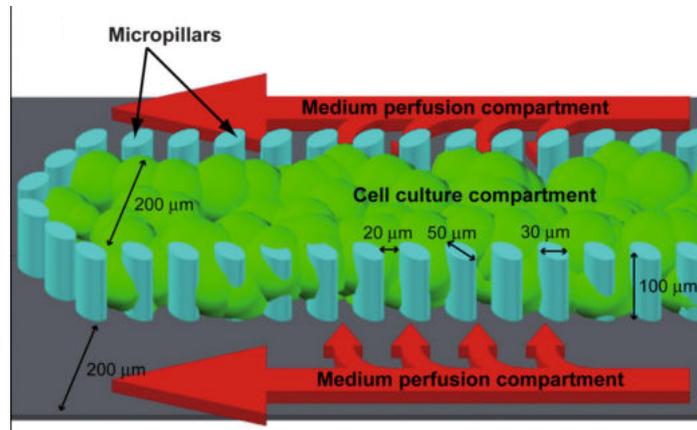


FIGURE 2.24 – A l’intérieur des barrières se trouvent les cellules en culture et à l’extérieur des barrières se trouvent deux canaux dans lesquels s’écoulent un flux de milieu nutritif. Le milieu nutritif s’écoule lentement à travers les barrières pour nourrir les cellules.

Les systèmes à faible réduction de flux permettent de contrôler très rapidement et très efficacement le micro-environnement biochimique mais imposent de trop grandes forces hydrodynamiques aux objets biologiques étudiés et par conséquent sont peu adaptés aux systèmes d’actine reconstitués.

Parmi les systèmes à forte réduction de flux, il y a :

- Les micropuits [31, 50, 51, 74, 79, 93, 105, 108, 127, 142] qui sont sûrement les plus utilisés. Ce sont tout simplement des creux rectangulaires sur les bords d’un canal droit (Figure 25).

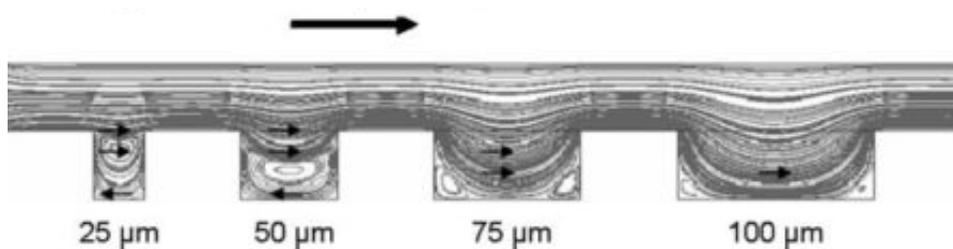


FIGURE 2.25 – Lignes de courant dans un canal contenant des puits. La grande flèche noire indique la direction du flux dans le canal principal et les petites flèches indiquent la direction du flux dans les puits. La largeur des puits est, de gauche à droite, 25, 50, 75, 100 μm .

- Les circuits à géométries d'écartement des lignes de courant [10, 78, 84, 109, 112]. Ce sont tout simplement des élargissement des canaux microfluidiques (Figure 26).

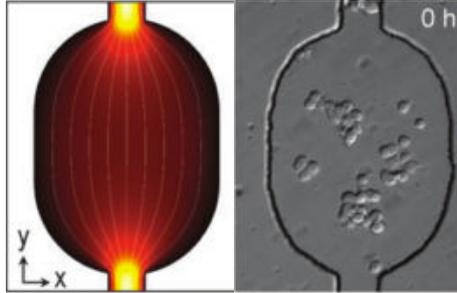


FIGURE 2.26 – A gauche, une représentation de la vitesse du fluide dans un élargissement de canal, les couleurs sombres sont les basses vitesses et les couleurs claires sont les hautes vitesses. A droite, un cliché en microscopie à contraste de phase de cellules en culture dans l'élargissement de canal.

Les systèmes à forte réduction de flux sont très simples et permettent de contrôler efficacement le micro-environnement biochimique mais ne permettent pas encore de diminuer le flux jusqu'à zero, il y a toujours un flux résiduel au fond des puits comme au centre des géométries élargies. Un filament d'actine individuel par exemple est trop fragile pour ces flux résiduels.

Parmi les systèmes sans flux :

- Les dispositifs intégrant des hydrogels [36, 63, 100, 145, 148, 183] sont efficaces mais ils sont longs (en temps) et délicats dans leur mise en oeuvre (Figure 27) et il est évident que les systèmes bio-moléculaires n'ont pas le même comportement dans un hydrogel que dans une solution aqueuse.

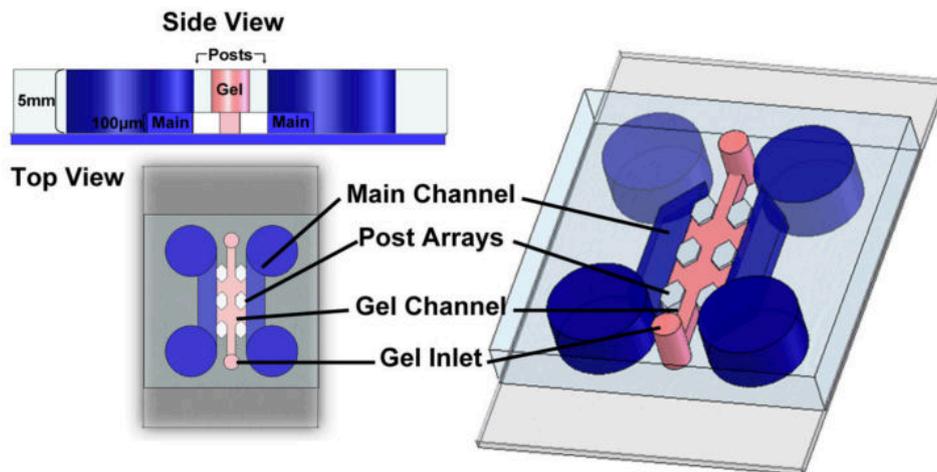


FIGURE 2.27 – Les cellules sont contenues dans un gel central (rose) et sont alimentées par du milieu de culture, par des canaux adjacents (bleus).

- Les dispositifs à membrane [32, 76, 115, 173, 174] séparant la zone d'alimentation à flux de la zone sans flux contenant les objets biologiques (Figure 28). Ce genre de dispositif est également délicat au montage et les membranes que l'on trouve actuellement sur le marché ne sont perméables qu'aux petites molécules comme les gazs ou les facteurs de croissance. Au contact de la membrane, une protéine comme le complexe Arp2/3 a de grandes chances d'être dénaturée.

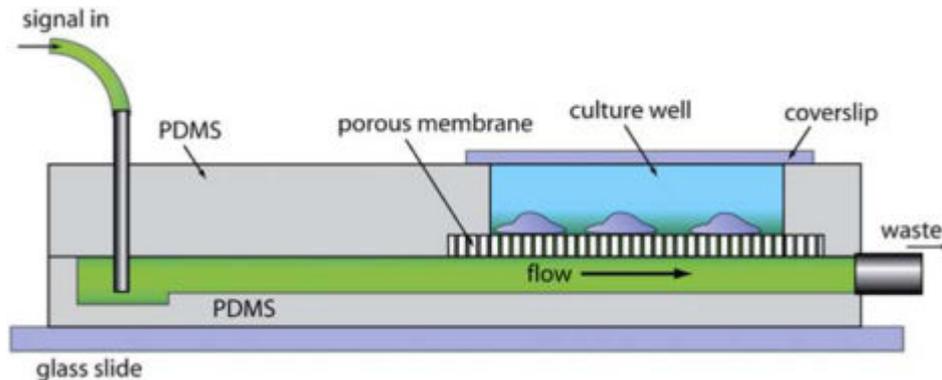


FIGURE 2.28 – Les cellules sont cultivées sur une membrane poreuse dans un compartiment séparé. Le milieu nutritif s'écoule de l'autre côté de la membrane dans un canal adjacent. Les composés biochimiques diffusent à travers la membrane pour atteindre les cellules.

- Les dispositifs à gestion de flux par des valves pneumatiques [15, 22, 62, 66, 73, 82, 83, 93, 182] sont très efficaces et permettent d'obtenir des zones parfaitement protégées du flux. Mais ce sont des systèmes qui nécessitent une très lourde logistique et qui sont souvent complexes, autant dans leur fabrication que dans leur utilisation (Figure 29).

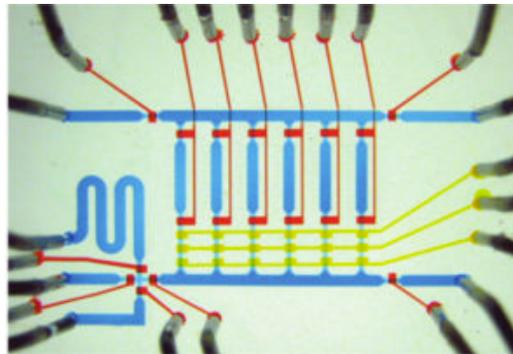


FIGURE 2.29 – Dispositif de contrôle des flux par des systèmes de valves pneumatiques. Les valves rouges contrôlent l'ouverture des entrées et sorties des canaux d'alimentation et des chambres culture (en bleu). Les valves jaunes sont des pompes péristaltiques.

- Les circuits microfluidiques à capillaires fins [53, 54, 77, 147] séparent les canaux d'alimentation à flux de la zone sans flux. Ces circuits sont efficaces mais les capillaires ne font pas plus que $4 \mu\text{m}$ de hauteur et par conséquent il est très difficile de remplir la zone sans flux sans créer de bulles. Pour y parvenir, il faut sceller le circuit en PDMS de façon covalente à une lamelle en verre et augmenter la pression d'entrée de façon à surélever le plafond

PDMS des capillaires fins (Figure 30). De tels circuits ne sont donc pas fonctionnels en matière plastique. De plus, ils nécessitent deux ou trois étapes de lithographie.

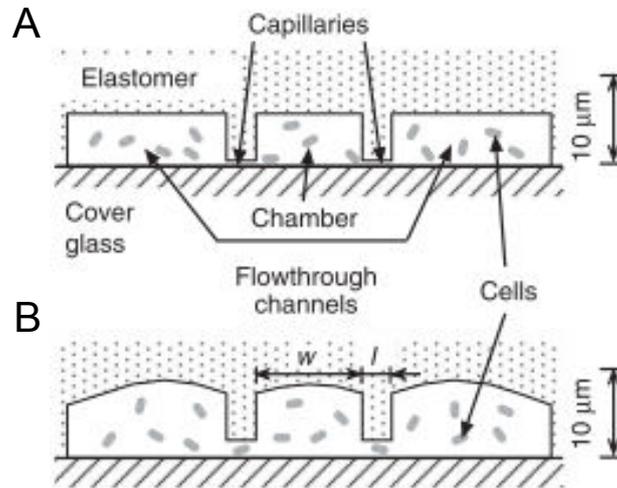


FIGURE 2.30 – Vue en coupe d’une chambre centrale séparée des canaux d’alimentation adjacents par des capillaires fins. A : pas de pression appliquée dans les canaux. B : pression appliquée qui augmente la hauteur des capillaires permettant ainsi de laisser passer les cellules des canaux d’alimentation vers la chambre centrale.

- Les circuits microfluidiques à géométrie d’exclusion de flux qui sont des circuits avec une géométrie 2D comprenant des chambres reliées chacune à un canal à flux par une simple entrée, qui empêche le flux de rentrer dans les chambres. Parmi ces circuits, certains sont associés à des dispositifs complexes [13, 37] comprenant de nombreuses couches et de nombreuses étapes de fabrication, d’autres proposent des systèmes plus simples, à une ou deux étapes de lithographie, avec des chambres de plus petite taille ($< 300 \times 300\ \mu\text{m}$) isolant les systèmes biologiques dans un micro-environnement restreint [87, 96, 99, 103, 104, 149, 157] (Figure 31A). Malgré tout, ces systèmes microfluidiques ont plus ou moins le même inconvénient que les systèmes à capillaire fin : ils nécessitent d’appliquer de fortes pressions et d’utiliser la porosité du PDMS pour chasser l’air piégé dans les chambres, à travers le PDMS, pour le remplacer par la solution s’écoulant dans le canal d’alimentation (Figure 31B). De tels systèmes ne pourraient être industrialisés en matière plastique et doivent faire intervenir un système d’injection par pressurisation d’air ou un système d’aspiration par le vide [87].

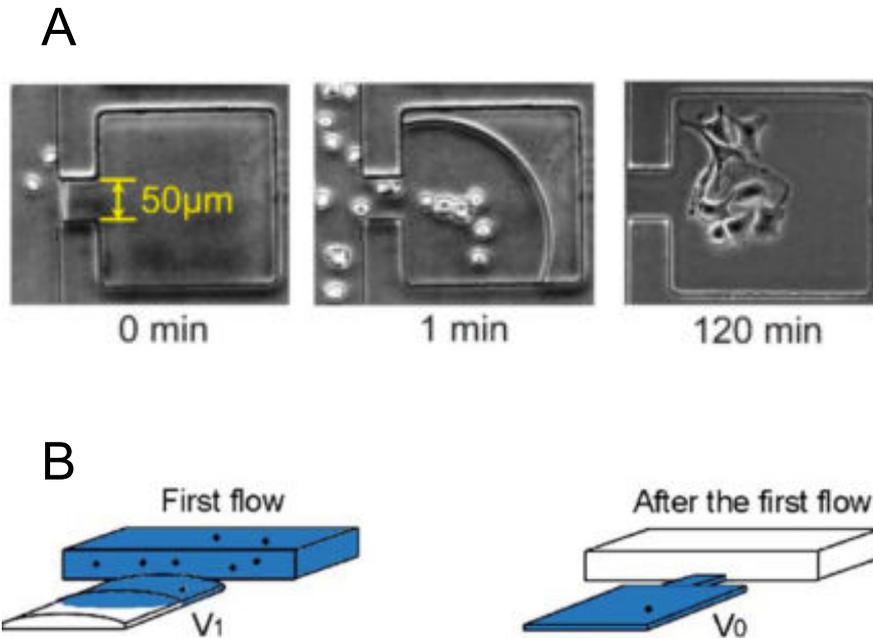


FIGURE 2.31 – A : Chambre carré protégée du flux du canal d'alimentation (à gauche) par une petite ouverture, le milieu contenant les cellules remplit la chambre (1 min). Ensuite les cellules prolifèrent à l'abri des forces de cisaillement (120 min). B(à gauche) : il est nécessaire d'appliquer de fortes pressions pour remplir la chambre à exclusion de flux. Pendant le remplissage, le volume de la chambre augmente par déformation du PDMS. B(à droite) : après le remplissage la chambre reprend sa forme d'origine et l'écoulement se fait sans avoir à appliquer de fortes pressions.

Nous nous sommes inspirés des circuits microfluidiques à géométrie d'exclusion de flux pour développer un système microfluidique à chambres sans flux adaptable à l'étude des SMR/IV avec comme objectifs technologiques : la simplicité et la reproductibilité autant dans la fabrication que dans l'utilisation.

2.2.2 Développement d'un système microfluidique à chambres sans flux

Cette partie contient toutes les étapes de développement de la technologie microfluidique pour parvenir à contrôler, dans le temps, la concentration des composés moléculaires du micro-environnement biochimique en l'absence de contraintes hydrodynamiques.

Circuit

bases technologiques

Les microcanaux des systèmes microfluidiques sont fabriqués dans la majeure partie des cas par la méthode de la "lithographie molle" (Figure 32). Cette méthode se base sur la fabrication d'un moule plan contenant des microreliefs résineux ayant la géométrie du microcircuit que l'on souhaite obtenir. Le moule est composé d'un "wafer" en silicium (provenant de la technologie de la microélectronique) et les reliefs sont en résine solidifiée. Le nom de la méthode signifie graver un matériau "mou". En effet, on utilise un élastomère que l'on coule sur le moule solide puis, que l'on réticule. Et une fois réticulé, l'élastomère reste flexible et peut être démoulé sans détérioration des microstructures résineuses. Le plus utilisé -et celui que nous utilisons- est le PDMS (Polydiméthylsiloxane) qui possède des propriétés remarquables [113]. Son module de Young est de 750 kPa, c'est un matériau transparent et non autofluorescent, ce qui est favorable aux observations escomptées. La surface du PDMS est biologiquement inerte, hydrophobe à l'état natif, et hydrophile après avoir été activée au plasma [111], [24].

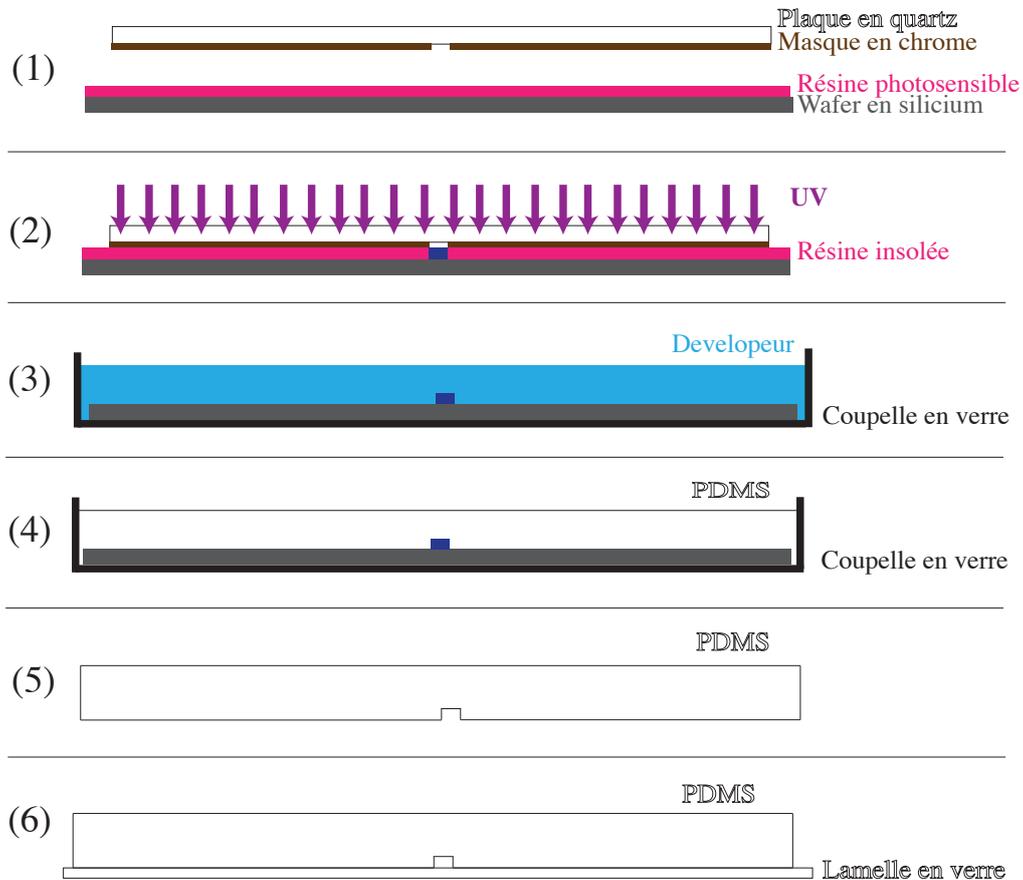


FIGURE 2.32 – Lithographie molle. (1) Le masque du microcircuit à graver est un film fin de chrome, déposé sur une plaque de quartz. En dessous, une couche de résine est "spin-coatée" sur un wafer en silicium. (2) Plaquage du masque en chrome sur la résine et insolation de la résine à travers les "micromotifs" du masque. Les zones opaques (chrome) ne laissent pas passer les UV, les zones transparentes (quartz) laissent passer les UV. (3) Développement de la résine positive : les parties de la résine qui sont insolées sont dissoutes par le développeur. Il ne reste que les parties non insolées qui restent solidement fixées sur la surface en silicium, l'ensemble constituant le moule pour le PDMS. (4) Coulage du PDMS sur le moule puis réticulation des chaînes longues de DMS par augmentation de la température sous la coupelle. (5) Démoulage du PDMS. Les microcanaux présents à sa surface sont le négatif des reliefs du moule. (6) Fermeture du canal par simple contact avec une lamelle en verre.

Un avantage précieux d'utiliser la technologie PDMS (lithographie molle) par rapport aux technologies plastiques [25, 41, 122, 156] est que l'on peut facilement et rapidement modifier la géométrie du circuit, ce qui est indispensable dans les phases de mise au point. Cependant le PDMS est peu

compatible aux solvants organiques [94] et possède l'inconvénient d'être poreux et par conséquent de laisser diffuser les petites molécules [166].

Pour la mise au point de la géométrie des canaux microfluidiques, j'utilise un photo-masque (photo-émulsion à l'imprimante des zones opaques sur un papier transparent) car ce type de masque est moins couteux, et il est produit plus rapidement qu'un masque quartz-chrome. Cependant, la résolution est moins bonne, ce qui influencera l'écoulement des fluides dans les microconduites par la présence d'aspérités surfaciques. On utilisera donc un photo-masque pour la mise au point et un masque quartz-chrome quand la géométrie du circuit est validée pour une application importante (Figure 33).



FIGURE 2.33 – (A) bord d'un microcanal avec utilisation d'un photo-masque. (B) bord d'un microcanal avec utilisation d'un masque quartz-chrome.

Le parti pris, dans cette thèse, pour mettre au point le système microfluidique a été de ne faire intervenir qu'une seule étape de lithographie de façon à obtenir un canal en une seule couche, ce qui d'ores et déjà simplifie et accélère de façon non négligeable la fabrication du dispositif microfluidique. Dans un circuit à une seule couche, la hauteur des canaux est constante et fixée par la hauteur des micromotifs en résine sur le wafer en silicium. Voici, ci-dessous, les protocoles détaillés permettant de fabriquer des moules contenant des motifs de $10\ \mu\text{m}$; $20\ \mu\text{m}$ et $40\ \mu\text{m}$ de hauteur. Nous verrons plus tard quelles hauteurs seront adaptés à quelles applications.

Protocole 5 (cf. Annexes) :

*Fabrication d'un moule à motifs de $10\ \mu\text{m}$ de hauteur
(salle blanche)*

Protocole 6 (cf. Annexes) :

*Fabrication d'un moule à motifs de $20\ \mu\text{m}$ de hauteur
(salle blanche)*

Protocole 7 (cf. Annexes) :

*Fabrication d'un moule à motifs de $40\ \mu\text{m}$ de hauteur
(salle blanche)*

Conception de la géométrie 2D du circuit microfluidique

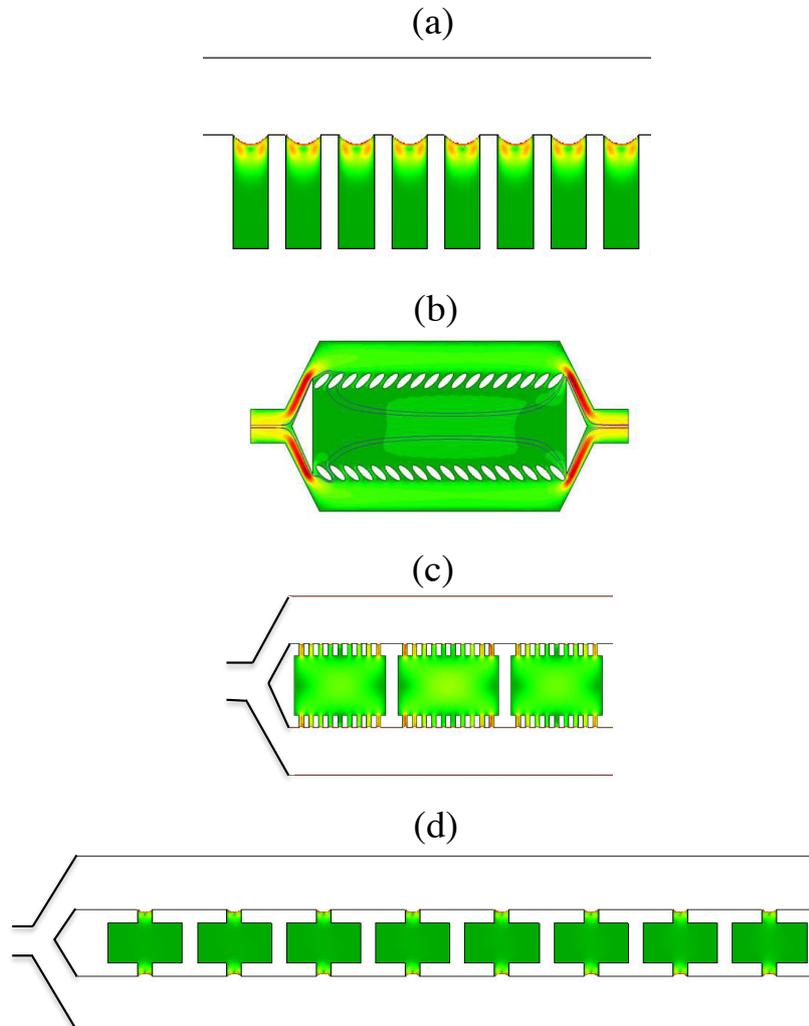


FIGURE 2.34 – Simulations d'écoulement sur COMSOL. (a) Un canal à flux unique connecté à des puits à protection de flux; (b) Deux canaux d'alimentation connectés à une chambre à protection de flux par des barrières à plots; (c) Deux canaux à flux connectés à des chambres à protection de flux par des canaux fins; (d) Deux canaux à flux connectés à des chambres à protection de flux par des canaux individuels.

La géométrie du circuit microfluidique doit être pensée pour que les zones sans flux contenant les *SMR/IV* soient connectés à des canaux d'alimentation à flux transportant les composés bio-chimiques. Les canaux d'alimentation à flux doivent constituer, pour les zones sans flux, un réservoir de composés biochimiques dont la concentration massique puisse être contrôlée par l'expérimentateur.

Pour fermer les canaux microfluidiques creusés dans un bloc de PDMS par un échantillon plat de façon irréversible, on doit faire intervenir un traitement chimique sur la surface du PDMS et de l'échantillon : plasma [21,65], UV [19], vapeur [153]. Or, ces traitements de surface sont nocifs pour des objets biologiques présents sur l'échantillon et ne sont donc pas une solution envisagée si on veut travailler avec des échantillons bio-chimiquement microstructurés. L'échantillon doit donc être en "simple contact" avec la surface PDMS du circuit microfluidique, on parle de liaison réversible. La surface de PDMS à l'état natif étant hydrophobe [?], tout comme la surface de PEG présente sur l'échantillon biochimiquement structuré [193], une liaison réversible par attraction hydrophobe se crée entre les deux surfaces. Avec une liaison réversible, la géométrie du circuit microfluidique doit être conçue pour que ce dernier puisse être rempli efficacement (sans piégeage de bulles d'air) en appliquant le minimum de pression de façon à éviter tout risque de fuite entre la surface de PDMS et celle de l'échantillon.

Pour créer la géométrie, j'ai d'abord réalisé des simulations numériques d'écoulement microfluidique sur le logiciel COMSOL. La Figure 34 résume les étapes de développement en simulation d'écoulement confiné à deux dimensions. Pour chacune des simulations, on fixe une pression à l'entrée (à gauche) et on annule la pression à la sortie (à droite).

23(a) : Pour atteindre le flux zéro, les puits doivent avoir un ratio profondeur/largeur important [?], or, l'augmentation de ce ratio rend plus difficile le remplissage des puits. Il faut alors appliquer de fortes pressions pour les remplir, ce qui favorise l'apparition de fuites. Les puits ne sont donc pas adaptés pour un circuit microfluidique avec échantillon en "simple contact".

23(b) : avec ce type de géométrie, un flux s'établit depuis les plots proches de l'entrée jusqu'aux plots proches de la sortie. Or nous voulons un flux zéro dans les zones à protection de flux.

23(c) : Pour éviter ce flux, nous avons compartimenté la zone à protection de flux et réduit les largeurs des entrées dans les chambres. Mais une légère circulation du fluide était toujours apparente.

23(d) : Cette géométrie est composée de deux canaux d'alimentation de $200 \mu m$ de largeur connectés à une série de chambres rectangulaires par des ouvertures de $50 \mu m$ par $50 \mu m$. Le flux diminue très fortement dans les chambres, il n'y a pas de circulation du fluide d'une chambre à l'autre, et la taille des ouvertures est plus grande ; ce qui permet de faire passer le fluide en appliquant des pressions moins importantes, ce qui est critique au moment du remplissage.

Nous garderons donc le choix (d).

Avec une telle géométrie à double entrée et double sortie, de nouvelles simulations numériques montrent que le flux tombe bien à zéro dans les chambres (Figure 35a).

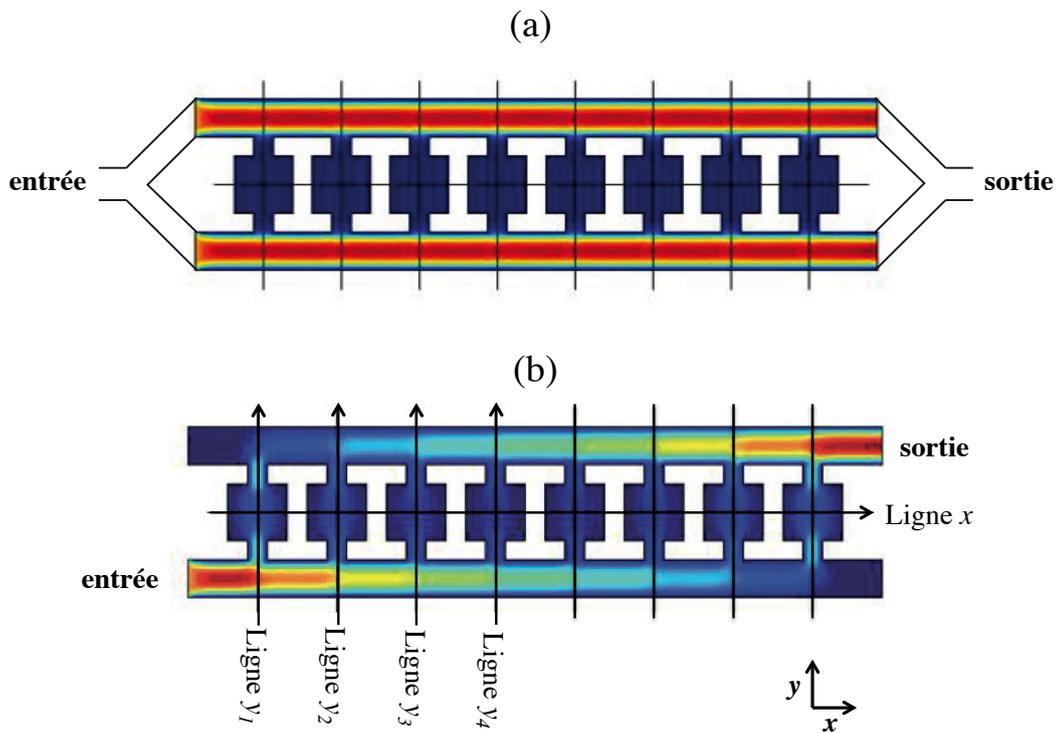


FIGURE 2.35 – Simulations d'écoulement sur COMSOL. (a) Circuit à double entrée et double sortie. (b) Circuit simple entrée et simple sortie. La ligne x et les lignes y (qui passent par le centre de chaque chambre) sont les lignes suivant lesquelles les mesures du champ de vitesse du fluide sont effectuées. Pour (a) et (b) la vitesse du fluide à l'entrée est de $500 \mu m.s^{-1}$. La viscosité du fluide est identique à celle de l'eau. Les couleurs chaudes représentent les valeurs hautes de l'amplitude du champ de vitesse du fluide, les couleurs froides représentent les valeurs basses.

Mais des tests réels d'écoulement nous ont montré que des bulles d'air restent systématiquement piégées dans les chambres. La seule manière de remplir le circuit est alors d'appliquer de fortes pressions pour que l'air contenu dans les chambres s'échappe à travers le PDMS. Or, avec un échantillon en "simple contact" sur le PDMS, on ne peut pas remplir le circuit de cette manière sans créer de fuites qui se propagent rapidement avant que les chambres ne soient remplies entièrement. Pour éliminer ce problème il a fallu penser à un système de remplissage par circulation entre les deux canaux d'alimentations parallèles. Pour ça nous avons gardé la même géométrie mais nous

avons créé une asymétrie entre le canal d'entrée et le canal de sortie (Figure 35b). On effectue alors les mesures du champ de vitesse du fluide dans cette géométrie selon la ligne x et selon les lignes y de la simulation numérique (Figure 36).

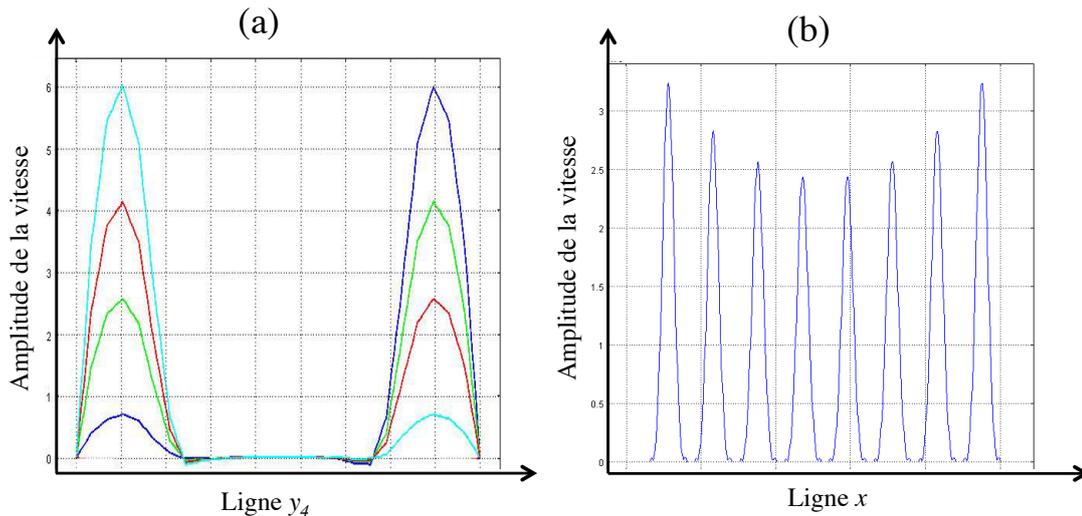


FIGURE 2.36 – Analyse des champs de vitesse de la simulation numérique représentée par la Figure 24b. (a) Mesure de l'amplitude de la vitesse du fluide en fonction de la position sur la ligne y_1 : courbe bleu clair ; sur la ligne y_2 : courbe rouge ; sur la ligne y_3 : courbe verte ; sur la ligne y_4 : courbe bleu foncé. (b) Mesure de l'amplitude de la vitesse du fluide en fonction de la position sur la ligne x .

Le flux présent dans les canaux d'alimentations parallèles est efficacement réduit dans les chambres du fait de la résistance hydrodynamique imposée par les ouvertures de chambre (Figure 36a). On observe aussi, dans les chambres, une diminution "linéaire" du flux avec l'éloignement par rapport aux extrémités (entrée et sortie) du circuit (Figure 36b).

Le couplage des effets de réduction du flux mis en évidence par les figures 36a et 36b suffisent à réduire efficacement le flux hydrodynamique à zéro dans les chambres microfluidiques comme nous allons le voir par la suite. Nous fixons les dimensions de la largeur des canaux d'alimentation à $100 \mu m$ et la taille des ouvertures des chambres à $50 \times 50 \mu m$. Je fixe la taille des chambres à $300 \times 300 \mu m$ qui correspond à la taille du champ de l'objectif 40X d'un microscope à fluorescence classique.

Nous garderons donc le choix (b) de la Figure 24.

En faisant des tests de remplissage dans les chambres carrées, nous nous apercevons que les angles de la chambre retiennent le fluide par capillarité et l'empêchent de s'écouler correctement (Figure 37a).

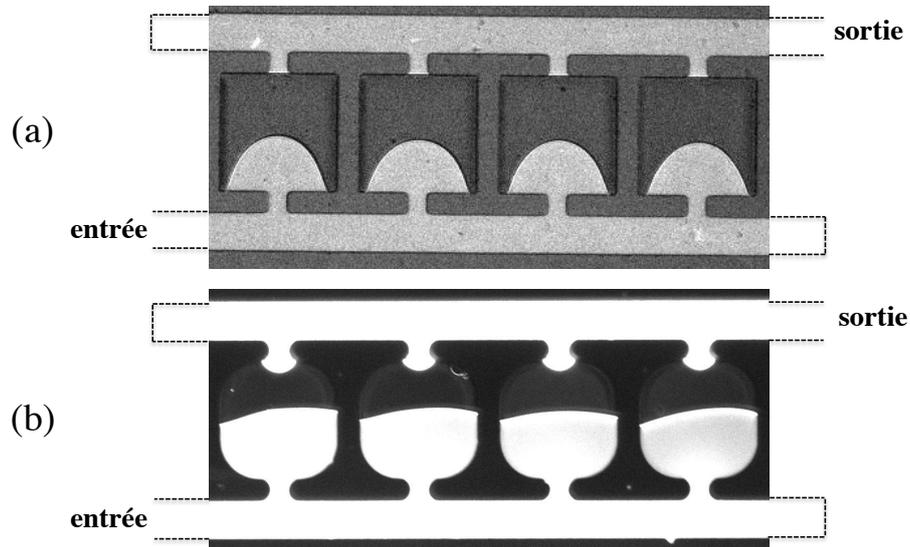


FIGURE 2.37 – Remplissage du circuit microfluidique par une solution de fluorophores libres (couleur blanche). (a) chambres carrées (b) chambres carrées à coins curvilignes. Imagerie : microscope de fluorescence classique.

Avec des chambres carrées à coins curviligne, l'écoulement se fait plus facilement en appliquant la même pression d'entrée (Figure 37b).

Nous garderons donc le choix (b).

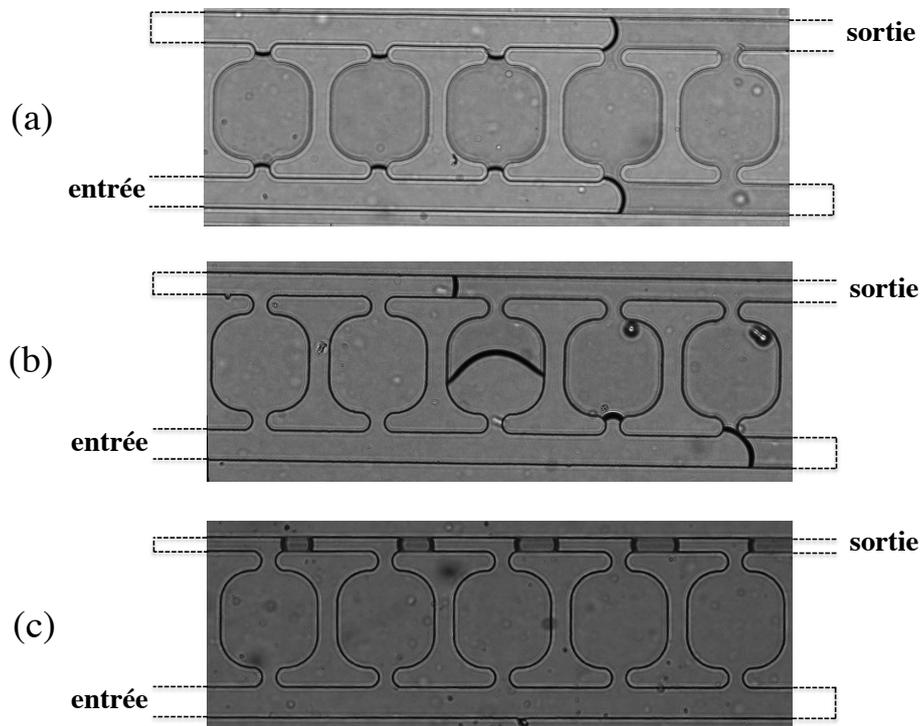


FIGURE 2.38 – Remplissage du circuit microfluidique par de l’eau. (a) Largeur du canal d’alimentation de sortie = $100 \mu m$. (b) Largeur du canal d’alimentation de sortie = $75 \mu m$. (c) Largeur du canal d’alimentation de sortie = $50 \mu m$. Imagerie : microscopie de lumière transmise.

Avec les dimensions que l’on a fixées précédemment : $100 \mu m$ de largeur pour les deux canaux d’alimentation, le fluide ne pénètre pas dans les chambres microfluidiques dans la plupart des essais de remplissage que nous avons réalisés (Figure 38a). Il remplit d’abord les canaux d’alimentation, puis il faut appliquer une surpression pour qu’il remplisse les chambres. L’air sous pression dans les chambres s’échappe à travers le PDMS qui est un matériau poreux. Cette surpression nécessaire pour remplir les chambres engendre quasi systématiquement des fuites du fluide entre la lamelle en verre et le PDMS.

Pour éviter ce problème, on réduit d’un quart la largeur du canal d’alimentation de sortie, augmentant ainsi sa résistance à l’écoulement (Figure 38b). Cela a pour effet d’induire un léger retard sur la progression du fluide dans le canal d’alimentation de sortie par rapport à la progression du fluide dans le canal d’alimentation d’entrée. Le fluide provenant du canal d’entrée remplit chaque chambre par son ouverture d’entrée, avant que son ouverture opposée soit obstruée par l’arrivée du fluide provenant du canal d’alimentation de sortie. Ainsi toutes les chambres se remplissent directement sans

piégeage de bulles d'air dans les chambres. Il n'y a donc pas de surpression à appliquer, les risques de fuite sont écartés, même dans le cas d'un "simple contact" ente l'échantillon et la surface PDMS.

En réduisant d'un demi la largeur du canal d'entrée, le retard sur la progression du fluide dans le canal de sortie par rapport à la progression du fluide dans le canal d'entrée est trop important (Figure 38c). Le fluide provenant du canal d'entrée remplit entièrement la chambre avant que le fluide provenant du canal de sortie ne soit arrivé au niveau de la chambre, ce qui créé systématiquement une bulle.

Nous garderons donc le choix (b).

La géométrie finale du canal microfluidique est présentée par la Figure 39.

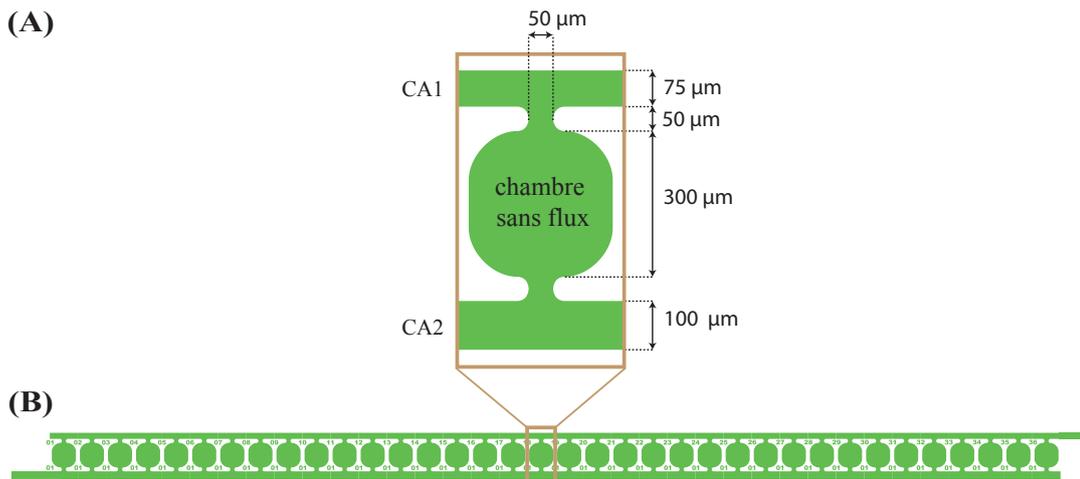


FIGURE 2.39 – Géométrie finale du circuit microfluidique. (A) Une chambre sans flux reliée aux deux canaux d'alimentation par ses deux ouvertures. Le canal d'alimentation d'entrée "CA1" fait 100 μm de largeur. Le canal d'alimentation de sortie "CA2" fait 75 μm de largeur. La "chambre sans flux" fait 300x300 μm et les deux ouvertures de la chambre font 50x50 μm . (B) Une "ligne de chambres" : il y a 36 chambres en série dans une ligne, l'espacement entre deux chambres consécutives étant de 50 μm .

Remplissage

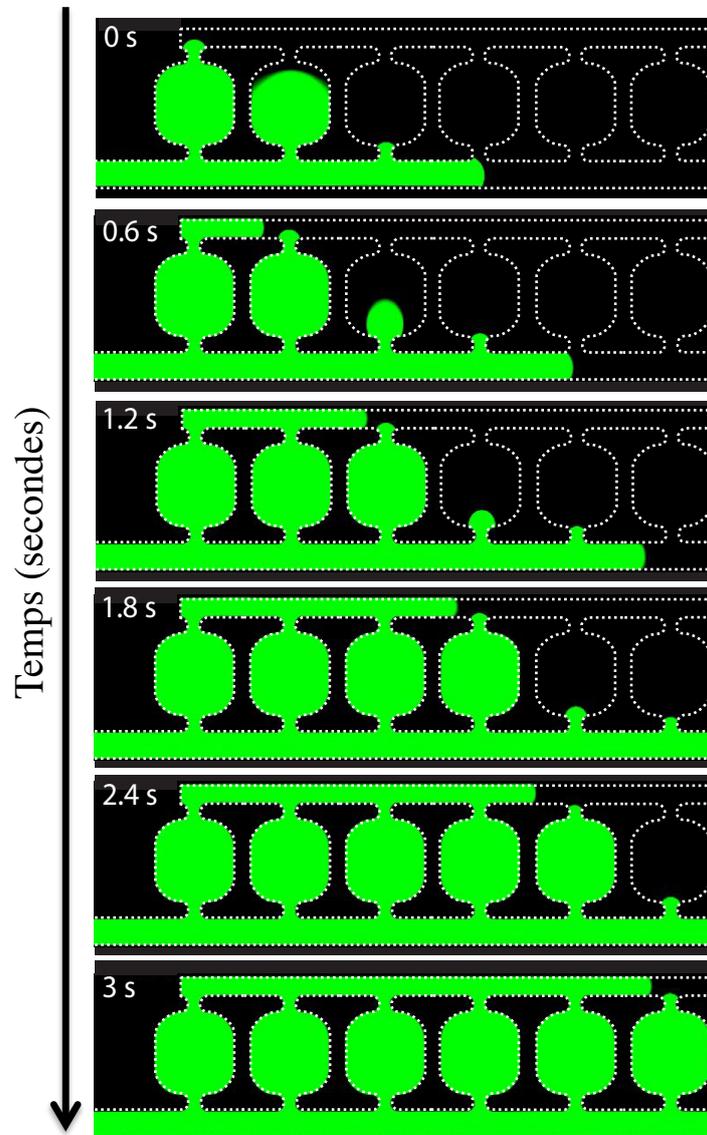


FIGURE 2.40 – Cinétique de remplissage d’une ligne de chambres microfluidiques. Le contour des chambres est représenté par les lignes en pointillé blanc. Le fluide injecté est une solution de fluorophores libres Alexa 488 (couleur verte). Imagerie : microscopie de fluorescence classique.

La géométrie d’une ligne de chambres est adaptée pour que le remplissage de chaque chambre se fasse de façon systématique de la façon suivante : le fluide s’écoulant dans le CA1 remplit la chambre et rencontre le fluide

provenant du CA2 au niveau de l'ouverture de la chambre. Toute la ligne de chambre se remplit de cette manière, par circulation. L'air est chassé vers la sortie du circuit, il n'y a pas à exercer de pression supplémentaire. La fermeture du circuit PDMS par un échantillon plat en simple contact est donc possible sans risques de fuite.

Principe de l'écoulement dans une ligne de chambres.

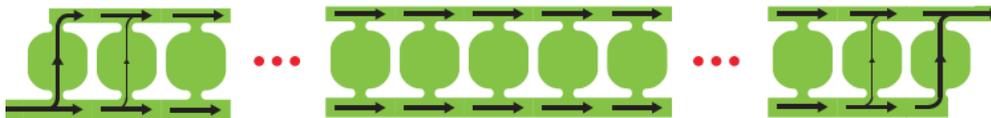


FIGURE 2.41 – Principe d'écoulement d'un fluide dans une ligne de chambres : les flèches noires indiquent la direction et l'intensité du flux, les points rouges indiquent les chambres de la ligne non représentées.

Une fois l'étape de remplissage terminée, le fluide est en écoulement stationnaire. Un flux est présent dans les quelques premières chambres et les quelques dernières chambres de la ligne mais toutes les autres chambres que l'on appellera "chambres centrales" ne sont pas traversées par un flux.

Lignes mixtes d'advection-diffusion

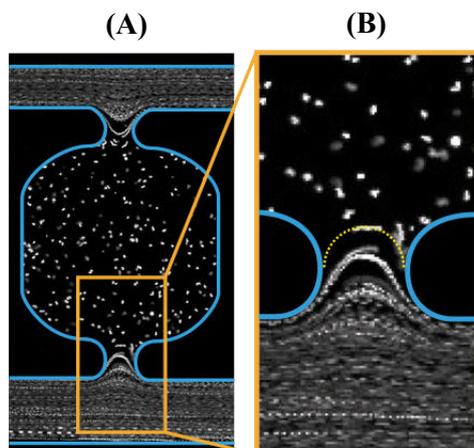


FIGURE 2.42 – Ecoulement stationnaire d'une suspension de billes en polystyrène fluorescent ayant un diamètre de $1 \mu m$. Les contours des canaux microfluidiques sont représentés par les lignes bleues. (A) chambre centrale et ses canaux d'alimentation, observation au grossissement 20x. (B) Zoom sur une ouverture de chambre, observation au grossissement 40x. Le temps d'acquisition pour les images (A) et (B) est de 1 s. Imagerie : microscopie de fluorescence classique.

Figure 42A : Il y a présence de flux hydrodynamique dans les canaux d'alimentation et absence de flux dans l'ensemble de la chambre. Dans la chambre, les billes apparaissent plus grandes du fait de leur mouvement Brownien pendant le temps d'ouverture du diaphragme.

Figure 42B : La ligne jaune pointillée représente la frontière entre la zone de flux laminaire du canal d'alimentation et la zone sans flux de la chambre. Les molécules passant par cette ligne peuvent aussi bien diffuser dans la chambre qu'être entraînées dans le flux du canal d'alimentation.

Renouvellement du micro-environnement

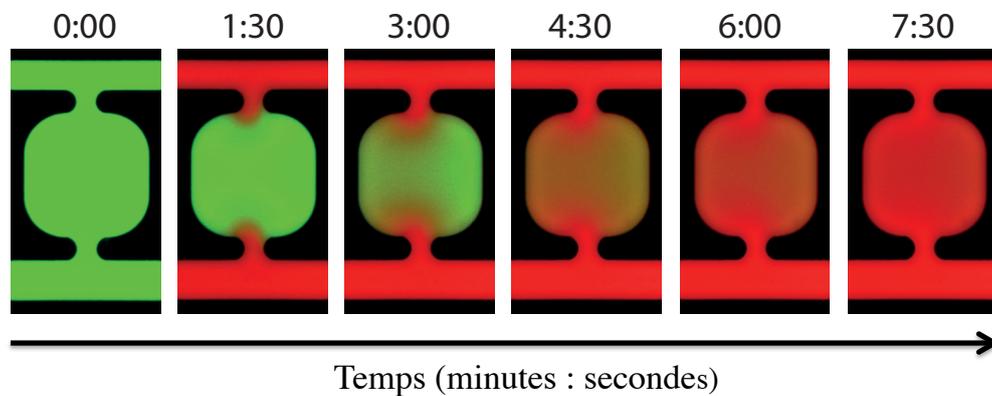


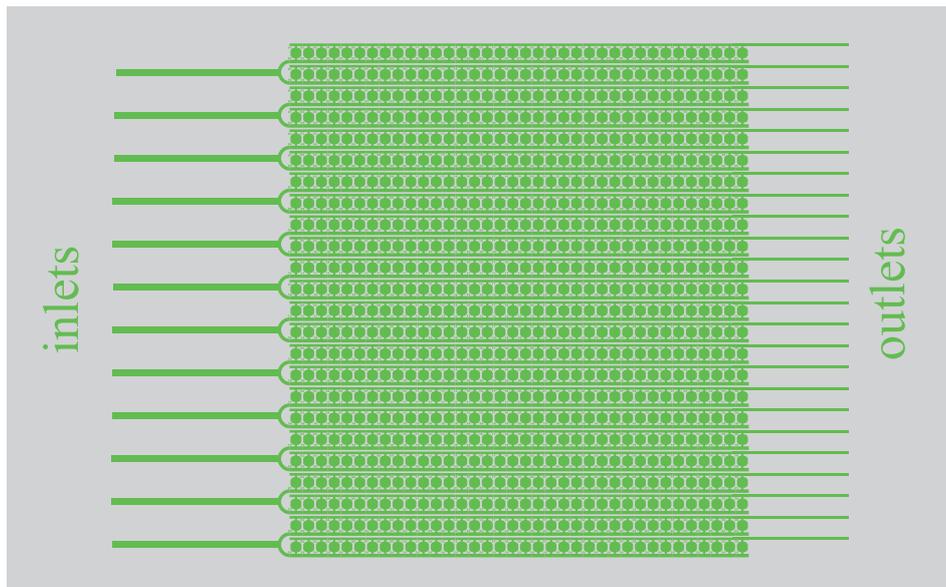
FIGURE 2.43 – Injection dans le circuit microfluidique d'une solution 2 de fluorophores libres Alexa 568 (rouge) dans une ligne de chambres précédemment remplie par une solution 1 de fluorophores libres Alexa 488 (vert). Au temps $t = 1 \text{ min} : 30 \text{ sec}$, la solution 2 arrive au niveau de la chambre observée. Imagerie : microscopie de fluorescence classique.

On observe, au cours du temps, le front de diffusion des fluorophores rouges des canaux d'alimentation vers la chambre et l'échappement diffusif des fluorophores verts de la chambre vers les canaux d'alimentation. Le temps de renouvellement, qui est le temps pour que les composés moléculaires de la solution 2 remplacent totalement ceux de la solution 1 dans la chambre, est environ 7 minutes, ce qui est rapide relativement au temps caractéristiques d'évolution des systèmes biomoléculaires étudiés.

Criblage haut débit

De façon à accéder à un criblage haut débit, nous avons augmenté le nombre de chambres et nous les avons numérotées. Cela accélère la détection des phénomènes reproductibles des systèmes biologiques observés.

(A)



(B)

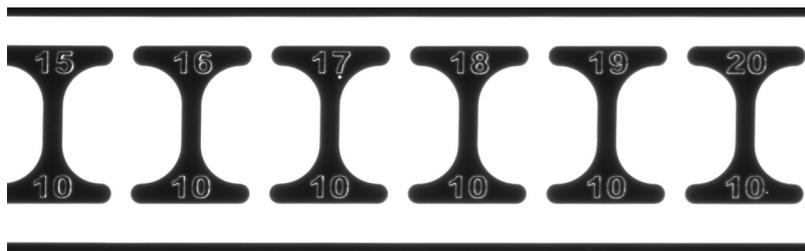


FIGURE 2.44 – (A) Un circuit microfluidique complet contenant 24 lignes de chambres. Il y a donc au total 864 chambres à observer. Les entrées ("inlets") sont reliées au CA1 des lignes de chambres, les sorties ("outlets") sont reliées au CA2 des lignes de chambres. (B) Solution de fluorophores libres (blanc) dans une ligne de chambres. Les chambres sont numérotées selon leur ligne et leur place dans la ligne.

Figure 44A : En vert : un circuit microfluidique au complet. En gris, la taille d'une lamelle en verre couramment utilisée en biologie *in vitro*. La taille

du circuit est adaptée pour que ce dernier puisse être fermé par une lamelle en verre couramment utilisée en biologie.

Figure 44B : La numérotation des chambres est visible aussi en microscopie de fluorescence, ce qui s'avèrera très pratique à l'usage.

La géométrie du circuit microfluidique à chambres sans flux étant fonctionnelle, il faut maintenant élaborer un dispositif, intégrant le circuit, qui soit adapté aux contraintes imposées par les *SMR/IV*.

Dispositif pour les SMRIVLe dispositif en détail

Voici la géométrie du dispositif microfluidique adapté pour les SMRIV

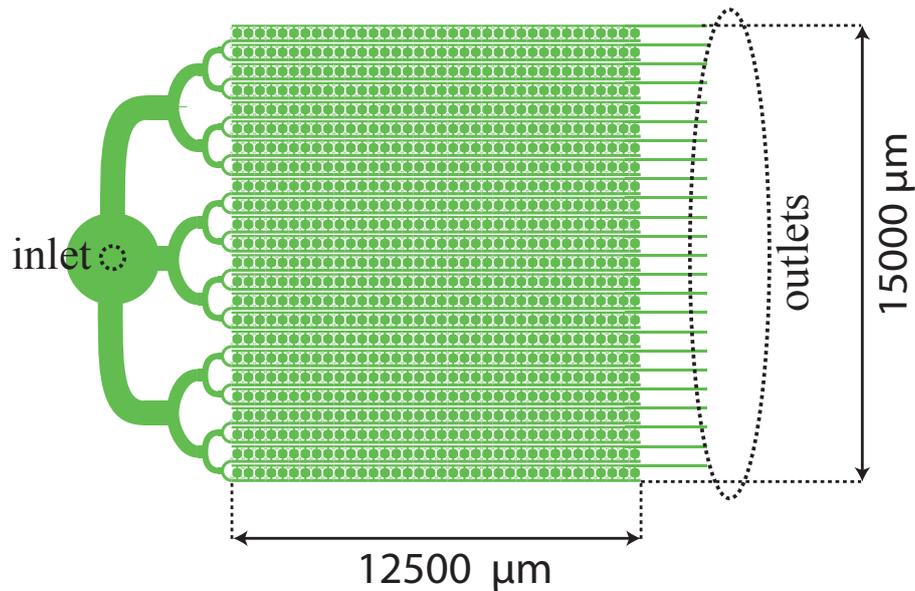


FIGURE 2.45 – Géométrie en deux dimensions du circuit microfluidique adapté pour les SMRIV. L'entrée est unique et représentée par le cercle en pointillé noir (inlet). Il y a une sortie CA2 pour chaque ligne de chambres. l'ensemble des sorties est entouré par une ligne en pointillé (outlet).

Pour reconstituer le cytosquelette d'actine *in vitro*, on utilise une solution contenant un agent visqueux, la methyl-cellulose, qui fixe la viscosité du micro-environnement à $1,8 \cdot 10^{-3} Pa \cdot s^{-1}$, une valeur proche de celle du cytoplasme cellulaire [49, 102], soit environ deux fois plus que l'eau. La solution ne peut donc s'écouler dans le circuit microfluidique par l'unique effet de la pression hydrostatique. Le dispositif microfluidique devra donc être associé à un système d'injection externe et nous ne pouvons abaisser la hauteur du canal microfluidique en dessous de $40 \mu m$ si on veut éviter tout risque de fuite.

Voici le schéma d'explication du fonctionnement du dispositif que nous avons mis au point.

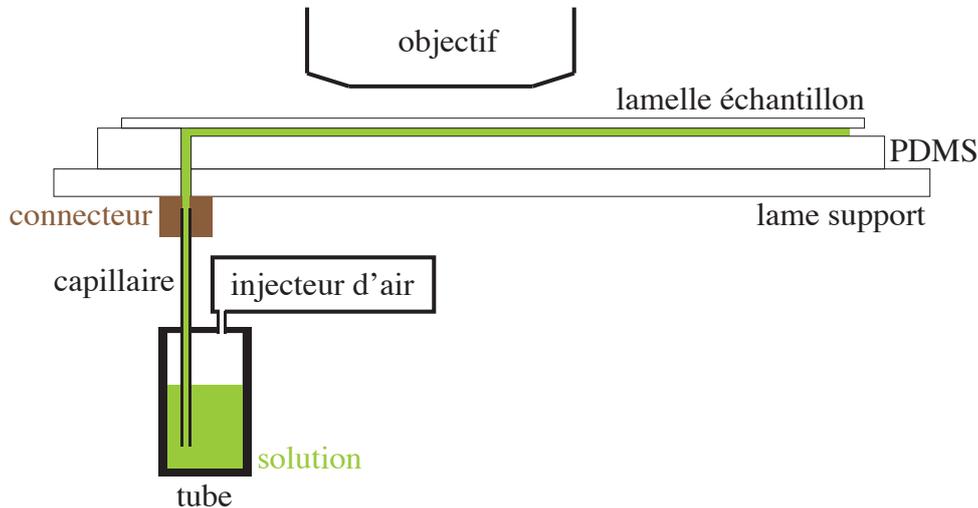


FIGURE 2.46 – Schéma en coupe du dispositif microfluidique pour les SMRIV.

Le bloc de PDMS contient le circuit microfluidique à sa surface supérieure et contient un trou fin qui le traverse. Ce trou est aligné avec l'entrée du circuit au niveau du cercle pointillé noté "inlet" sur la Figure 34. Le bloc de PDMS est collé de façon covalente à une lame en verre percée au niveau du trou du bloc de PDMS. Cette lame en verre est un support mécanique rigide pour maintenir la planéité de la surface supérieure du PDMS. On peut coller sur la surface inférieure de cette lame en verre un connecteur microfluidique. Le connecteur permet de visser un capillaire en plastique au circuit microfluidique. L'autre extrémité du capillaire est reliée au système d'injection. Le capillaire est très fin pour minimiser les échanges par diffusion entre deux solutions s'écoulant l'une à la suite de l'autre et le connecteur minimise les volumes morts. Enfin, les canaux sont fermés par une lamelle en verre par simple contact.

Pour une expérience classique entre lame et lamelle (réalisée en routine au laboratoire), la solution qu'on appelle aussi "mix" et qui contient les protéines purifiées ne dépasse jamais les $60 \mu L$. Le mix est pipeté au fond d'un tube à essai avant d'être placé entre lame et lamelle et rapidement observé. Chaque action de pipetage supplémentaire est susceptible de détériorer les protéines présentes dans la solution. Nous avons donc choisi d'utiliser un système d'injection qui prélève la solution directement dans le tube à essai

dans lequel la solution a été préparée, comme le montre la Figure 47 ci-dessous.

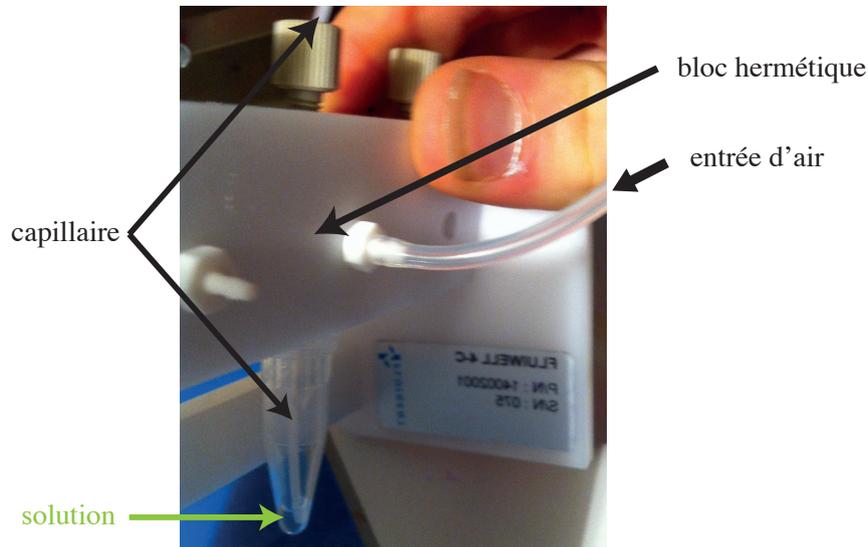


FIGURE 2.47 – Le FLOWELL : bloc d'injection du fluide par compression d'air.

Ce système d'injection est un système de la compagnie Fluigent. Il se compose d'un bloc hermétique sur lequel on visse un tube stérile 0.5 mL contenant la solution à injecter. Le capillaire plonge dans la solution et une entrée d'air permet de mettre le gaz sous pression dans le bloc hermétique et de pousser la solution dans le capillaire. Pour passer d'une solution 1 à une solution 2, il suffit de dévisser le tube contenant la solution 1 et de le remplacer par un autre tube contenant la solution 2. Le tube stérile étant placé plus bas que le circuit microfluidique, la solution 1 ne remonte pas dans le capillaire. De cette manière, la connexion fluide entre la solution 1 contenue dans le capillaire, et la solution 2 contenue au fond du tube, se fait sans formation de bulle et sans mélange entre les solutions 1 et 2. L'injecteur d'air est un MFCS de chez Fluigent. Il génère des flux stables et sans pulsations tout en ayant un temps de réponse instantané.

Protocole 8 (cf. Annexes) :

Montage et utilisation du dispositif microfluidique pour les SMRIV.

Les calibrations du dispositif

Calibration du remplissage des chambres : voir Figure 29.

Après plusieurs essais de remplissage du circuit avec différentes pressions appliquées, la pression optimale qui engendre cent pour cent des chambres remplies est de 12,5 mbars. A cette pression, les 1000 chambres se remplissent en trente secondes environ.

Calibration du champ de vitesse du fluide dans les chambres : Figures 37; 38 et 39.

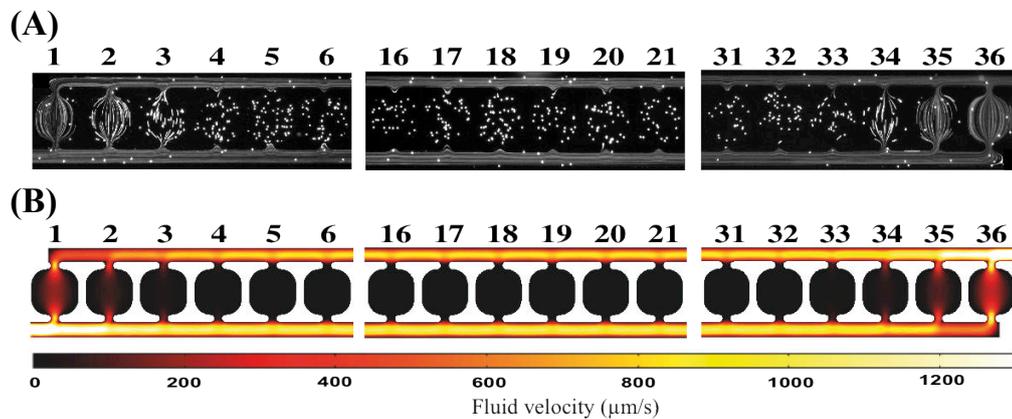


FIGURE 2.48 – (A) solution visqueuse ($1,8.10^{-3}Pa.s^{-1}$) contenant des billes en polystyrène fluorescent de diamètre $1\ \mu m$ s'écoulant dans une ligne de chambres. (B) Simulation numérique sur COMSOL du champ de vitesses d'un fluide de viscosité $1,8.10^{-3}Pa.s^{-1}$ s'écoulant dans une ligne de chambres. Les couleurs sombres représentent les basses vitesses et les couleurs claires représentent les hautes vitesses. (A) et (B) Les chiffres figurant au dessus de chaque chambre donnent le numéro correspondant à la position de chacune des chambres sur la ligne de chambres.

Nous avons réalisé, en parallèle, de nombreuses simulations numériques d'écoulement et de nombreux tests réels d'écoulement avec des billes utilisées comme traceurs de vitesse. Nous avons relevé les valeurs de la vitesse du fluide au centre de chaque chambre. La Figure 49 reporte les valeurs mesurées.

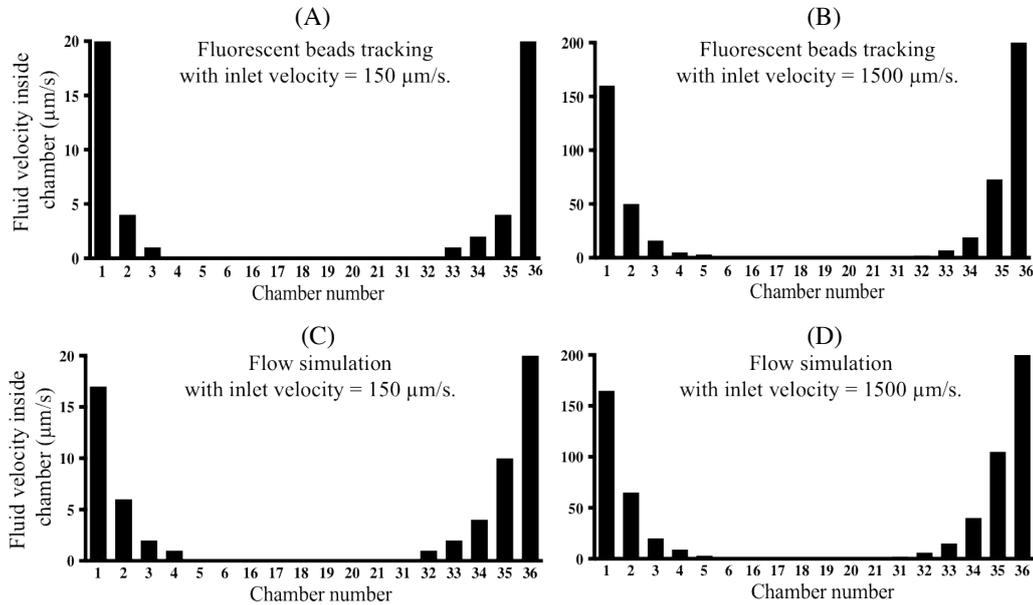


FIGURE 2.49 – Histogrammes des mesures de la vitesse du fluide au centre des chambres, en écoulement réel (A ; B) et en simulation numérique (C ; D). La vitesse du fluide en entrée de ligne fixée à $150 \mu m.s^{-1}$ pour les cas (A) et (C) et fixée à $1500 \mu m.s^{-1}$ pour les cas (B) et (D).

Pour chaque chambre dont le numéro apparaît en abscisses, la barre noire représente la valeur de la vitesse mesurée et la barre orangée représente la valeur de la vitesse obtenue par simulation numérique. Dans le cas (A) le flux dans les chambres tombe à zéro à partir de la cinquième chambre. Dans le cas (B), le flux dans les chambres tombe à zéro à partir de la septième chambre. Donc en augmentant dix fois la vitesse du fluide en entrée du circuit, le flux zéro au centre des chambres est décalé seulement de deux chambres. Avec cette géométrie de microcanaux fluidiques, la réduction du flux jusqu'à zéro dans les chambres est donc efficace. Pour les systèmes d'actine reconstitués *in vitro* nous travaillons en général à des vitesses en entrée de ligne de l'ordre de $500 \mu m.s^{-1}$. Nous pouvons donc considérer que, dans une ligne de chambre, il y a présence de flux hydrodynamique uniquement dans les 6 premières chambres et dans les 6 dernières chambres, et qu'il y a absence totale de contraintes hydrodynamiques dans toutes les autres chambres que nous appelons "chambres centrales".

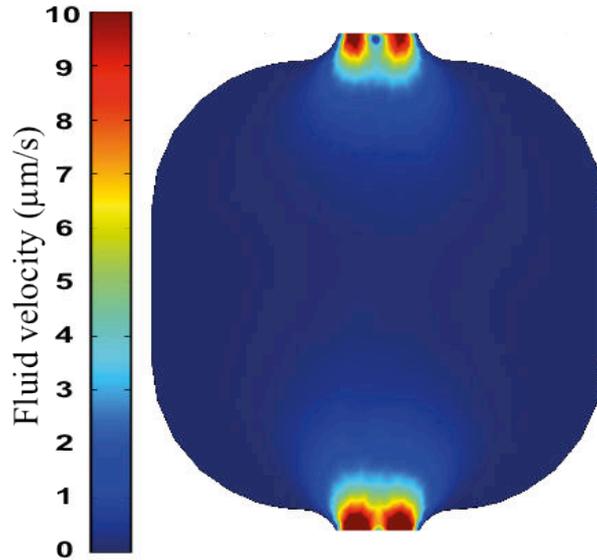


FIGURE 2.50 – Simulation numérique du champ de vitesses d'un fluide de viscosité $1,8 \cdot 10^{-3} Pa \cdot s^{-1}$ dans une chambre centrale avec une vitesse du fluide à l'entrée de la ligne de chambres fixée à $2400 \mu m \cdot s^{-1}$.

Nous avons réalisé une simulation afin d'observer plus finement le champ de vitesses au sein d'une chambre centrale (Figure 50). Nous avons fixé la vitesse du fluide en entrée de circuit à $2400 \mu m \cdot s^{-1}$ bien qu'en réalité nous ne pouvons dépasser les $1500 \mu m \cdot s^{-1}$ sous peine de fuites importantes. Malgré cela, le flux tombe bien à zéro dans la quasi totalité de la chambre. La géométrie du circuit permet donc une utilisation des chambres sans flux malgré de fortes vitesses de fluide dans le circuit.

Calibration du rapport advection/diffusion.

Rappelons l'expression du nombre de Peclet :

$$Pe = \frac{UL}{D} \quad (2.11)$$

Sachant que la viscosité de la solution utilisée est $1,8 \cdot 10^{-3} Pa \cdot s^{-1}$, en utilisant l'équation d'Einstein (2.3) (section 2.2.1), on peut calculer le coefficient de diffusion, à température ambiante, d'un monomère d'actine dont le rayon est environ 2 nm [180] : on trouve $D_{actineG} \approx 280 \mu m^2 \cdot s^{-1}$.

En moyennant les mesures et les simulations numériques des vitesses d'écoulement de la solution dans les chambres centrales 16 à 21 (voir Figure 37A) on obtient : $0.01 \mu m \cdot s^{-1}$ pour une vitesse en entrée de ligne égale

à $150 \mu m.s^{-1}$ et on obtient $0.25 \mu m.s^{-1}$ pour une vitesse en entrée de ligne égale à $1500 \mu m.s^{-1}$.

Donc, sachant qu'une chambre microfluidique fait $300 \mu m \times 300 \mu m$, avec une vitesse initiale dans CA1 égale à $150 \mu m$, on a : $Pe_{actineG} \approx 0.005$

avec une vitesse initiale dans CA1 égale à $1500 \mu m$, on a : $Pe_{actineG} \approx 0.13$

Sachant que nous travaillons plutôt avec une vitesse en entrée de ligne égale à $500 \mu m.s^{-1}$, le nombre de Peclet reste très petit devant 1, ce qui signifie que c'est bien la diffusion qui dirige le mouvement des molécules dans les chambres centrales du circuit microfluidique.

Calibration du renouvellement de la solution par diffusion dans les chambres centrales : Figures 40 et 41.

Nous effectuons l'expérience de la figure 28 mais en inversant la couleur des fluorophores : La solution 1 contient les fluorophores Alexa 568 (rouge) et la solution 2 contient les fluorophores Alexa 488 (vert). En relevant les signaux de fluorescence au cours du temps, nous obtenons les résultats montrés en figure 51.

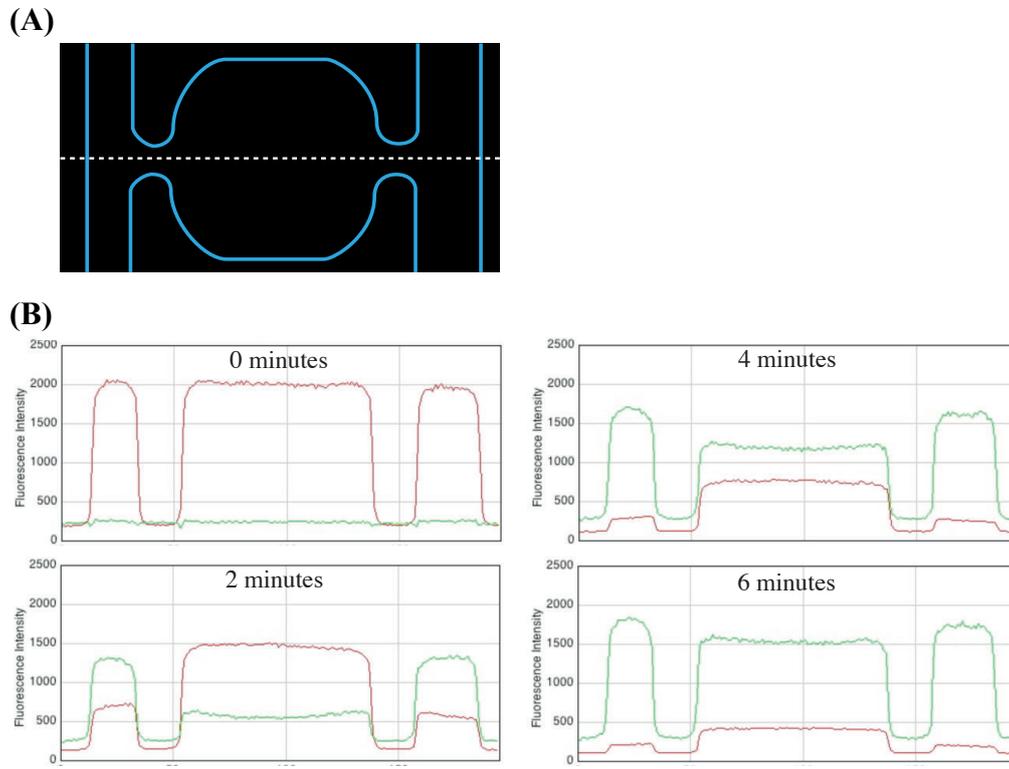


FIGURE 2.51 – (A) Schéma d’une chambre et ses canaux d’alimentation (délimitation des canaux microfluidiques par les lignes bleues) . Les mesures des signaux de fluorescence sont relevés le long de la ligne en pointillé blanc qui passe par le centre des ouvertures de la chambre. (B) Séquence au cours du temps de l’évolution du signal de fluorescence d’Alexa 568 (rouge) et du signal de fluorescence d’Alexa 488 (vert). Au temps $t = 0$ min la solution 2 arrive au niveau de la chambre.

En moyennant ces signaux de fluorescence et en les normalisant à 1, on obtient le graphique de la Figure 52.

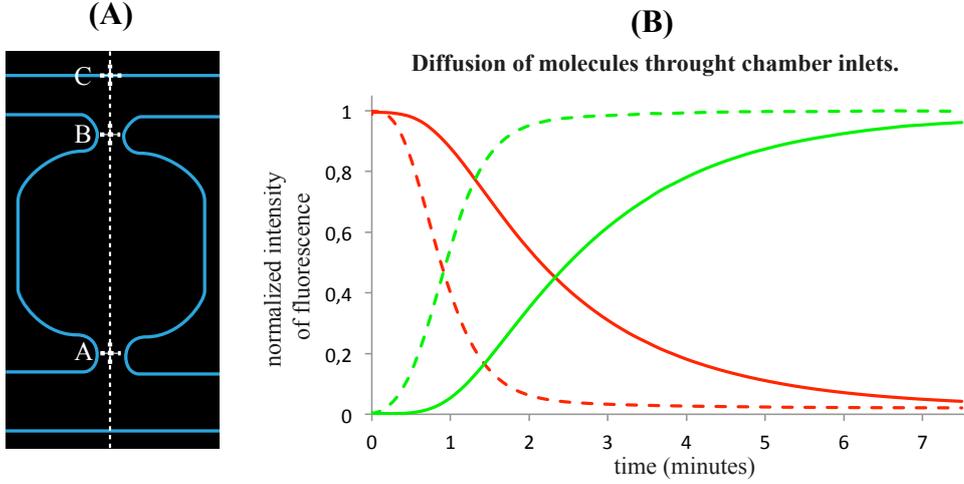


FIGURE 2.52 – (A) Le segment [AB] et le segment [BC] sont les portions de la ligne de mesure de la figure précédente sur lesquels les valeurs des signaux de fluorescence sont moyennés. (B) Représentation graphique des signaux de fluorescence d’Alexa 568 (rouge) et d’Alexa 488 (vert) moyennés sur le segment [AB] (lignes pleines) et moyennés sur le segment [BC] (lignes pointillées).

La diffusion des fluorophores de la chambre vers les canaux d’alimentation se fait à la même vitesse que leur diffusion depuis la chambre vers les canaux d’alimentation. Lorsqu’un soluté est présent dans les canaux d’alimentation à une concentration C et absent dans la chambre, on définira le temps de renouvellement par le temps pour que le soluté atteigne la concentration C dans la totalité de la chambre. Ici le temps de renouvellement pour la molécule Alexa est $t_{r,Alexa} \approx 7min$.

D’après les équations (2.2) et (2.3) de la section 2.2.1, et à gradient de concentration identique, on peut poser :

$$\frac{t_{actineG}}{t_{alexa}} \approx \frac{R_{actineG}}{R_{alexa}} \quad (2.12)$$

Avec : $t_{r,actine}$: Temps de renouvellement pour le monomère d’actine. [m]

$t_{r,Alexa}$: Temps de renouvellement pour la molécule alexa. [s]

R_{actine} : Rayon du monomère d’actine. [m]

R_{Alexa} : Rayon de la molécule Alexa. [m]

$t_{alexa} \approx 7minutes$; $R_{actineG} = 2.3 \text{ nm}$ [180]; $R_{alexa} = 0.6 \text{ nm}$ [58]. On peut donc estimer le temps de renouvellement de l’actine globulaire dans les chambres $t_{r,actine} \approx 27 \text{ minutes}$.

2.2.3 Contrôle de la cinétique de polymérisation du filament d'actine individuel

Principe de l'expérience

Nous utilisons le dispositif microfluidique adapté aux *SMR/IV* pour contrôler, dans le temps, la concentration en monomères d'actine dans le micro-environnement d'un filament d'actine individuel libre.

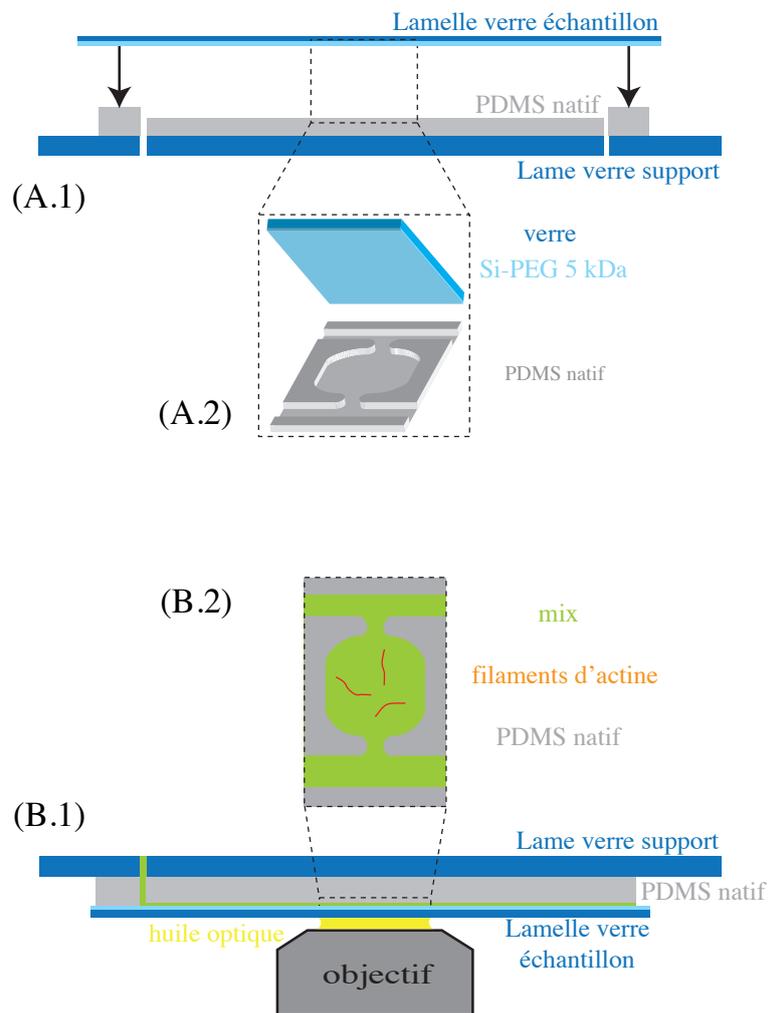


FIGURE 2.53 – (A.1) Schéma en coupe du montage du dispositif microfluidique. (A.2) Vue en perspective. (B.1) Schéma en coupe du dispositif microfluidique monté. (B.2) Vue de l'objectif du microscope d'une chambre microfluidique remplie du mix d'élongation (vert) contenant des filaments individuels (rouge) polymérisant sur la surface de Si-PEG 5 kDa.

La lamelle en verre qui referme le circuit microfluidique est recouverte d'une couche de Si-PEG (de poids moléculaire 5 kDa par chaîne de PEG) selon le *protocole 9*. Les filaments d'actine polymérisant se retrouvent en contact avec le PEG et n'adhèrent pas au verre. Les filaments d'actine qui polymérisent dans les chambres sans flux ont leurs deux extrémités libres et ne sont soumis qu'aux fluctuations thermiques contrairement aux filaments d'actine qui polymérisent dans les canaux d'alimentation qui sont soumis aux forces de cisaillement du flux laminaire présent. L'expérience consiste à modifier la concentration des monomères d'actine dans les chambres sans flux au cours de la polymérisation des filaments d'actine individuels. Cette modification s'accompagne d'une modification du fluorophore de marquage des monomères d'actine. L'observation se fait par microscopie de fluorescence à onde évanescente.

Protocole 9 (cf. Annexes) :
Dépôt de Si-PEG (5 kDa) sur une lamelle en verre.

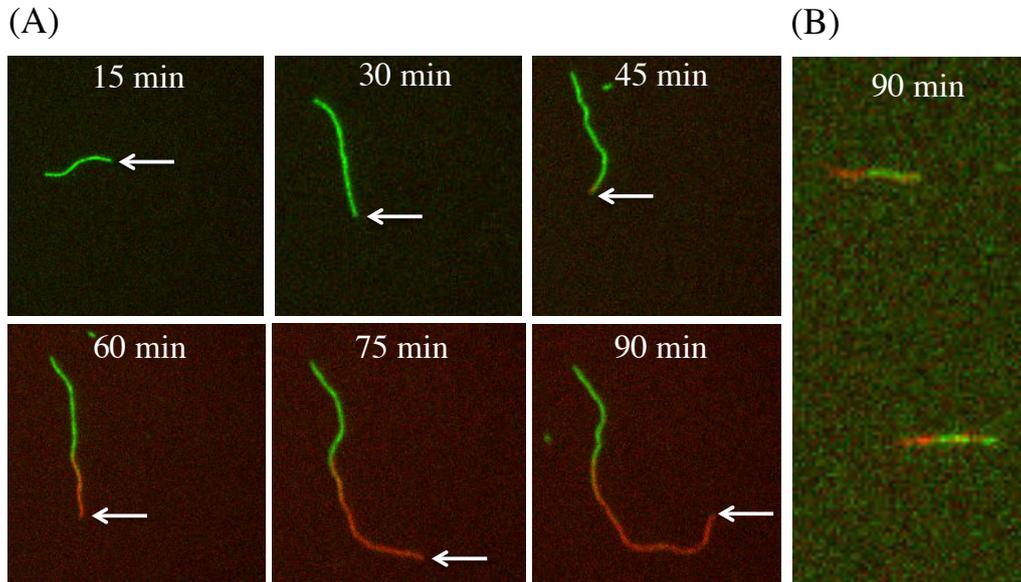
Résultats

FIGURE 2.54 – (A) Cinétique de polymérisation d'un filament d'actine individuel dans un micro-environnement modifié au cours du temps : Mix 1 ($t=0$) : $0,4 \mu M$ d'actine-G marqués par Alexa-488 ; Mix 2 ($t=45$ minutes) : $0,8 \mu M$ d'actine-G marqués par Alexa-568 ; Mix 3 ($t=85$ minutes) : $0 \mu M$ d'actine-G. Ces trois mix diffusent successivement dans la chambre sans flux. La flèche blanche indique l'extrémité barbée du filament d'actine. (B) Visualisation, à $t=90$ minutes, des filaments d'actine dans le canal d'alimentation adjacent à la chambre sans flux observée en (A). Imagerie : microscopie de fluorescence classique.

Par comparaison de 54A et 54B on se rend bien compte que l'environnement sans flux, que la chambre microfluidique offre, est indispensable pour renouveler les constituants biochimiques de la solution sans que les filaments soient perturbés. Aussi, nous avons ici un système qui permet de renouveler, en temps réel, la composition du micro-environnement biochimique sur un filament d'actine individuel dont les deux extrémités sont libres et qui n'est pas en adhérence avec la surface. Les résultats quantitatifs de cette expérience sont montrés sur les Figures 44 et 45.

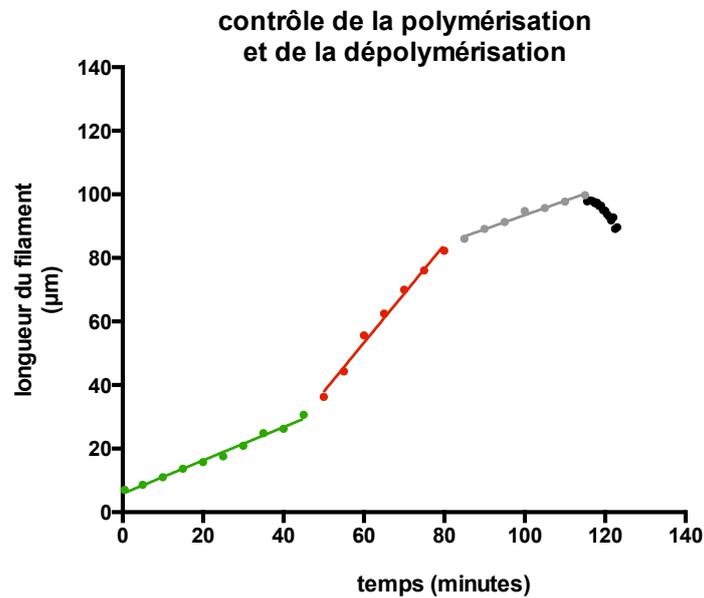


FIGURE 2.55 – Chaque point du graphique est une mesure de la longueur du filament. En vert : polymérisation du filament en présence du Mix 1 ; En rouge : polymérisation du filament en présence du Mix 2 ; en noir : dépolymérisation du filament en présence du Mix 3. les droites sont les régressions linéaires.

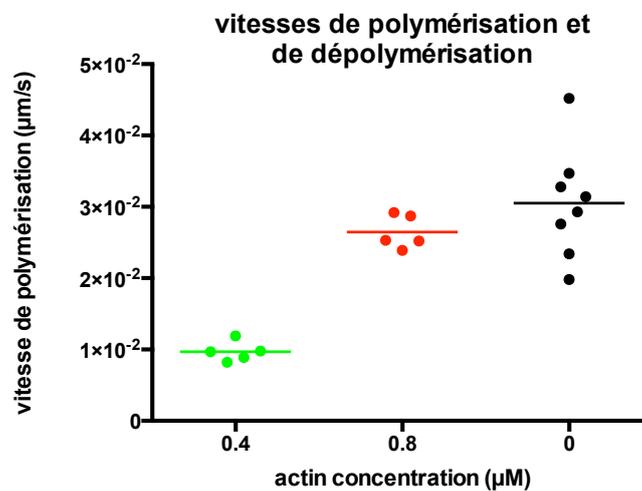


FIGURE 2.56 – Moyenne de la vitesse de polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine individuels dans les trois régimes : Mix 1 (vert), Mix 2 (rouge) et Mix 3 (noir). Chaque point représente la vitesse de polymérisation ou de dépolymérisation d'un filament d'actine dans le régime correspondant. Les lignes horizontales indiquent la valeur moyenne du groupe de points dans chacun des trois régimes.

Ces résultats prouvent qu'on est capable de contrôler la vitesse de polymérisation d'un filament d'actine libre *in vitro*, d'induire sa dépolymérisation et d'obtenir des données quantitatives des vitesses correspondantes. Le dispositif microfluidique est donc un bon outil de mesure pour toute étude dynamique du filament d'actine individuel, c'est le premier dispositif permettant de faire intervenir une protéine sur un filament d'actine libre (extrémité barbée et extrémité pointue soumises uniquement aux fluctuations thermiques) en cours de polymérisation ou de dépolymérisation. Il permet donc d'étudier tous les types d'interactions d'un filament d'actine individuel avec des protéines associées à l'actine.

Discussion

Une protéine interagissant sur l'extrémité ou sur le bord d'un filament d'actine peut modifier la conformation du filament d'actine. Ces modifications peuvent être des changements de conformation physique (conformation tridimensionnelle, longueur de persistance) et/ou des changements de conformation chimique (état nucléotidique des sous-unités monomériques). Par conséquent une protéine α intervenant sur le filament d'actine influence les affinités d'interaction d'une protéine β sur ce même filament d'actine.

La question générale qu'on peut se poser est la suivante : le filament d'actine aura-t-il la même conformation finale, dans le cas où la protéine α intervient avant la protéine β , et dans le cas où la protéine β intervient avant la protéine α ?

Plus précisément : Quelle est la portée d'une modification de conformation par une protéine le long du filament d'actine ? Autrement dit, si une protéine α interagit avec le filament à une abscisse curviligne x_α , jusqu'à quelle abscisse curviligne x_β cette protéine peut-elle influencer l'interaction d'une protéine β le long du filament d'actine ?

Une expérience classique (solution entre lame et lamelle) ne permet pas de répondre correctement à ces questions car toutes les protéines agissent en même temps et dès le début de la polymérisation du filament d'actine. Le contrôle temporel de la concentration massique des protéines dans les chambres microfluidiques sans flux peut nous permettre de répondre à de telles questions. En effet, le renouvellement de la solution rend possible l'étude du changement de l'ordre d'intervention des protéines dans le temps.

Aussi, en se plaçant à la concentration critique en monomères d'actine dans la chambre microfluidique, on pourrait reproduire le phénomène de "treadmilling" sur un filament individuel. La longueur d'un filament en régime de treadmilling est constante au cours du temps tout comme la longueur

de ses portions ATP, ADP-Pi et ADP. On pourrait donc facilement étudier la dynamique des interactions des protéines qui s'associent aux côtés des filaments d'actine en fonction de leur âge nucléotidique. Le système microfluidique pour les SMRIV est pour l'heure le seul système dans lequel ce type d'expérience est possible.

2.2.4 Contrôle de la cinétique d'assemblage des structures d'actine élémentaires

Principe de l'expérience

Nous couplons le dispositif microfluidique adapté aux SMRIV et le micropatterning WASP pour contrôler, dans le temps, la concentration en monomères d'actine dans le micro-environnement des architectures d'actine reconstituées.

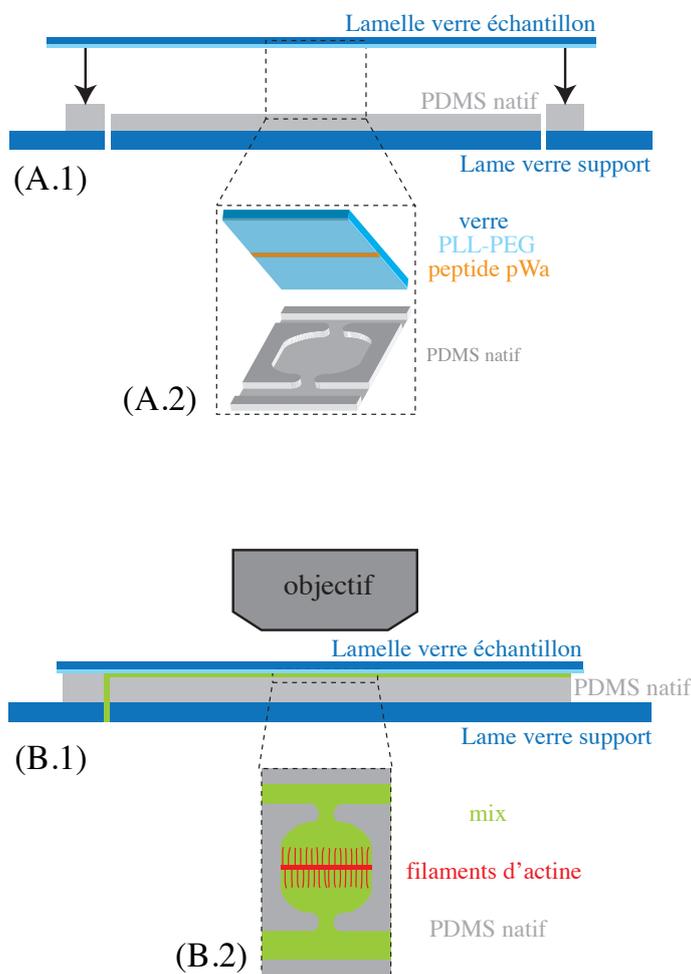


FIGURE 2.57 – (A.1) Schéma en coupe du montage du dispositif microfluidique. (A.2) Vue en perspective. (B.1) Schéma en coupe du dispositif microfluidique monté. (B.2) Vue de l'objectif du microscope d'une chambre microfluidique remplie du mix d'élongation (vert) contenant des filaments parallèles (rouge) issus d'un micro-pattern WASP et polymérisant sur une surface de PLL-PEG.

La lamelle en verre qui referme le circuit microfluidique est recouverte d'une couche de PLL-PEG selon le *protocole 10*. Des zones ont été insolées puis recouvertes du peptide WASP. Le complexe Arp2/3 contenu dans le mix d'élongation activé par les peptides WASP déclenche la nucléation des filaments d'actine qui polymérisent à partir de ces zones par leur extrémité barbée dans une direction perpendiculaire aux micropatterns WASP. Les filaments d'actine sont en contact avec le PEG et n'adhèrent donc pas au verre.

Protocole 10 (cf. Annexes) :
Dépôt d'une couche de PLL-PEG sur une lamelle en verre

Résultats

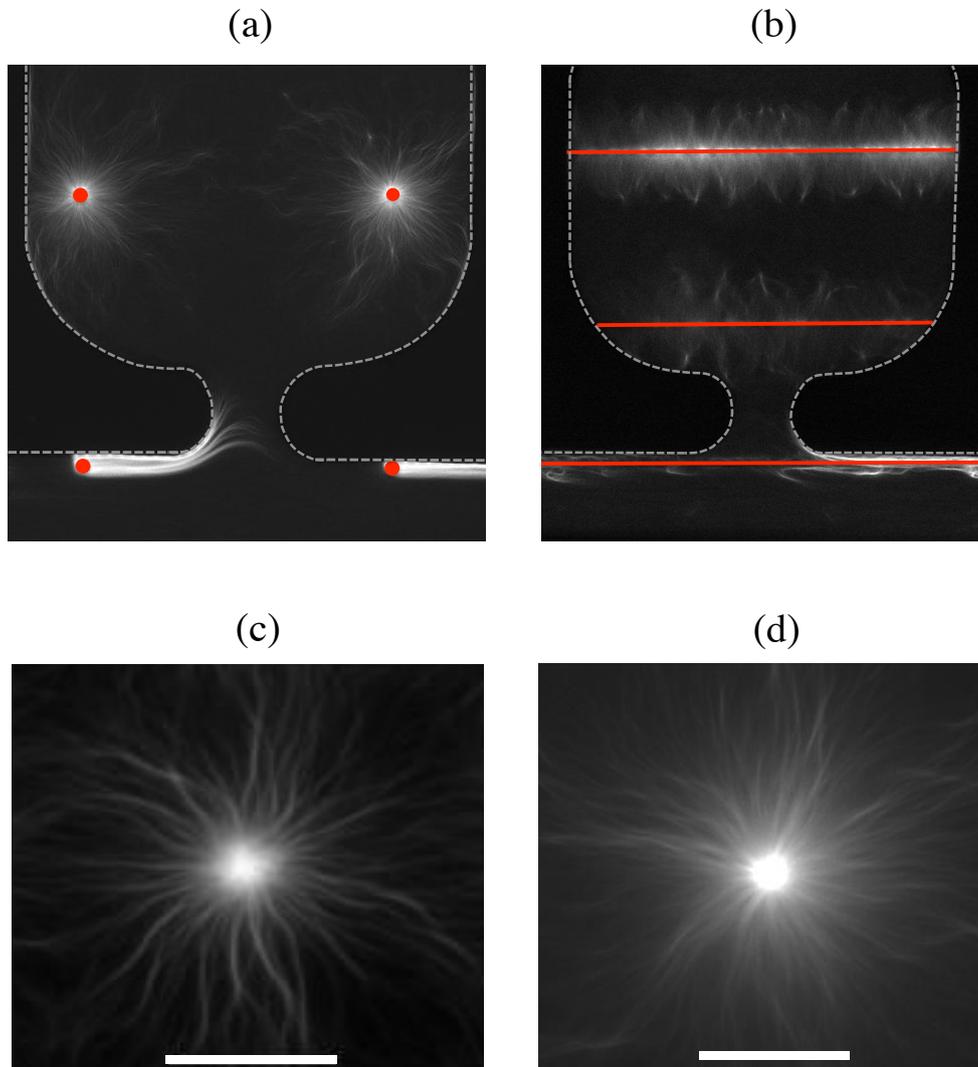


FIGURE 2.58 – Filaments d’actine issus de micropatterns WASP en disque (a) et en barres (b), dans une chambre sans flux et dans le canal d’alimentation adjacent. (c) Filaments d’actine issus d’un micropattern WASP en forme de disque dans le mix d’élargissement placé entre lame et lamelle (expérience *in vitro* classique). (d) Filaments d’actine issus d’un micropattern WASP en forme de disque dans le mix d’élargissement dans une chambre microfluidique sans flux. Barre d’échelle = $30 \mu\text{m}$ pour (c) et (d).

Figure 58 : En (a), (b) et (d) on observe que l’utilisation des chambres sans flux protège les architectures d’actine des effets de cisaillement de flux hydrodynamique. L’image (d) montre bien que les filaments d’actine ne sont

pas perturbés alors qu'en (c) on observe que les filaments d'actine ont tendance à coalescer sous l'effet des légers flux qui sont présents la plupart du temps dans une expérience classique entre lame et lamelle. Il est donc naturellement préférable d'utiliser les chambres sans flux pour les études des systèmes moléculaires reconstitués *in vitro*.

Aussi, on remarque, en (a), que les filaments issus des "micropatterns" nucléateurs soumis au flux laminaire dans les canaux d'alimentation restent malgré tout ancrés aux motifs par liaison au réseau branché présent sur la surface des micropatterns WASP. Ceci est potentiellement exploitable pour des études de forces hydrodynamiques contrôlées sur un réseau de filaments d'actine parallèles, nous verrons ça plus en détail dans la partie Perspectives de cette thèse (section 3).

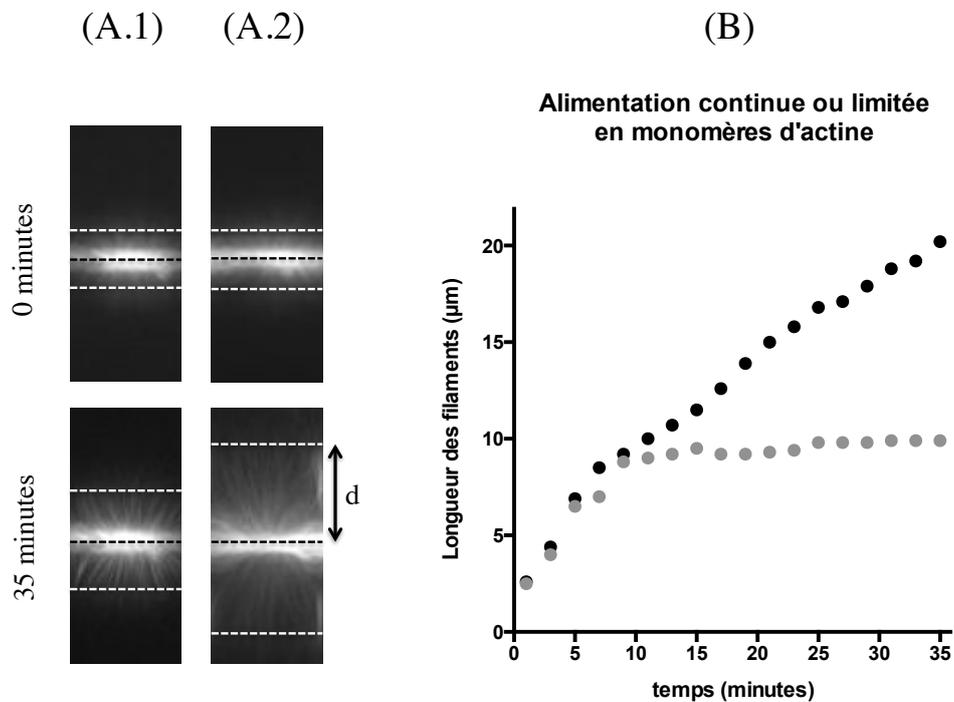


FIGURE 2.59 – (A.1) Elongation des filaments d'actine issus d'un micropattern WASP en barre dans une chambre sans flux et sans renouvellement des monomères d'actine. (A.2) Elongation des filaments d'actine issus d'un micropattern WASP en barre dans une chambre sans flux avec renouvellement permanent des monomères d'actine. (B) Graphique de la longueur "d" des filaments issus des micropatterns WASP, sans renouvellement des monomères d'actine (points gris) et avec renouvellement des monomères d'actine (points noirs).

Figure 59 : En (A.1) et en (A.2) la concentration en monomères d'actine est la même dans tout le circuit microfluidique (chambres et canaux d'alimentation). En (A.1) on a stoppé l'écoulement dans les canaux d'alimentation, ce qui équivaut à une expérience classique de polymérisation d'actine entre lame et lamelle où la quantité de monomères d'actine est limitée. En (A.2) la solution contenant les monomères d'actine s'écoule en permanence dans les canaux d'alimentation. Les structures d'actine dans les chambres sont donc alimentées de façon continue en monomères d'actine. Le graphique (B) montre qu'on peut induire une élongation quasi linéaire des filaments d'actine dans un réseau parallèle. Or jusqu'à maintenant, ce type d'étude qui se faisait entre lame et lamelle donnait rapidement lieu à un état stationnaire, les monomères d'actine y étant en quantité limitée.

Si on réalise le même type d'expérience que celle de la figure 53, mais cette fois-ci avec les réseaux de filaments d'actine parallèles à orientation identique générés par les micropatterns WASP, on obtient les résultats montrés sur la 60. La comparaison entre (A) et (B) montre que l'environnement sans flux de la chambre microfluidique est indispensable pour renouveler le micro-environnement biochimique sans perturber les structures d'actine reconstituées. L'image (C) est un autre exemple de géométrie structurale, l'expérience de renouvellement du micro-environnement est compatible avec toute forme géométrique de micropatterns. On peut donc dire qu'on a un couplage entre contrôle temporel (de la solution de polymérisation par la microfluidique) et contrôle spatial (de la géométrie de nucléation des filaments d'actine par le micropatterning). L'image (D) est une démonstration des performances du dispositif microfluidique : la diffusion à travers les deux ouvertures de la chambre permet de renouveler la solution biochimique de façon efficace, ici 3 perfusions séquentielles de la solution en 1 heure et 15 minutes. Les temps de renouvellement sont contrôlables grâce à l'utilisation du pousse-air de chez Fluigent. Lors d'un renouvellement, les monomères présents dans la chambre sans flux diffusent vers l'extérieur et les nouveaux monomères charriés dans les canaux d'alimentation diffusent vers l'intérieur de la chambre. Cet échange est caractérisé par le temps de renouvellement de la molécule échangée " $t_{molecule}$ " que l'on peut obtenir par la calibration que nous avons effectuée avec les molécules d'Alexa-Fluor (Figure 51).

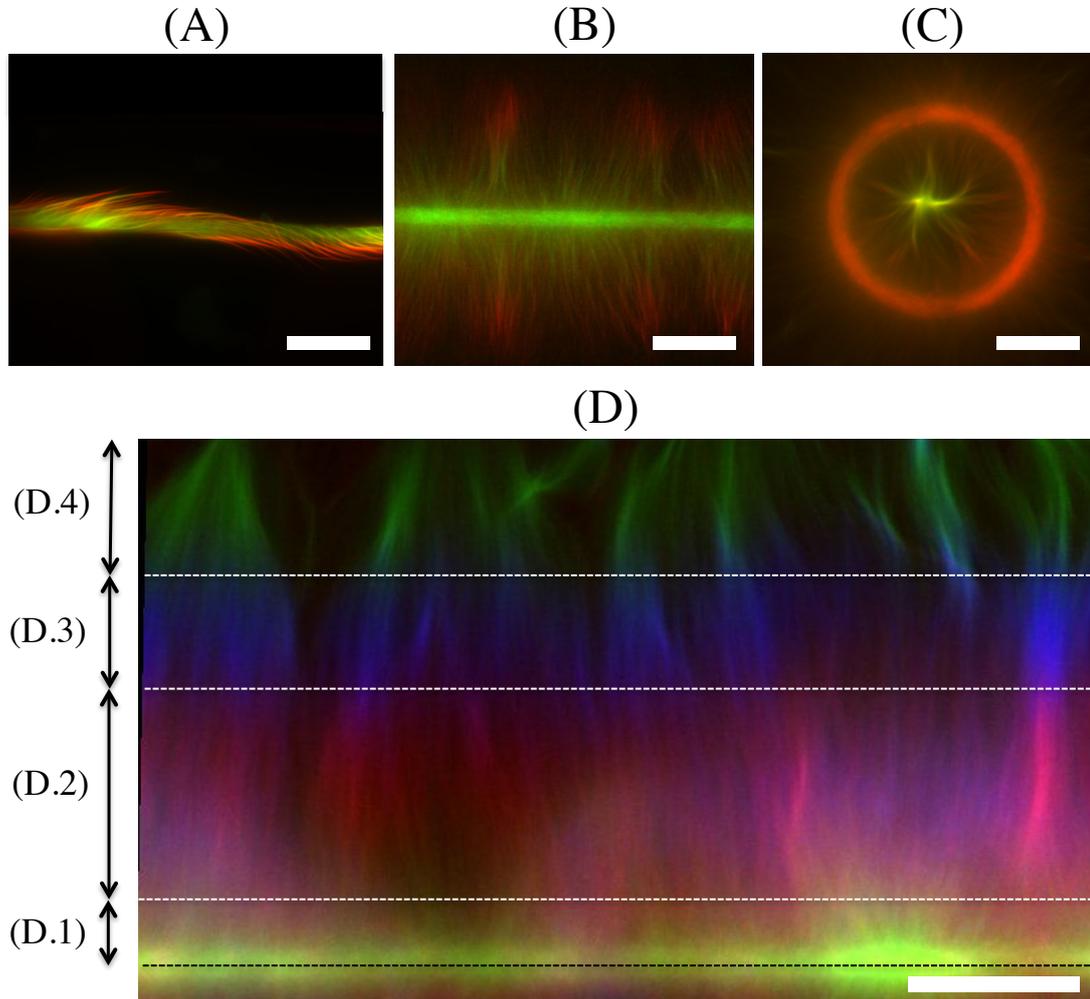


FIGURE 2.60 – (A),(B);(C) Renouvellement des monomères d’actine au cours de l’élongation de réseaux de filaments issus de micropatterns WASP. (A) Dans un canal d’alimentation. (B);(C) Dans une chambre sans flux. (A);(B) Mix 1 : actine globulaire marquée par Alexa-488 $2 \mu M$ (filaments d’actine verts), Mix 2 : actine globulaire marquée par Alexa-568 $2 \mu M$ (filaments d’actine rouges). (C) Mix 1 : actine globulaire marquée par Alexa-568 $2 \mu M$ (filaments d’actine rouges), Mix 2 : actine globulaire marquée par Alexa-488 $2 \mu M$ (filaments d’actine verts). (D) Renouvellements séquentiels des monomères d’actine au cours de l’élongation de filaments d’actine issus d’un micropattern WASP en forme de barre dans une chambre microfluidique sans flux ; (D.1) actine globulaire marqué par Alexa-488, 10 minutes d’élongation ; (D.2) actine globulaire marqué par Alexa-568, 30 minutes d’élongation ; (D.3) actine globulaire marqué par Alexa-647, 15 minutes d’élongation ; (D.4) actine globulaire marqué par Alexa-488, 20 minutes d’élongation. Barre d’échelle = $20 \mu m$ pour (A), (B), (C) et (D).

Les réseaux de filaments d'actine parallèles à orientation identique existent dans la cellule, les filopodes en sont un très bon exemple. Sur de telles structures, des protéines de liaison viennent associer les filaments d'actine entre eux de façon à augmenter leur rigidité mécanique. Pour étudier la dynamique de polymérisation et de dépolymérisation de ce type d'architecture, nous avons réalisé l'expérience suivante : dans une solution 1 nous avons ajouté une protéine de liaison croisée (la fascine) sur le réseau de filaments d'actine parallèles à orientation identique, puis nous avons renouvelé le micro-environnement par une solution 2 ne contenant pas la protéine de liaison croisée. La fascine lie les filaments dans leur partie la plus âgée et est absente dans leur partie la plus jeune. La partie la plus proche du "micropattern WASP" est mécaniquement rigide et la partie la plus éloignée est constitué de filaments libres. Nous avons ainsi reconstitué une structure "mécaniquement hétérogène". Les résultats sont montrés sur la Figure 61.

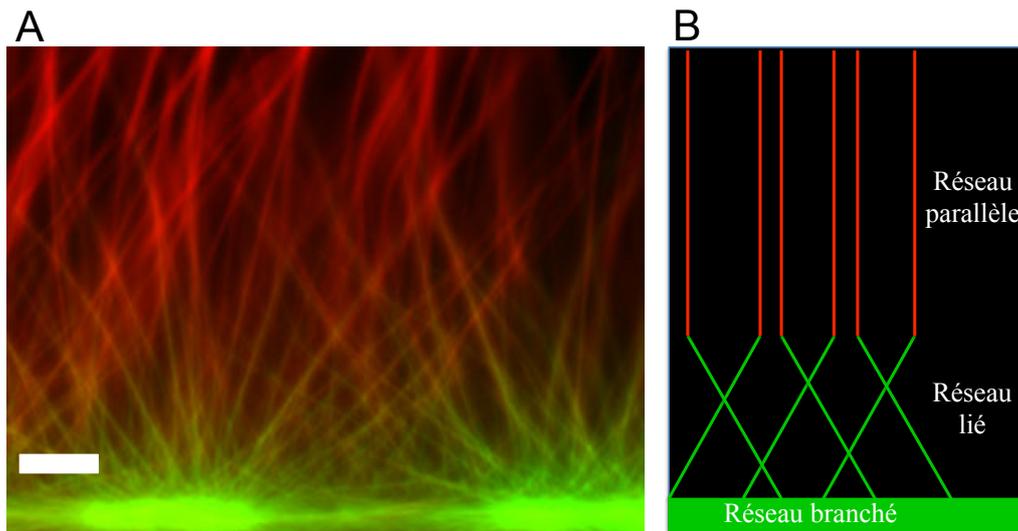


FIGURE 2.61 – A : Filaments d'actine issus d'un micropattern WASP en barre (barre verte en bas de l'image). Mix 1 ($t=0$ minutes) : fascine $1 \mu M$ et actine $2 \mu M$ marquée par Alexa-488 (vert) ; Mix 2 ($t=20$ minutes) : actine $2 \mu M$ marquée par Alexa-568 (rouge). Barre d'échelle $10 \mu m$. B : Schéma indiquant les différents réseaux émis.

Discussion

Filaments d'actine liés

Un objectif à court terme est de dépolymériser une structure mécaniquement hétérogène (Figure 61) afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle un réseau de filaments d'actine parallèles non liés (absence de protéines de liaison) dépolymérise plus rapidement qu'un réseau de filaments d'actine parallèles liés (présence de protéines de liaison croisée). Si tel est le cas, on peut penser que la cellule peut adopter une telle stratégie structurale pour protéger une partie d'un réseau de filaments parallèles de la dépolymérisation tout en gardant une partie plus dynamique propice à la formation de filopodes par exemple. nous avons opéré des essais préliminaires de dépolymérisation d'une telle structure en répétant l'expérience et en injectant après la solution 2 (mix 2), une solution 3 (mix 3) sans monomères d'actine ; seulement les filaments d'actine ne dépolymérisent pas. Pour résoudre ce problème d'efficacité de dépolymérisation, nous pouvons utiliser la latrunculine B qui séquestre les monomères libres en solution ou bien utiliser la microfluidique selon une autre approche que nous verrons dans les perspectives de la thèse (section 3).

On pourra aussi, dans une autre étude, se concentrer sur la phase de polymérisation dans l'édification d'une structure de filaments liés. En faisant varier au cours du temps la concentration en monomères d'actine et en gardant constante la concentration en protéines de liaison croisée, et *vice versa*, on observera directement l'effet de la vitesse de polymérisation des filaments d'actine sur l'efficacité de pontage des protéines de liaison, et *vice versa*. Et bien sûr nous pourrions corrélérer ces effets à l'organisation spatiale d'une architecture de filaments d'actine liés au cours de son édification.

Par ailleurs, le système microfluidique ne permet pas seulement d'ajouter des protéines à une structure, mais aussi d'en enlever. On pourrait alors étudier la réversibilité dans les processus d'assemblage et de désassemblage de ces architectures d'actine reconstituées *in vitro*.

Réseau branché et filopodes

Le lamellipode cellulaire est constitué essentiellement de filaments d'actines formant un réseau branché par l'association du complexe Arp2/3 et de la protéine WASP. Dans la cellule, les filopodes se forment au contact de la membrane plasmique à partir du réseau de filaments d'actine branchés.

Des formines et d'autres protéines comme la protéine VASP viennent former un complexe à l'extrémité barbée des filaments d'actine pour déclencher et accélérer la formation des filopodes. Nous voulons comprendre comment ces protéines sont intégrées spatio temporellement au réseau branché pour donner naissance aux filopodes. Pour cela, il convient de répondre à des questions clés :

- Premier axiome, la question de la coordination temporelle des protéines avec la construction du réseau branché : les protéines ont-elles le même effet dans l'édification et l'accélération d'un filopode si elles interviennent au début de la formation d'un réseau branché ou sur un réseau branché déjà plus dense ?
- Deuxième axiome : les protéines ne peuvent-elles jouer leur rôle dans la formation et l'élongation d'un filopode seulement si ce dernier a déjà obtenu l'architecture qui lui est propre, à savoir un regroupement stériquement compact de filaments d'actine parallèles et d'orientation identique ?
- Troisième axiome, cet axiome plus général pose la question de l'ordre séquentiel d'intervention et de retrait des protéines sur un réseau branché ou sur un réseau parallèle : la protéine VASP doit-elle intervenir avant ou après la formine pour former un filopode ? Ou encore la protéine VASP doit-elle laisser la place à la formine pour former un filopode ?

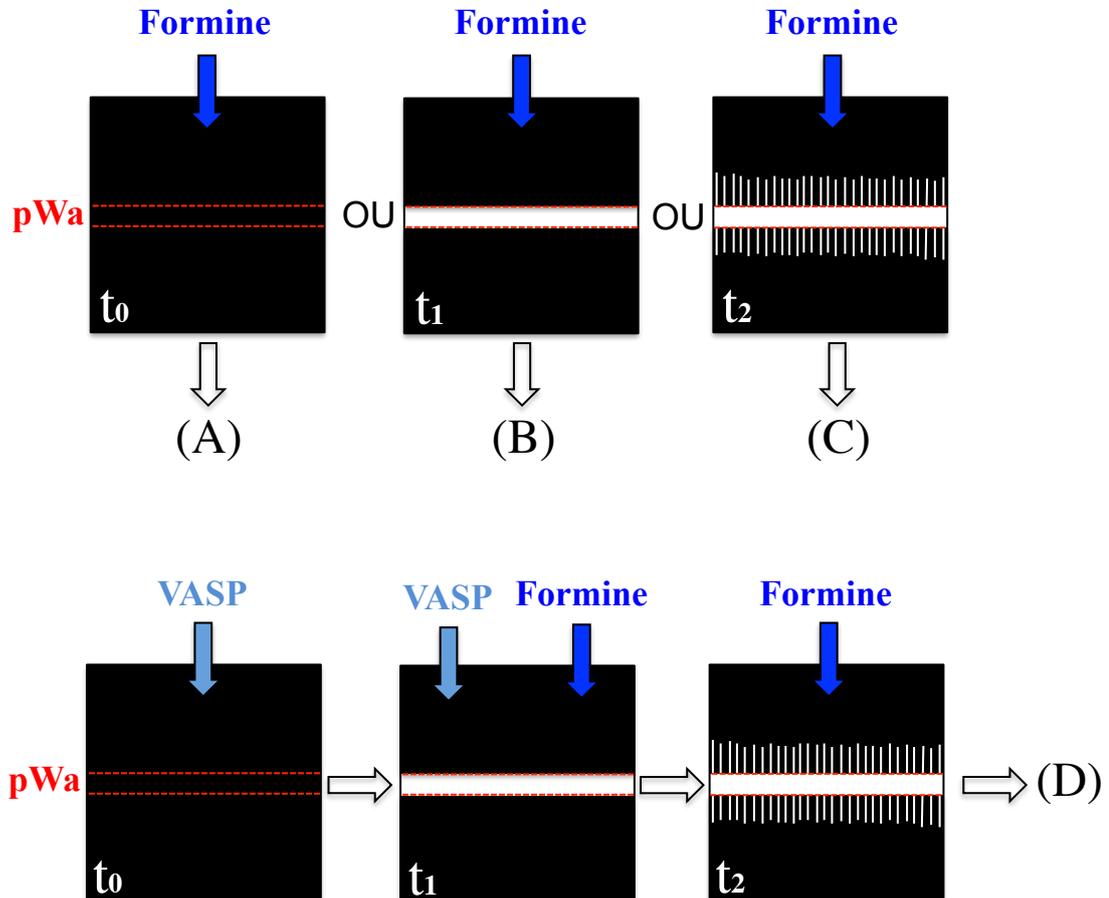


FIGURE 2.62 – (A) Résultat obtenu après intervention des formines au temps t_0 : dès le début de la formation du réseau d'actine branché sur la surface du micropattern WASP (délimité par les deux lignes pointillée rouges). (B) Résultat obtenu après intervention des formines au temps t_1 : au moment où le réseau branché est totalement formé sur la surface "micropatternée" (actine représentée en blanc) avant que les filaments commencent à sortir du micropattern. (C) Résultat obtenu après intervention des formines au temps t_2 : quand les filaments qui sont sortis du micropattern ont atteint quelques micromètres. (D) Résultat obtenu après intervention successive de : VASP seule au temps t_0 ; VASP + formine au temps t_1 ; Formine seule au temps t_2 .

Nous voyons bien que les questions posées dans les trois axiomes sont interdépendantes. Mais il convient d'y répondre d'abord séparément et ensuite de mettre en relation les éléments un à un, en complexifiant le système petit à petit : c'est la méthode bottom-up. En fermant le circuit microfluidique de chambres sans flux par nos échantillons contenant les micropatterns WASP, nous sommes en mesure de répondre à l'ensemble de ces questions. En effet,

comme décrit par les figures 4 et 5, les micropatterns WASP génèrent un réseau branché de filaments d'actine qui génère à son tour un regroupement stériquement compact de filaments d'actine parallèles et de polarité identique, tout comme dans un filopode. Donc en contrôlant les temps d'arrivée et la concentration des protéines d'intérêt (formines, VASP) et sachant que nous pouvons faire cohabiter Arp2/3 et mDia dans une même solution (figures 11 et 12), on peut imaginer les expériences schématisées par la figure 62 qui permettent d'expérimenter les trois axiomes mentionnés. Les résultats (A) et (B) nous permettront de répondre au premier axiome. Le résultat (C) nous permettra de répondre au deuxième axiome. Le résultat (D) nous permettra de répondre au troisième axiome. Pour répondre de façon complète au troisième axiome, il conviendra de changer l'ordre et la composition des groupes de protéines que l'on fait intervenir.

En répondant aux trois axiomes, nous serons plus à même de connaître le groupe de protéines nécessaire et suffisant pour former un filopode cellulaire ainsi que l'ordre temporel d'apparition et de disparition des différentes protéines qui permet la formation d'un filopode cellulaire. L'association entre le contrôle spatial du recrutement du complexe Arp2/3 par le micropatterning WASP et le contrôle temporel de l'intervention des formines et de VASP peut nous permettre de mieux répondre au débat entre le modèle de convergence et le modèle de nucléation quand à la maturation d'un filopode cellulaire.

2.2.5 Contrôle temporel de la contraction de l'anneau de cytokinèse

Rappelons que nous n'avons pu induire la contractilité de l'anneau de cytokinèse *in vitro* en travaillant entre lame et lamelle (figures 14 et 15). Or, les simulations numériques de la figure 17 nous ont montré qu'il fallait, pour y parvenir, faire intervenir les moteurs moléculaires au moment où les anneaux de filaments d'actine ont atteint leur état stationnaire. Le dispositif microfluidique pour les SMRIV peut nous permettre de vérifier cette hypothèse et de soulever ainsi la question suivante : par quels mécanismes la cellule régule-t-elle dans le temps le recrutement des myosines sur l'anneau de cytokinèse ? Après avoir répondu à cette question, on pourra ajouter les autres protéines impliquées dans l'assemblage et la contraction de l'anneau de cytokinèse *in vitro* et continuer ainsi la démarche bottom-up.

2.2.6 conclusion

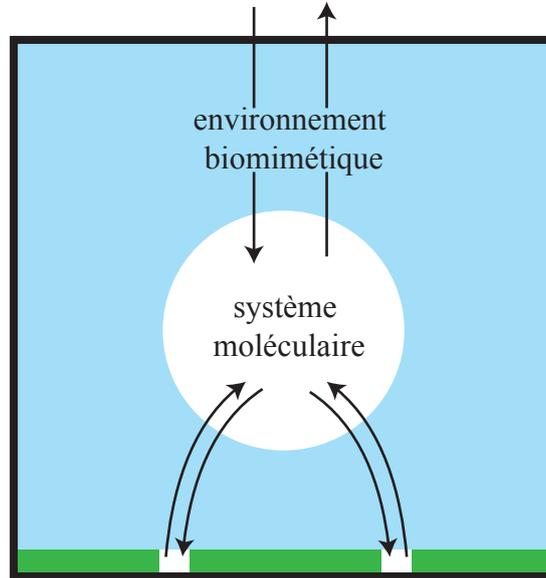


FIGURE 2.63 – Couplage micropatterning/microfluidique et SMRIV : Zones vertes : zones non-adhérentes (PEG). Carrés blancs : bio-molécules fixées. Le SMRIV (cercle blanc) s’organise en fonction des constituants moléculaires fixés sur la surface de l’échantillon (par le micropatterning) et en fonction du renouvellement des composés biochimiques dans l’environnement biomimétique (par la microfluidique).

La réunion de la microfluidique et du micropatterning de surface nous a permis d’obtenir un couplage entre le contrôle spatial des sous-systèmes d’actine reconstituées *in vitro* et le contrôle temporel de leurs constituants biochimiques dans un micro-environnement sans contraintes hydrodynamiques.

2.3 Adaptation du circuit à chambres sans flux pour la culture des cellules non-adhérentes

Après avoir finalisé le dispositif microfluidique pour les SMRIV, j'ai pu développer, en gardant la géométrie des chambres sans flux, une puce adaptée pour l'étude des cellules *in vitro* ou "CIV". Les CIV s'adressant à un bien plus large public que les SMRIV, le micro-environnement sans flux des chambres du circuit microfluidique s'avère très utile et particulièrement bien adapté, notamment pour l'étude des cellules non-adhérentes.

2.3.1 Une puce à cellules : *Brevet*

La mise au point de la puce à cellules s'est faite dans un souci de simplicité et de rapidité d'utilisation de façon à faciliter son usage en laboratoire.

Brevet (cf. Annexes) :
Cambier T. et al. 2015.

La puce à cellules en détails

Circuit

La géométrie du circuit microfluidique de la puce à cellule est la même que celle du dispositif pour les SMRIV à la différence près de l'agencement des canaux d'entrée dans les lignes de chambres (Figure 64). Ces derniers sont fins ($200 \mu m$) de façon à éviter la sédimentation et l'agglutination des cellules qui provoquent des bouchons. Avec une densité de cellules adéquate, on peut y voir les cellules passer en file indienne. Il y a deux "inlets" (deux réservoirs d'entrée) pour pouvoir tester deux conditions biochimiques différentes sur la population cellulaire présente dans la puce microfluidique.

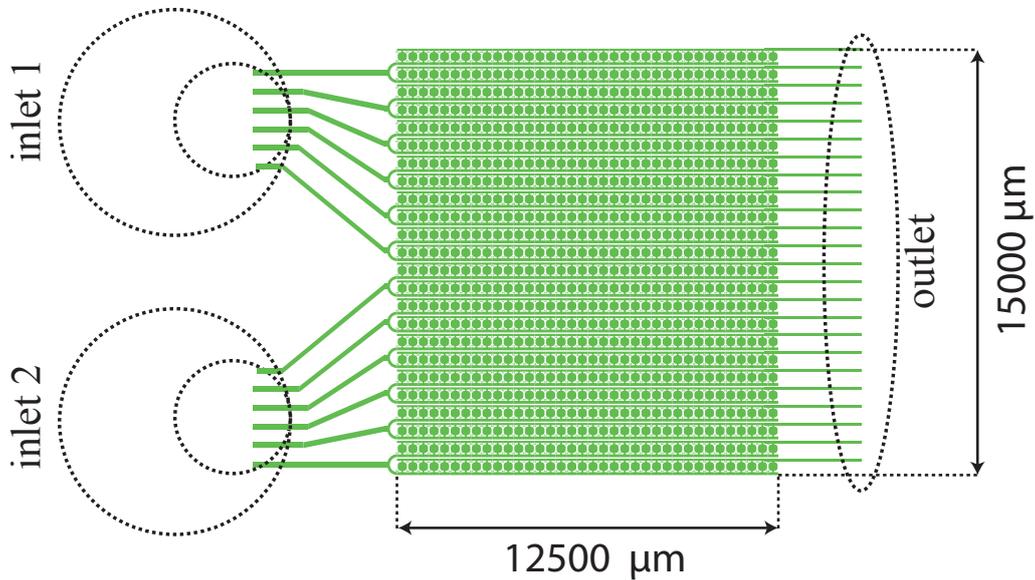


FIGURE 2.64 – Géométrie en deux dimensions du circuit microfluidique pour les CIV. Les canaux d’entrée dans les lignes de chambres font $200 \mu m$ de largeur. Ces canaux d’entrée sont séparés en deux groupes correspondant à deux réservoirs : l’inlet 1 et l’inlet 2. Les petits cercles et les grands cercles en pointillé noir représentent respectivement la taille minimum et la taille maximum des réservoirs cylindriques adaptables au circuit microfluidique : le diamètre minimum étant de 4 mm et le diamètre maximum étant de 8 mm. L’outlet, représenté par l’ovale noir en pointillé, est l’ensemble des sorties CA2 des lignes de chambres.

Puce

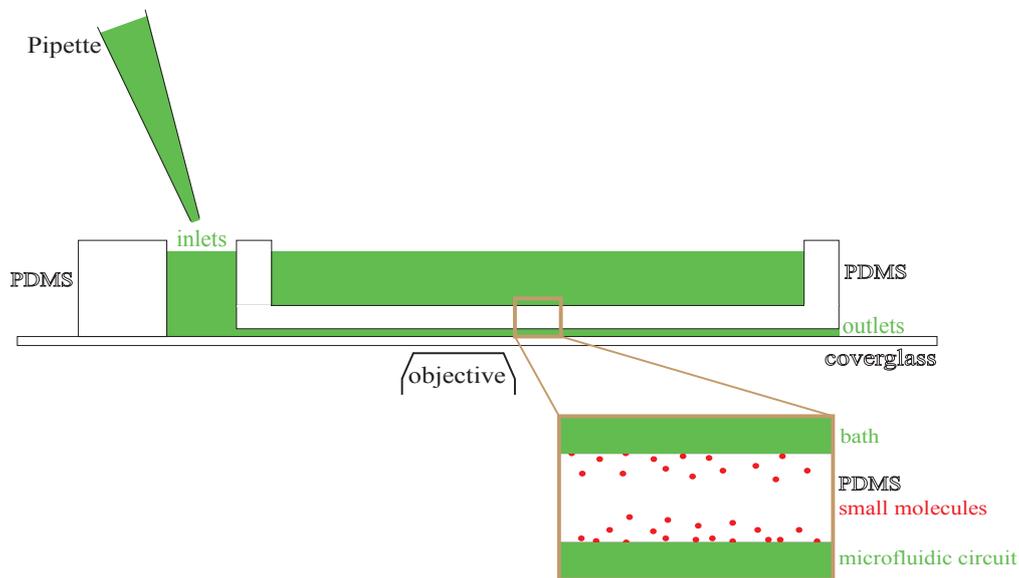


FIGURE 2.65 – Schéma en coupe de la puce microfluidique pour les CIV.

Un bloc de PDMS contient le circuit microfluidique à sa surface inférieure et contient deux réservoirs d'entrée (comme dit précédemment) qui le traversent. Ces deux réservoirs cylindriques sont centrés sur les deux groupes de canaux d'entrée comme l'indique la figure précédente, ils sont percés avec un emporte-pièce et ont un diamètre qui peut aller de 4 à 8 mm de diamètre. Un bain ouvert sur l'environnement extérieur surplombe le circuit microfluidique. Ce dernier est fermé par une lamelle en verre, soit par simple contact (liaison réversible), soit par liens covalents après un traitement plasma O_2 de la surface de PDMS et de la lamelle en verre. Le milieu de culture des cellules est essentiellement composé d'eau, sa viscosité est donc de 1 mPa.s. La force hydrostatique créée par la différence de hauteur de fluide entre les réservoirs d'entrée et le réservoir de sortie suffit à remplir les chambres microfluidiques et à établir un écoulement permanent dans les canaux d'alimentation. Il n'est donc pas nécessaire d'associer un système d'injection externe comme sur le dispositif pour les SMRIV. Le remplissage des chambres microfluidiques ainsi que leur renouvellement se fait en utilisant une simple pipette.

Le PDMS est un matériau poreux. Les molécules de taille importante (protéines) diffusent peu à travers le PDMS mais les molécules de petite taille (eau et gaz) diffusent très bien dans un bloc de PDMS. A $37^\circ C$, le coefficient de diffusion de O_2 est de $2000 \mu m^2 \cdot s^{-1}$ dans l'eau, et de $1900 \mu m^2 \cdot s^{-1}$ dans le PDMS. Le coefficient de diffusion d' H_2O est de $2100 \mu m^2 \cdot s^{-1}$ dans

l'eau, et de $1000 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ dans le PDMS. la surface d'échange entre la solution contenue dans une chambre et la solution des canaux d'alimentation est de $2000 \mu\text{m}^2$ et la surface d'échange entre la solution contenue dans une chambre et le PDMS est de $90000 \mu\text{m}^2$. Donc, sans bain au dessus du circuit microfluidique (en considérant un gradient moléculaire identique entre les canaux d'alimentation et la chambre, et entre la chambre et le PDMS) les petites molécules contenues dans la solution s'échappent des chambres microfluidiques plus rapidement qu'elles n'y entrent : 43 fois plus rapidement pour O_2 et 21 fois plus rapidement pour H_2O . Les pertes sont donc considérables. Mais avec la présence d'un bain contenant une solution iso-osmotique, on peut recréer un équilibre de diffusion des petites molécules : sur le zoom de la figure 65, les petites molécules sont représentées par des points verts qui sont issus à la fois de la solution du circuit et de la solution du bain. Ainsi, avec ce bain iso-osmotique, on contrôle de façon stable la concentration des composés chimiques et biochimiques dans les chambres de travail.

Protocole 11 (cf. Annexes) :

Montage et utilisation de la puce à cellules avec plafond de PDMS fin (membrane de moins de $200 \mu\text{m}$ d'épaisseur) par la méthode plasma

Protocole 12 (cf. Annexes) :

Montage et utilisation de la puce à cellules avec plafond de PDMS épais ($500 \mu\text{m}$ d'épaisseur) par la méthode plasma et par la méthode simple contact

Les calibrations de la puce

N'ayant pas eu le temps nécessaire pour calibrer cette puce à cellules comme nous le souhaitions, je présente ici les tests importants que nous avons faits et la liste des calibrations que nous comptons faire par la suite.

Calibration du remplissage des chambres : voir Figure 29.

Comme dit précédemment, on peut fermer le circuit microfluidique par deux méthodes : par un traitement préalable au plasma O_2 ou par simple contact. Avec un traitement au plasma O_2 , le remplissage des chambres microfluidiques ne nécessite aucune pression d'entrée, il se fait par l'action des forces d'hydrophobicité agissant sur le fluide par les surfaces inférieures et supérieures traitées au plasma. Avec cette méthode, on peut donc remplir

les chambres avec de très faibles volumes. Mais, si on veut réaliser une expérience avec une lamelle en verre microstructurée chimiquement et/ou biochimiquement, l'unique méthode possible pour préserver totalement les microstructures est le "simple contact" (ou liaison réversible). Nous avons testé la faisabilité du remplissage des chambres avec cette méthode et il s'avère que le remplissage est efficace à 80 % avec une lamelle en verre fonctionnalisée au PLL-PEG et un volume de milieu de culture de 150 μL placé dans un réservoir d'entrée de 6 mm de diamètre.

Pour amener cette efficacité de remplissage à 100 %, c'est-à-dire cent pour cent des chambres remplies, il faudra tester différentes hauteurs de canaux : 10 μm ; 20 μm ; 40 μm . Il faudra aussi tester différentes vitesses de fluide en entrée de circuit.

Calibration de la vitesse du fluide en entrée de circuit

Le second travail de calibration consistera à évaluer la vitesse d'écoulement du fluide dans les conduites microfluidiques en fonction :

- de la différence de hauteur de fluide entre les réservoirs d'entrée et la sortie,
- de la hauteur du circuit microfluidique,
- du diamètre des réservoirs (qui jouera aussi sur la vitesse d'écoulement car à ces échelles, les forces capillaires sont non-négligeables devant les forces de gravité).

Calibration du PH au sein d'une chambre

En utilisant des indicateurs fluorescents de PH, nous pourrions calibrer l'équilibre du PH du milieu de culture cellulaire contenu dans une chambre en fonction :

- de l'épaisseur de PDMS entre les chambres et le bain iso-osmotique,
- de la présence de milieu tamponné dans le bain iso-osmotique,
- de la vitesse d'écoulement du milieu dans les canaux d'alimentation.

Calibration de la flexibilité du plafond de PDMS

FIGURE 2.66 – Visualisation en microscopie à contraste de phase, de l'affaissement du PDMS sur le fond des chambres microfluidiques.

L'épaisseur h du plafond de PDMS est établie en appliquant la technique du "spin-coating" pour créer un film fin de PDMS directement sur le moule microstructuré. De cette manière nous sommes parvenus à des épaisseurs de plafond de PDMS d'une cinquantaine de micromètres. A ces épaisseurs là, le PDMS devient si flexible qu'il s'étale sur le fond des chambres sous l'effet de son propre poids comme le montre la figure 66.

Cette épaisseur h peut être correctement modélisée par l'expression empirique suivante :

$$h = kC \left(\frac{\mu}{w^2} \right)^{1/3}$$

C : concentration initiale de polymères dans la solution.

k : constante de calibration.

w : vitesse de rotation angulaire ("spin-coating").

μ : viscosité.

La raideur du plafond de PDMS devra être calibré en fonction de son épaisseur h pour des études mécaniques des cellules contenues dans les chambres [29, 107] mais aussi pour permettre à une aiguille de traverser le PDMS pour s'offrir la possibilité de récupérer les cellules après un éventuel traitement.

2.3.2 Compatibilité de la puce pour la culture et l'observation des cellules

Afin de valider la compatibilité de cette puce avec la culture des cellules non-adhérentes, nous y avons cultivé des lymphocytes T (Jurkats) et des cellules souches hématopoïétiques (CSHs). Les expériences de culture à long terme et les mesures que nous avons faites nous ont montré la qualité des analyses dimensionnelles et temporelles que la puce à cellules permet de réaliser.

Jurkats

Injection des cellules

On remplit le réservoir d'entrée par une suspension de lymphocytes T, le remplissage des chambres par les cellules se fait en quelques minutes.

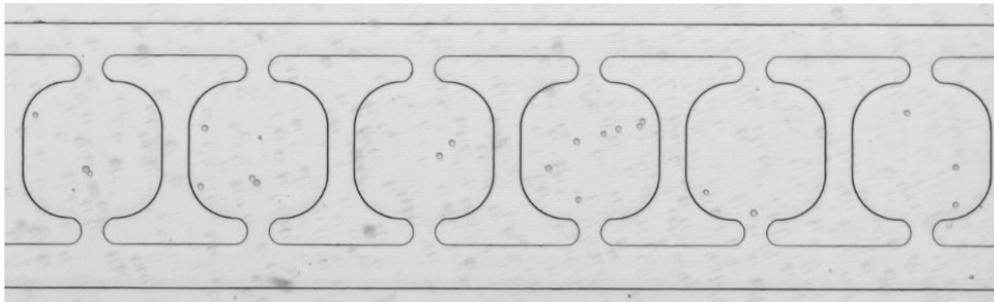


FIGURE 2.67 – Répartition des lymphocytes T dans les chambres sans flux de la puce microfluidique après injection dans le réservoir d'entrée. Les cellules sont injectées dans le milieu de culture DMEM (1X) GlutaMAX-1. Le milieu est renouvelé dans le réservoir d'entrée de la puce toutes les 6 heures. La puce est placée dans un incubateur humidifié à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec 5 % de CO_2 et 95 % d'air.

La répartition du nombre de cellules par chambre (qui dépend de la densité de cellules introduites dans le réservoir d'entrée) est assez homogène avec environ 10 % des chambres qui contiennent une cellule individuelle. Les cellules restent immobiles dans les chambres sans flux et ne restent pas bloquées dans les canaux d'alimentation.

Suivi des divisions cellulaires à long terme

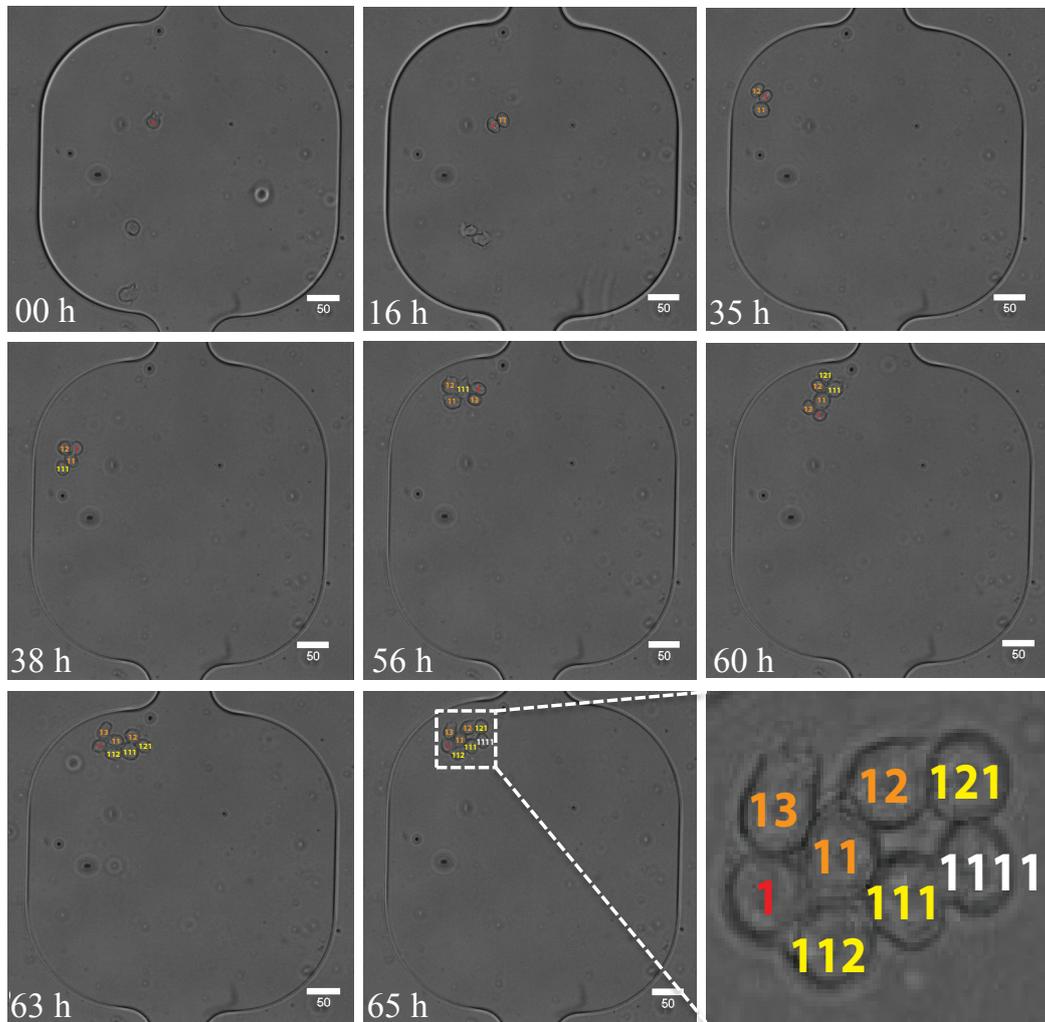


FIGURE 2.68 – Séquence au cours du temps (en jours : heures : minutes) de la prolifération d'un lymphocyte T individuel dans une chambre sans flux. Les cellules sont numérotées avec le code couleur suivant : première génération : rouge ; deuxième génération : orange ; troisième génération : jaune ; quatrième génération : blanc. Observation en lumière blanche transmise.

En microscopie à contraste de phase on est capable de suivre les mouvements des cellules au cours du temps (Figure 68). Aussi, la hauteur des chambres étant de $20 \mu m$ et le diamètre typique d'un lymphocyte T étant de $15 \mu m$, les cellules ne se chevauchent pas. Il est donc aisé de les repérer individuellement et de leur attribuer un numéro. Ce numéro contient les

informations suivantes : nombre de divisions qu'a effectué la cellule depuis le début de l'expérience et identité de la cellule mère sachant que la cellule mère de départ porte un numéro à un chiffre. Le suivi des cellules est rendu possible à long terme car du milieu frais est perfusé de manière continue dans les chambres microfluidiques par les canaux d'alimentation.

A partir des données de la figure 68 on peut construire l'arbre de pedigree d'une cellule individuelle qui donne une représentation de la dynamique de ces divisions (Figure 69).

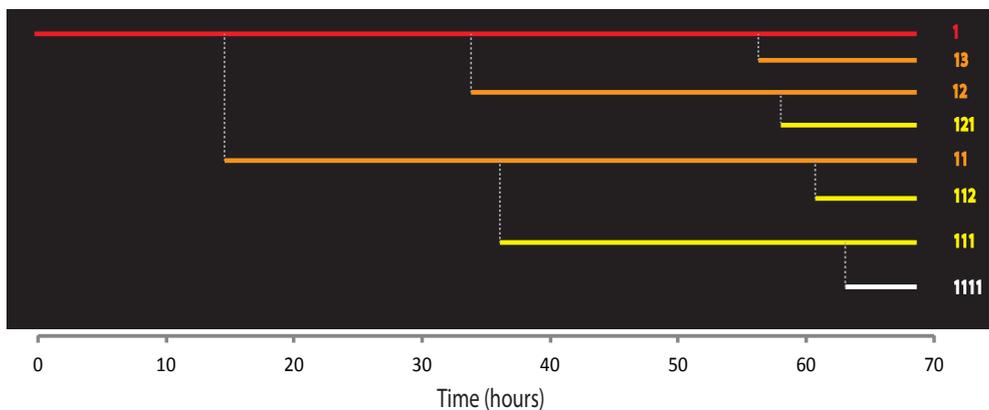


FIGURE 2.69 – Arbre de pedigree du lymphocyte T numéroté 1 sur la Figure 53. Les cellules sont numérotées de la façon suivante : première génération : 1 chiffre ; deuxième génération : 2 chiffres ; troisième génération : 3 chiffres ; quatrième génération : 4 chiffres. Les lignes blanches verticales représentent les divisions cellulaires.

Mesure des fluctuations temporelles du diamètre des cellules

Nous avons effectué des analyses dimensionnelles sur les lymphocytes T dans les chambres en mesurant leurs diamètre dans l'idée de déterminer si ce type de paramètre est constant ou fluctuant sur l'échelle de temps de l'expérience. Les figures 59, 60 et 61 montrent les résultats obtenus. Les valeurs exposées sur ces figures sont mesurées tout au long de la prolifération des cellules dès leur injection dans les chambres microfluidiques. L'analyse a été réalisée sur dix chambres sans flux réparties sur toute la puce microfluidique. La mesure du diamètre des cellules mères est réalisée dans les trois minutes qui précèdent sa division et la mesure du diamètre des deux cellules filles générées est réalisée dans les trois minutes après la division.

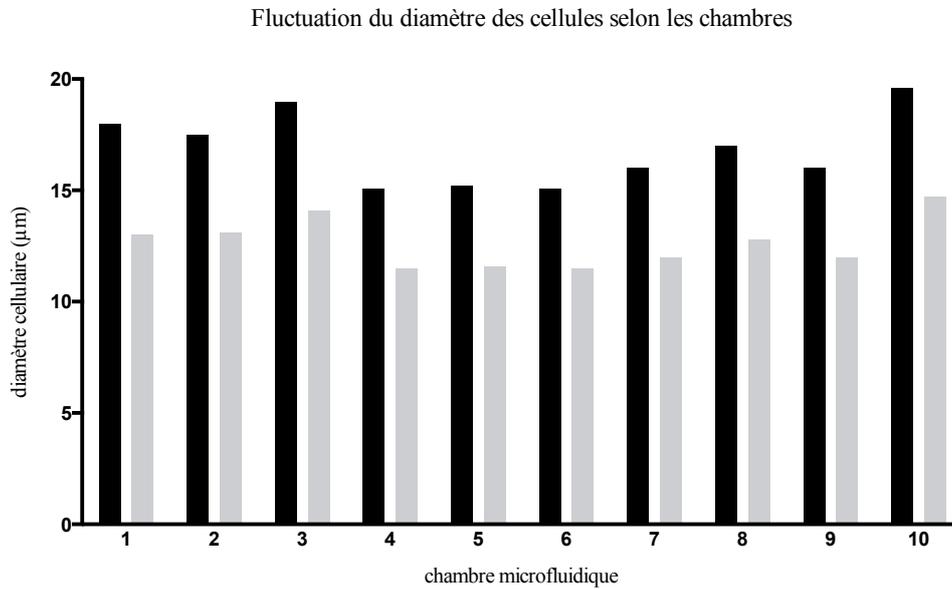


FIGURE 2.70 – Histogramme des deux valeurs suivantes : *diamètre d'une cellule mère* (barres noires) et *diamètre moyen de ses deux cellules filles* (barres grises), valeurs moyennées dans chaque chambre sans flux.

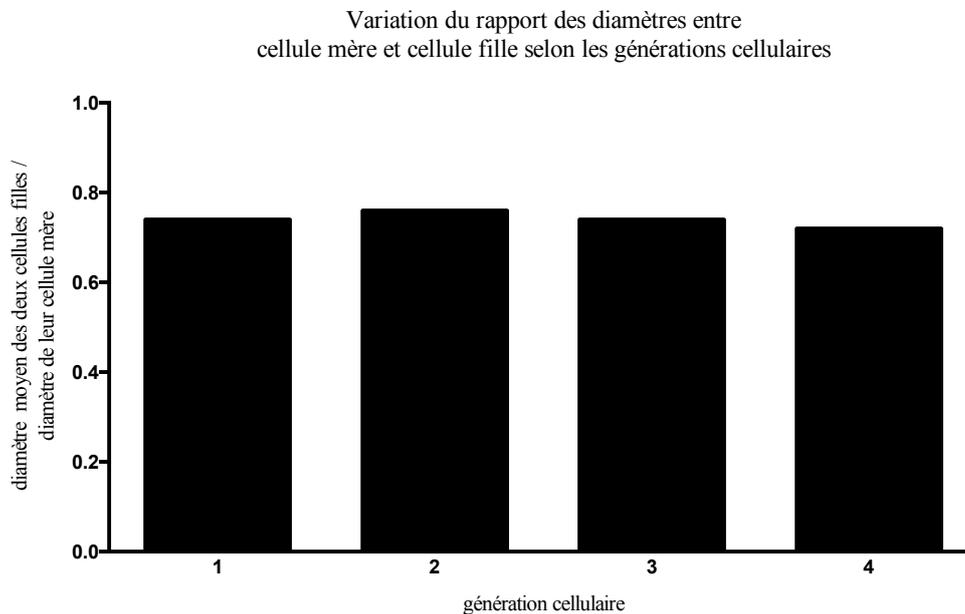


FIGURE 2.71 – Histogramme du ratio : *diamètre moyen des deux cellules filles/diamètre de leur cellule mère* moyenné pour chaque génération cellulaire 1 ; 2 ; 3 ; 4 correspondant respectivement aux cellules qui se sont divisées 0 ; 1 ; 2 ; 3 fois .

Bien que le diamètre des cellules varie d'une population à l'autre (figure 59), le rapport : *diamètres moyen des deux cellules filles/diamètre de leur cellule mère* est très stable autour de 0,7 pour toutes les générations cellulaires (Figure 71). Dans un calcul simple, si on considère une sphère de rayon R ayant une surface deux fois supérieure à une autre sphère de rayon r , le rapport $r/R = 0,7$. Ce qui prouve que, quelque soit le diamètre du lymphocyte T, qui fluctue entre 10 et 20 μm , la surface de la membrane plasmique est toujours divisée en deux lors de la division cellulaire.

Les conclusions sont les suivantes : nous sommes capables de reconnaître les paramètres qui fluctuent plus rapidement que le temps de division cellulaire et nous pouvons mesurer ces paramètres avec précision.

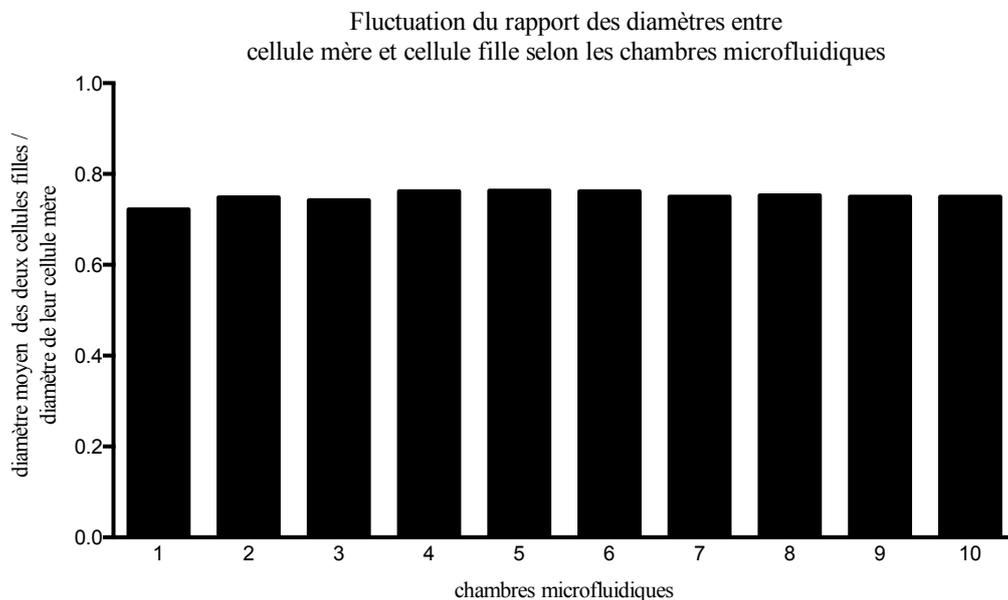


FIGURE 2.72 – Histogramme du ratio : *diamètre moyen des deux cellules filles/diamètre de leur cellule mère* moyenné pour chacune des 10 chambres microfluidiques choisies aléatoirement sur la puce.

Le rapport : *diamètre moyen des deux cellules filles/diamètre de leur cellule mère* est également stable sur l'ensemble de la population de cellules contenue dans la puce microfluidique (Figure 72). Ce qui conforte le caractère reproductible des mesures sur l'ensemble des chambres sans flux de la puce microfluidique.

CSHs

Etude de la dynamique des divisions

La culture des Jurkats ayant montré que nous pouvons effectuer un suivi temporel précis des divisions cellulaires sur au moins quatre générations, nous avons décrit l'ensemble des paramètres temporels mesurables à partir d'une cellule individuelle dans une chambre sans flux (Figure 73)

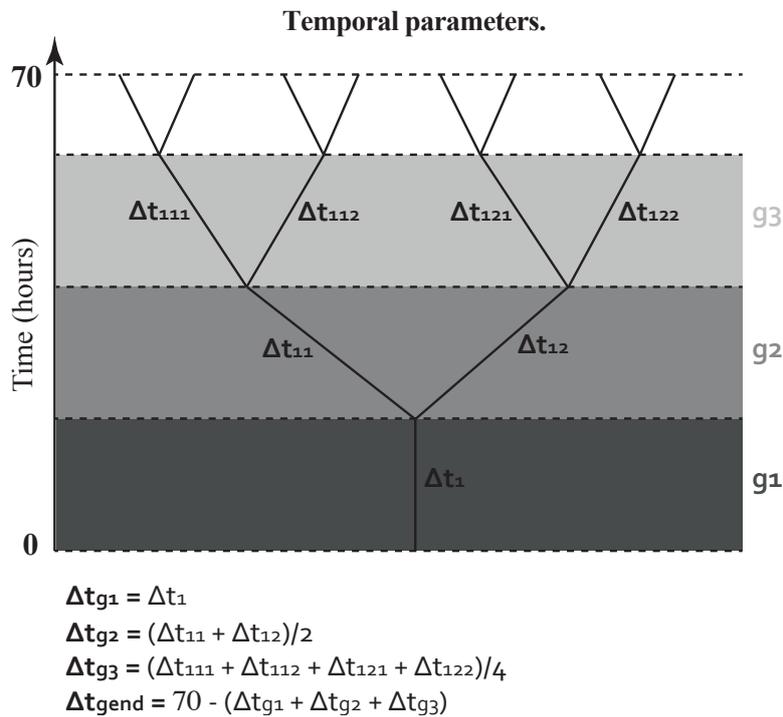


FIGURE 2.73 – Représentation schématique de l'arbre de pedigree d'une cellule individuelle avec les définitions des paramètres temporels de prolifération cellulaire. La prolifération commence au temps $t = 0h$ heures et finit au temps $t = 70h$. g_1 ; g_2 ; g_3 représentent les générations cellulaires qui correspondent respectivement à 0 divisions ; 1 division ; 2 divisions. Δt_{11} est l'intervalle de temps, pour la cellule 11, entre la division de la cellule 1 et la division de la cellule 11 et Δt_{12} est l'intervalle de temps, pour la cellule 12, entre la division de la cellule 1 et la division de la cellule 12 ; Δt_{g_2} est la valeur moyenne de Δt_{11} et Δt_{12} . De manière générale, Δt_i est le temps écoulé entre deux divisions cellulaires consécutives et Δt_{g_i} est la valeur moyenne des Δt_i de la génération i .

Cet arbre de pedigree est destiné à des analyses purement temporelles. Le jeu de variables (Δt_i ; Δt_{g_i}) est nécessaire et suffisant pour obtenir toutes les données temporelles utiles concernant les divisions d'une cellule individuelle.

Nous avons alors cultivé des cellules souches hématopoïétiques humaines dans les chambres sans flux sur une période de 70 heures pour mesurer ces paramètres temporels (Figure 74).

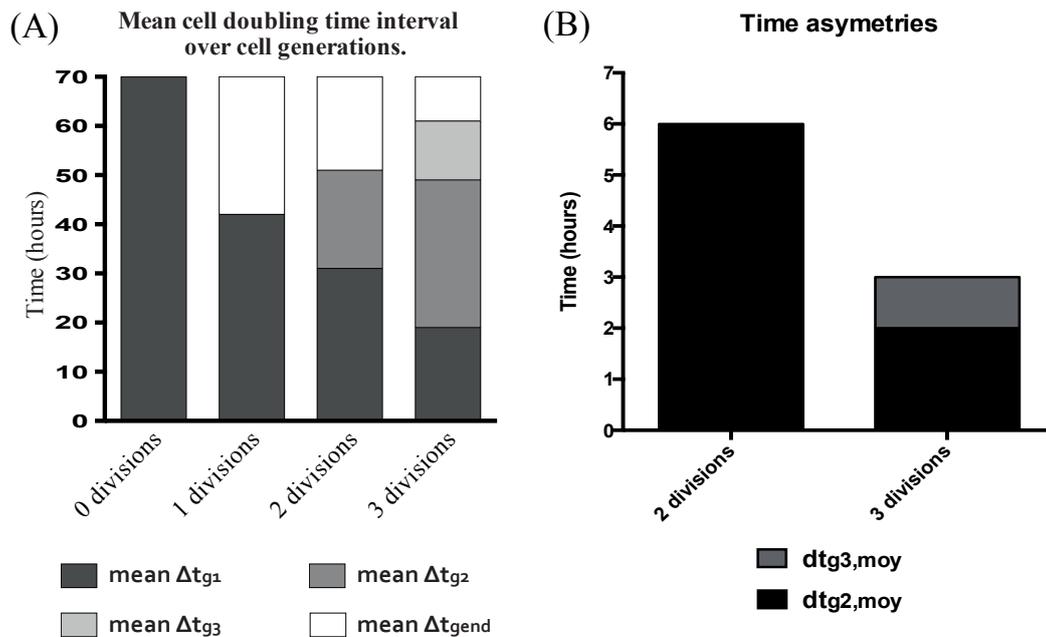


FIGURE 2.74 – Histogrammes des mesures des paramètres temporels décrits par la Figure 58. (A) Valeurs moyennes des Δt_{gi} de l'ensemble des cellules d'une puce microfluidique pour chaque génération i (0, 1, 2 et 3 divisions). (B) Valeurs moyennes des temps d'asymétrie de division : $dt_{g2,moy} = |\Delta t_{11} - \Delta t_{12}|$ et $dt_{g3,moy} = |\Delta t_{111} - \Delta t_{112}| + |\Delta t_{121} - \Delta t_{122}|$

Nous remarquons que les CSHs ne suivent pas toutes la même évolution temporelle de divisions bien qu'elles soient dans la même chambre microfluidique. Nous remarquons aussi des asymétries temporelles entre les temps de division de cellules filles provenant de la même mère : par exemple $dt_{711} = 13h$ et $dt_{712} = 7h$. Une division asymétrique donnant lieu à une différenciation serait-elle accompagnée d'une telle asymétrie temporelle ?

Une question plus générale concernant l'observation de ces données temporelles est la suivante : quelle est la corrélation, dans le cas d'une CSH individuelle, entre les couples de valeurs $(\Delta t_{gi}; dt_{gi})$ et la fréquence des divisions de la CSH pendant le temps de l'expérience ? Pour répondre à cette question il nous faut davantage de données et une expérience sur une durée de temps suffisante pour obtenir un profil sur un grand nombre de divisions cellulaires.

conclusion

La puce est adaptée au suivi à long terme des cellules non-adhérentes et rend possible des mesures dimensionnelles et temporelles précises. Ces expériences nous ont permis d'évaluer les différents critères techniques de la puce qui apportent chacun un avantage pour l'étude des cellules *in vitro*. En voici la liste :

A) Contraintes physiques

A1 Flux hydrodynamique (nul)

A2 Interaction de la surface avec les cellules (faible)

A3 Isolement de cellules individuelles (oui)

B) Observation et l'analyse

B1 Culture cellulaire à long terme (≤ 70 heures)

B2 Marquages cellulaires en temps réel (oui)

B3 Confinement des cellules dans un plan (oui)

B4 Criblage haut débit (1000 chambres)

C) Simplicité et reproductibilité du montage et de l'utilisation

C1 Complexité du circuit microfluidique (2 dimensions)

C2 Système d'injection des cellules (pipette)

C3 Efficacité du remplissage (pas de génération de bulles)

C4 Rapidité du renouvellement du micro-environnement (≤ 30 minutes)

Ces critères sont à comparer à ceux des autres systèmes microfluidiques sans flux décrits au paragraphe "moyens" dans la section 2.2.1 de cette thèse.

2.3.3 Utilisation de la puce pour contrôler les cellules souches hématopoïétiques humaines : *Article 2.*

Après avoir validé la faisabilité de la puce microfluidique, nous l'avons utilisée pour corréler la dynamique des divisions des cellules souches hématopoïétique et leur état de différenciation (par des marquages membranaires en temps réel). Ce qui nous a amenés à observer une corrélation entre la symétrie des marqueurs de différenciation et la motilité cellulaire.

Article 2 (cf. Annexes) :
Cambier T. et al. Lab Chip, 2015.

2.4 Conclusion générale

Le contrôle de la répartition surfacique des facteurs de nucléation de l'actine $C_{nuclateurs}(x, y)$ induit l'organisation spatiale de l'assemblage des architectures d'actine *in vitro*. La complexification progressive de ces architectures, maintenues dans des conditions physiologiques, permet de comprendre toutes les étapes de l'assemblage du cytosquelette d'actine *in vivo*. Le contrôle temporel de la concentration des composés biochimiques $C_{biomolcules}(t)$ par diffusion dans le micro-environnement biomimétique et son couplage avec le contrôle de $C_{nuclateurs}(x, y)$ ouvre le champ aux investigations sur la dynamique d'assemblage et de désassemblage de tout type de structure d'actine ; de la plus simple, comme le filament individuel, à la plus complexe que nous puissions reproduire *in vitro*, comme l'anneau de cytocinèse.

La puce microfluidique s'est avérée d'une grande simplicité et d'une efficacité redoutable pour l'observation et l'analyse des cellules non-adhérentes dans un environnement biochimiquement contrôlable à long terme.

Provenant du domaine de la physique, les technologies de microfabrication comme le micropatterning et la microfluidique sont de mieux en mieux apprivoisées par les biologistes. Leurs évolutions et leur mixage permettent chaque jour de mieux décortiquer les mécanismes biomoléculaires à la base de l'organisation des systèmes biologiques.

2.5 Protocoles

Protocole 0 : Micropatterning WASP

1 Préparation des tampons et des protéines (stockage dans bac à glace).

TF (255 μ L sur glace)
+94 μ L 4XAB
+42 μ L DTT 1 M
+8 μ L catalase
+8 μ L glucose
+4 μ L glucose oxydase
+5 μ L ATP 0,1 M
+94 μ L MC 2 %.

tpG (50 mL)
+500 μ L 100X
+5 μ L CaCl₂ 1 M
+45,5 mL H₂O.

10XKMEI (10 mL)
+7,5 mL H₂O
+1,25 mL KCl 4 M
+1 mL Imidazole 1 M PH 7
+100 μ L MgCl₂ 1 M.

1X KMEI (50 mL)
+5 mL 10X KMEI
+45 mL tpG

Actine
+20 % actine glycerol 568
+80 % actine black

Profiline ; Arp2/3 ; pWA : à décongeler sur glace.

2 Lavage du masque en chrome.
Frotter le masque avec un chiffon KIMTECH imbibé d'eau, rincer à la pissette d'eau milli-Q, sécher à la soufflette, frotter avec un chiffon KIMTECH imbibé d'isopropanol, sécher rapidement à la soufflette de sorte qu'il ne reste

pas de traces sur le masque.

3 Préparation de la chambre à flux.

Lame non lavée et scotch 70 micromètres d'épaisseur.

4 Insolation des lamelles PEG = création des patterns.

Préchauffage de la lampe UV : 5 minutes ; insolation : 7 minutes ; découpage de la lamelle 76 mm x 26 mm en 4 avec la pointe diamant.

5 "Coating pWa" des patterns et rinçage.

Déposer un quart de lamelle sur une goutte de 30 microlitres de pWa 1 μM pendant 10 minutes sur du parafilm. Enlever délicatement et lentement la lamelle "paternée" du parafilm, la plonger lentement dans un bain de 1X KMEI (20 à 30 mL dans une petite boîte de pétri) en gardant la lamelle dans la pince puis, la retirer lentement et la placer sur les scotchs de la chambre à flux.

6 Préparation et injection du MIX de polymérisation.

MIX (60 μL)
+6 μL 10XKMEI
+2 μL de BSA 3 %
+28 μL de tpG
+1,2 μL *Profiline*_{495microM}
+2 μL *Arp2/3*_{300nM}
+20 μL TF
+2,8 μL actine 43 μM .

Injection rapide du mix dans la chambre à flux. Fermeture de la chambre à flux avec de la parafine liquide.

Protocole 1 :
**Multipatterning pour le guidage géométrique des réseaux
parallèles de filaments d'actine à orientation identique**

1 Préparation des tampons et des protéines (stockage dans bac à glace).

TF (255 μ L sur glace)
+94 μ L 4XAB
+42 μ L DTT 1 M
+8 μ L catalase
+8 μ L glucose
+4 μ L glucose oxydase
+5 μ L ATP 0,1 M
+94 μ L MC 2 %.

tpG (50 mL)
+500 μ L 100X
+5 μ L CaCl₂ 1 M
+45,5 mL H₂O.

10XKMEI (10 mL)
+7,5 mL H₂O
+1,25 mL KCl 4 M
+1 mL Imidazole 1 M PH 7
+100 μ L MgCl₂ 1 M.

1X KMEI (50 mL)
+5 mL 10X KMEI
+45 mL tpG

Actine
+20 % actine glycerol 568
+80 % actine black

Profiline ; Arp2/3 ; pWA : à décongeler sur glace.

2 Lavage du masque en chrome.
Frotter le masque avec un chiffon KIMTECH imbibé d'eau, rincer à la pissette d'eau milli-Q, sécher à la soufflette, frotter avec un chiffon KIMTECH imbibé d'isopropanol, sécher rapidement à la soufflette de sorte qu'il ne reste

pas de trace sur le masque.

3 Préparation de la chambre à flux.

Lame non lavée et scotch 70 micromètres d'épaisseur.

4 Insolation des lamelles PEG = création des patterns.

Préchauffage de la lampe UV : 5 minutes ; insolation : 7 minutes ; découpage de la lamelle 76 mm x 26 mm en 4 avec la pointe diamant.

5 "Coating pWa" des patterns et rinçage.

Déposer un quart de lamelle sur une goutte de 30 microlitres de pWa 1 μM pendant 10 minutes sur du parafilm. Enlever délicatement et lentement la lamelle "paternée" du parafilm, la plonger lentement dans un bain de 1X KMEI (20 à 30 mL dans une petite boîte de pétri) en gardant la lamelle dans la pince puis, la retirer lentement et la placer sur les scotchs de la chambre à flux.

6 Deuxième insolation = création des zones de guidage.

Préchauffage de la lampe UV : 5 minutes ; insolation : 7 minutes ; découpage de la lamelle 76 mm x 26 mm en 4 avec la pointe diamant.

7 Préparation et injection du MIX de polymérisation.

MIX (60 μL)
+6 μL 10XKMEI
+2 μL de BSA 3 %
+28 μL de tpG
+1,2 μL *Profiline*_{495microM}
+2 μL *Arp2/3*_{300nM}
+20 μL TF
+2,8 μL actine 43 μM .

Injection rapide du mix dans la chambre à flux. Fermeture de la chambre à flux avec de la parafine liquide.

Protocole 2 :

Dépôt d'une couche de Si-PEG 30 kDa sur une lamelle en verre

1 Porte lamelles.

Mettre les lamelles 76 mm x 26 mm dans un porte-lamelle Didier (en verre).

2 Traitement à l'acétone.

Mettre le porte-lamelles dans un bêcher de 300 mL en verre rempli d'acétone, laisser à agitation à 70 rpm pendant 30 minutes.

3 Rinçage de l'acétone à l'alcool.

Mettre le porte-lamelles dans un bêcher de 300 mL en verre rempli d'alcool 96 %, laisser à agitation au barreau aimanté à 70 rpm pendant 15 minutes.

4 Rinçage de l'alcool à l'eau.

Mettre le porte-lamelle dans un bêcher de 300 mL en verre rempli d'eau milli-Q puis agiter à la main. Changer l'eau et répéter l'étape. Changer l'eau et répéter l'étape une troisième fois.

5 Traitement au détergent Hellmanex 2 pourcents (dilué dans l'eau).

Mettre le porte-lamelles dans un bac en verre rempli d'hellmanex 2 pourcent, mettre à agitation à 70 rpm pendant 2 heures.

6 Rinçage de l'hellmanex à l'eau et séchage.

Mettre le porte-lamelle dans un bêcher de 300 mL en verre rempli d'eau milli-Q puis agiter à la main. Changer l'eau et répéter l'étape. Changer l'eau et répéter l'étape une troisième fois.

7 Coating du Si-PEG 30 kDa 1 mg.mL^{-1} .

Mettre le porte-lamelles dans un bac en verre rempli de solution de Si-PEG 30 kDa 1 mg.mL^{-1} , scotcher le couvercle (pour éviter l'évaporation), mettre à agitation à 50 rpm pendant 18 heures.

8 Rinçage du Si-PEG à l'alcool et à l'eau.

Agiter le porte-lamelle dans un bêcher de 500 mL en verre rempli à ras d'alcool 96 %. Agiter le porte-lamelle dans un bêcher de 500 mL en verre rempli à ras d'eau milli-Q. Reprendre les lamelles une par une, les replonger dans le bêcher d'eau et les retirer lentement de façon à ce qu'elles soient sèches (enlever les dernières gouttes au papier KIMTECH).

9 Préparation de la solution de Si-PEG 30 kDa 1 mg.mL^{-1} .

Sortir le tube de poudre de Si-PEG 30 kDa, le chauffer dans la paume de la main pour éviter qu'il condense à l'ouverture du bouchon. Introduire dans un flacon à bouchon bleu de 200 mL : $37,5 \mu\text{L}$ d'HCl 37 % + 150 mL d'éthanol 96 % + 150 mg de poudre de Si-PEG 30 kDa. Chauffer le flacon à $70 \text{ }^\circ\text{C}$ et agiter par intermittence jusqu'à ce que tout le Si-PEG soit dissous. Technique du gant d'Argon pour re-remplir le tube de poudre de Si-PEG d'Argon avant de scotcher le bouchon et de remettre le tube à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Protocole 3 :
Micro-patterning mDia

1 Régulation des PH avant de commencer la manipulation.

tpG PH 7 (pour ça tamponner le 100X tpG à PH 7,05)

Imidazole PH7

DTT PH 7

KCl PH7

EGTA PH 7

MgCl₂ PH7

2 Création des patterns.

2.1 Lavage masque.

Lavage du masque en chrome : eau, soufflette, éthanol 96 pourcent, soufflette, eau, soufflette.

2.2 Insolation.

Préchauffer la lampe UV pendant 3 minutes, insoler pendant 30 secondes.

2.3 Découpage.

Lamelle 76 mm x 26 mm : découper en 4 avec une pointe diamant sans trop appuyer pour éviter les paillettes de verre.

2.4 Stockage.

Stockage à température ambiante sur la pailasse (1 jour).

3 Traitement lame en verre.

Eau, soufflette, éthanol 96 %, soufflette, eau, soufflette.

4 Echange (6 μ L, 5 minutes, 5 minutes).

4XexB (600 microlitres)

+581 μ L tpG

+7,8 μ L MgCl₂ 0,01 M

+10 μ L EGTA 0,05 M

4.1 Chélation du Ca par le Mg (4 microL 5 minutes sur glace)

+3 μ L ATTO^{50%}_{Ca} 30 microM

+1 μ L 4XexB

4.2 Complexation de la profiline à l'actine globulaire (6 μL 5 minutes sur glace)

+4 μL $ATTO_{Mg}^{50\%}$ 22,5 μM

+2 μL $PRO_{305microM}$

= $ATTO_{15microM}^{50\%}$ - $PRO_{100microM}$ = complexe actine-profiline 15 μM

5 Incubation mDia (45 μL , 5 minutes).

Diluer 1,37 μL de mDia 35 μM dans 48 μL de tampon 1XKMEI (2 aller-retours). Mélanger lentement avec 12 μL . Déposer 45 μL sur parafilm. Déposer lentement la lamelle "patternée" sur la goutte.

6 Rinçage (25 mL).

Décoller très lentement la lamelle patternée de la goutte de mDia. La déposer lentement dans le bain de rinçage 1X KMEI déposé préalablement sur la paillasse (laisser ensuite le bain sur la glace).

7 MIXs.

7.1 MIX_{theo} (40 μL)

+4 μL 10XKMEI

+5,4 μL BSA 10 %

+12,3 μL tpG (mélanger)

+5 μL $actine_{15microM}$

+13,3 μL TF (mélanger)

7.2 $MIX_{christophe}$ (40 μL)

+5,4 μL BSA 10 %

+ 3 μL tpG (mélanger)

+5 μL $actine_{15microM}$

+26,6 μL TF (mélanger)

8 Dépôt du mix entre lame et lamelle (3 μL pour 500 mm^2)

Retirer lentement la lamelle du bain. Déposer rapidement 3 μL de MIX sur la lamelle patternée elle-même posée sur un chiffon KIMTECH. Venir appliquer la lame sur la goutte de MIX.

9 Valap

Réglage hight position 7 (pour qu'il soit bien liquide). Appliquer un valap le plus plat possible.

10 Acquisition

$\Delta t = 60$ secondes ; 10 à 30 positions, lampe à 100 %, temps d'exposition : 200 ms ; penser à sélectionner le Z Olympus ; configurer l'autofocus ; passer au 40 X.

Protocole 4 :
Contraction de l'anneau de cytokinèse *in vitro* par la myosine VI

1 Préparation des tampons pour la myosine VI.

10X KEEI (1000 μL sur glace)
+678 μL H_2O milli-Q
+200 μL KCl 4 M
+100 μL Imidazole 1M PH7
+20 μL EGTA 0,5M PH7
+2 μL EDTA 0,05M PH7

Myosine VI Buffer (500 μL sur glace)
+420 μL H_2O milli-Q
+50 μL 10XKEEI
+25 μL ATP 0,1 M PH7
+2,5 μL MgCl_2 1M
+1 μL DTT 1M PH7

10X MgATP (100 μL sur glace)
+78 μL H_2O milli-Q
+20 μL EGTA 0,5M PH7
+2 μL MgCl_2 1M

PEP (aliquot de 2 μL sur glace)
100 mM PH7,5

Pk (aliquot de 500 μL sur glace à remettre à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ après utilisation)

2 parties 1 à 6 du protocole 12.

3 Mix (40 μL)
+4 μL 10x KMEI
+5,4 μL BSA 10 %
+4 μL 10X MgATP
+0,8 μL PEP
+0,8 μL Pk
+4,7 μL tpG
+5 μL $\text{ATTO}_{\text{Ca}}^{50\%}$ 15 μM
+2 μL Myosine VI 200 nM

+13,3 TF (mélanger)

4 Parties 8 à 11 du protocole 12.

Protocole 5 :

Fabrication d'un moule à motifs de 10 μm de hauteur (salle blanche)

1 Préparation du développeur.

Développeur : bouteille d'AZ400K (AZ electronic materials) Pour le développement de deux wafers, mélanger 70 mL d'AZ400K et 130 mL d'eau distillée dans un flacon en verre à bouchon.

2 Spin coating de la résine.

Résine : AZ9260 (AZ electronic materials), stockée à 4 °C. "Wafer" : 100 mm/N Type. Déposer la résine sur un "wafer" et l'étaler en faisant tourner le "wafer" dans la main de sorte que la résine recouvre toute la surface du "wafer". "Spin-coater" la résine : vitesse de rotation : 3000 rpm, accélération : 500 rpm, time : 60 secondes (programme 003 ; enter ; speed ; accn ; 3 ; time). Après utilisation, laver la tournette à l'acétone.

3 Cuisson.

Mettre le wafer sur une plaque chauffante à 60 °C pendant 1 minute puis sur l'autre plaque chauffante à 110 °C pendant 3 minutes. (Le chauffage évapore les solvants présents dans la résine et la solidifie). Entre la cuisson et l'insolation UV, laisser le wafer revenir à température ambiante pendant 5 minutes afin que la résine finisse de se solidifier.

4 Insolation UV.

Placer le masque en chrome sur le porte-masque de la MJB4 face chrome vers le bas, placer le "wafer" sur le porte-wafer en dessous puis procéder au « wec settings » qui consiste à plaquer wafer et masque, et régler la pression entre les deux. Dans le menu « parameters » : sélectionner align+exposure ; sélectionner "hard contact" : "hard contact time" = 5 secondes ; temps d'exposition = 50 secondes. Lancer l'exposition. Enlever le "wafer" du masque.

5 Développement.

Immédiatement après l'insolation aux UVs, immerger le wafer dans une boîte de pétri en verre remplie de développeur, agiter sans cesse la boîte de pétri. Dès qu'il n'y a plus de résine sur le "wafer" en dehors des canaux, retirer le "wafer" et le rincer abondamment à l'eau distillée sur ses deux faces puis le sécher à la soufflette.

Protocole 6 :

Fabrication d'un moule à motifs de 20 μm de hauteur (salle blanche)

1 Préparation du développeur.

Développeur : bouteille d'AZ400K (AZ electronic materials) Pour le développement de deux wafers, mélanger 70 mL d'AZ400K et 130 mL d'eau distillée dans un flacon en verre à bouchon.

2 Spin coating de la résine.

Résine : AZ9260 (AZ electronic materials), stockée à 4 °C. Wafer : 100 mm/N Type. Déposer la résine sur un wafer et l'étaler en faisant tourner le wafer dans la main de sorte que la résine recouvre toute la surface du wafer. "Spin-coater" la résine : vitesse de rotation : 750 rpm, accélération : 200 rpm, time : 60 secondes (programme 003 ; enter ; speed ; accn ;3 ; time). Après utilisation, laver la tournette à l'acétone.

3 Cuisson.

Mettre le wafer sur une plaque chauffante à 60 degrés celcius pendant 1 minute puis sur l'autre plaque chauffante à 110 degrés celcius pendant 4 minutes. (Le chauffage évapore les solvants présents dans la résine et la solidifie). Entre la cuisson et l'insolation UV, laisser le wafer revenir à température ambiante pendant 5 minutes afin que la résine finisse de se solidifier.

4 Insolation UV.

Placer le masque en chrome/quartz sur le porte-masque de la machine à insolation UV (MJB4) face chrome vers le bas, placer le wafer sur le porte-wafer en dessous puis procéder au « wec settings » qui consiste à plaquer wafer et masque, et régler la pression entre les deux. Dans le menu « parameters » : sélectionner align+exposure ; sélectionner hard contact : hard contact time = 5 secondes ; exposure time = 50 secondes. Lancer l'exposition. Enlever le wafer du masque.

5 Développement.

Immédiatement après l'insolation UV, immerger le wafer dans une boîte de pétri en verre remplie de développeur, agiter sans cesse la boîte de pétri. Dès qu'il n'y a plus de résine sur le wafer en dehors des canaux, retirer le wafer et le rincer abondamment à l'eau distillée sur ses deux faces puis le sécher à la soufflette.

Protocole 7 :

Fabrication d'un moule à motifs de 40 μm de hauteur (salle blanche)

1 Préparation du développeur.

Développeur : bouteille d'AZ400K (AZ electronic materials) Pour le développement de deux wafers, mélanger 100 mL d'AZ400K et 100 mL d'eau distillée dans un flacon en verre à bouchon.

2 "Spin coating de la résine".

Résine : AZ40XT (AZ electronic materials), stockée à 4 °C. "Wafer" : 100 mm/N Type. Déposer un "wafer" sur la tournette, déposer 2 à 3 mL de résine sur le "wafer". "Spin-coater" la résine : vitesse de rotation : 1750 rpm, accélération : 100 rpm, temps : 20 secondes (programme 003 ; enter ; "speed" ; "accn" ; "3" ; "time"). Après utilisation laver la tournette à l'acétone.

3 Cuisson avant insolation.

Mettre le "wafer" sur une plaque chauffante à 126 °C pendant 7 minutes. (Le chauffage évapore les solvants présents dans la résine et la solidifie). Entre la cuisson et l'insolation aux UV, laisser la résine à température ambiante pendant 5 minutes pour qu'elle finisse de se solidifier.

4 Insolation UV.

Placer le masque en chrome sur le porte-masque de la MJB4 face chrome vers le bas, placer le "wafer" sur le porte-wafer en dessous puis procéder au « wec settings » qui consiste à plaquer "wafer" et masque et régler la pression entre les deux. Dans le menu « parameters » : sélectionner "align+exposure" ; sélectionner "hard contact" : "hard contact time" = 5 secondes ; "exposure time" = 15 secondes. Lancer l'exposition. Enlever le "wafer" du masque.

5 Cuisson après exposition.

Immédiatement après l'insolation, mettre le "wafer" sur une plaque chauffante à 105 °C pendant 1 minute. (Ce chauffage augmente l'adhésion entre la résine et le "wafer"). Entre la cuisson après insolation et le développement, laisser la résine à température ambiante pendant 10 minutes.

6 Développement.

Immerger le wafer dans une boîte de pétri en verre remplie de développeur, agiter sans cesse la boîte de pétri. Dès qu'il n'y a plus de résine sur le "wafer" en dehors des canaux, retirer le "wafer" et le rincer abondamment à l'eau distillée sur ses deux faces puis le sécher à la soufflette.

Protocole 8 :
Montage et utilisation du dispositif microfluidique pour les SMR/IV

1 Préparation des lames de connexion.

1.1 Perçage des lames.

Lame : lame de verre 76x26 (THERMO SCIENTIFIC). Avec une fraiseuse diamant (habilitation à avoir), donc c'est Kevin du LTM qui le fait, il suffit de lui donner un plan de perçage.

1.2 Collage des connecteurs.

Connecteur : kit N-333 + adhésive rings N-100-01 (IDEX health and science)
Pour coller le connecteur à la lame de verre percée, aligner un connecteur sur un des deux trous, le plaquer et mettre au four à 170 °C pendant 2 heures.

2 Préparation des pièces (blocs) PDMS.

2.1 Préparation PDMS liquide.

Dans un verre plastique : 4 g de réticulant + 40 g de chaînes polymériques (kit sylgard 184). Mélanger (petit couteau en plastique) pendant 60 secondes.

2.2 Dégazage du PDMS liquide.

Mettre le PDMS sous vide (cloche à vide) pour dégazer jusqu'à disparition complète des bulles (pour accélérer le dégazage, on peut de temps en temps faire rentrer de l'air dans la cloche à vide, ce qui a pour effet d'exploser les bulles en surface).

2.3 Réticulation du PDMS (solidification).

Poser le moule en résine « 1 in » dans une boîte de pétri en verre, couler le PDMS sur le moule en résine « 1 in » puis poser la boîte de pétri sur une plaque chauffante, attendre une minute le temps que la surface libre du PDMS soit parfaitement plane puis chauffer pendant 5 à 10 minutes à 100 °C pour l'AZ9260 ; à 80 °C pour l'AZ40XT.

2.4 Découpage, démoulage et perçage des pièces PDMS.

Immédiatement après la réticulation, découper le PDMS au scalpel autour des circuits microfluidiques (scalpel perpendiculaire au "wafer") puis démouler les 5 pièces et les placer dans une boîte de pétri face canaux vers le haut

2.5 Perçage des pièces PDMS.

Déposer une pièce PDMS sur un wafer propre, face canaux vers le haut et percer le PDMS à l'emporte-pièce au centre du disque d'entrée. Redéposer la pièce dans sa boîte de pétri face canaux vers le haut.

3 Collage des pièces PDMS sur les lames de connexion.

Poser les pièces PDMS sur un wafer (100 mm préalablement lavé à l'alcool 96 %) face canaux contre le "wafer".

Placer ces pièces et les lames de connexion dans l'enceinte plasma, puis suivre la procédure plasma (2 minutes de vide et 2 minutes d'introduction d'O₂) puis exposer au plasma à 100 watts pendant 10 secondes. Immédiatement après exposition, déposer simplement les pièces PDMS (face plate contre le verre) sur les lames de connexion en alignant le trou du PDMS avec le trou d'entrée de la lame de connexion. Placer les lames dans une boîte de rangement de lames.

4 Fermeture du circuit microfluidique et injection de la solution de polymérisation.

4.1 Préparation du capillaire d'injection.

Capillaire d'injection : PEEK polymer tubing Connecter le capillaire d'injection à la vis de connexion (kit N-333 IDEX) et au flowell (Fluigent). Laver le capillaire avec 1,5 mL de tampon 500 mM KCl à l'aide de l'option PURGE. Puis laver le capillaire avec 1,5 mL d'eau milliQ à l'aide de l'option PURGE. Puis sécher le capillaire toujours avec l'option PURGE.

4.2 Préparation de l'échantillon.

Lamelle échantillon = lamelle en verre contenant à sa surface un traitement chimique (PLL-PEG ou SI-PEG ou micropatterns de protéines). Passer la soufflette sur le canal PDMS, puis déposer délicatement l'échantillon sur ce canal. Visser le capillaire au connecteur et placer la lame sous le microscope.

4.3 Préparation du mix à injecter.

Mix : fluide dont la viscosité cinématique est environ de 0,188 Pa.s-1. Visser le tube à vis contenant le mix sur le flowell puis injecter en appliquant une pression de 40 à 60 mBar, passer à 0 mBar dès que le mix atteint l'échantillon, puis remplir les chambres en appliquant une pression de 10 à 15 mBar.

5 Renouveaulement de la solution.

Passer à 0 mBar, dévisser le tube à vis, le remplacer par un autre, contenant un autre mix et injecter à 40 mBar.

6 Expérience deux couleurs de l'actine.

Mix 1 vert (60 μL) :

- +6 μL 10 X KMEI
- +2 μL BSA 10 %
- +25 μL tpG
- +2 μL *Profiline*_{305microM} : 10 μM
- +2 μL *Arp2/3*_{300nM} : 10 nM
- +20 μL TF
- +3,2 μL *Actine*_{568,20%glycerol,37microM} : 2 μM

Mix 2 rouge (60 μL)

- +6 μL 10 X KMEI
- +20,5 μL tpG
- +2 μL *Profiline*_{305microM} : 10 μM
- +20 μL TF
- +2,7 μL *ctine*_{488,20%glycerol,44microM} : 2 μM

Protocole 9 :
Dépôt d'une couche de Si-PEG 5 kDa sur une lamelle en verre

Mis au point par Laurène Gressin et Alphé Michelot (non publié)

Protocole 10 :

Dépôt d'une couche de PLL-PEG sur une lamelle en verre

1 Dilution du PLL-PEG en poudre.

1.1 Dilution à 1 mg.mL^{-1} .

Mettre dans un tube 3 mL : 3 mg de poudre de PLL-PEG stockée à $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ + 3 mL de tampon HEPES 10 mM PH 7,4 (HEPES 10 mM = 120 mg de poudre d'HEPES 238 g.mol^{-1} + 20 mL H₂O milli-Q).

1.2 Dilution à mg.mL^{-1} .

Mettre dans un tube 30 mL : 3 mL de PLL-PEG 1 mg.mL^{-1} + 27 mL d'HEPES 10 mM.

2 Lavage des lamelles en verre.

Mettre des lamelles 76 mm X 26 mm sur un portoir (une lamelle tous les 2 crans). Agiter le portoir dans un bêcher d'eau, puis dans un bêcher d'éthanol 96 % puis à nouveau dans l'eau puis sécher les lamelles à la soufflette.

3 Traitement plasma des lamelles en verre.

Passer les lamelles au plasma O_2 à 80 Watts pendant 10 secondes.

4 Incubation des lamelles verre au PLL-PEG.

Déposer des gouttes de $280 \mu\text{L}$ de solution de PLL-PEG $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ sur un parafilm puis déposer les lamelles plasmées sur les gouttes. Attendre 30 minutes.

4 Rinçage, séchage, stockage.

Introduire $2000 \mu\text{L}$ d'eau milli-Q sous chaque lamelle verre puis les placer sur le portoir (une lamelle tous les deux crans), plonger le portoir dans un bêcher d'eau milli-Q puis le retirer lentement de l'eau. Sécher les lamelles une par une sur la face qui ne contient pas de PLL-PEG (régler la soufflette pour obtenir un faible flux d'air) puis les placer chacune dans une boîte de pétri.

Protocole 11 :

Montage et utilisation de la puce à cellule à cellules, avec plafond de PDMS fin (membrane de moins de 200 μm d'épaisseur) par la méthode plasma

1 Préparations des pièces PDMS up et down.

1.1 Préparation du PDMS liquide.

Dans un verre plastique : 7 g réticulant + 70 g chaînes polymériques (kit sylgard 184). Dans un autre verre plastique : 2 g de réticulant + 20 g de chaînes polymériques (kit sylgard 184). Mélanger (petit couteau en plastique) pendant 30 à 60 secondes.

1.2 Dégazage du PDMS liquide

Mettre le PDMS sous vide (cloche à vide) pour dégazer jusqu'à disparition complète des bulles (pour accélérer le dégazage, on peut de temps en temps faire rentrer de l'air dans la cloche à vide, ce qui a pour effet d'exploser les bulles en surface).

1.3 "Spin-coating" pour les pièces down.

Sous la hôte, Déposer le PDMS liquide du verre 2 sur le « moule en résine in vivo », bien centrer le "wafer" sur la tournette et lancer un "spin coating" : vitesse de rotation : 1000 rpm, acc : 1, time : 60 secondes. Puis placer le "wafer" dans une boîte de pétri en verre.

1.4 Cuisson pour les pièces up.

Couler le PDMS liquide du verre 1 sur un « wafer tracé » placé dans une boîte de pétri, poser la boîte de pétri sur une plaque chauffante et attendre une minute, le temps que la surface libre du PDMS soit parfaitement plane, puis chauffer à 100 °C pendant environ 10 minutes.

1.5 Découpage des pièces up.

Découper les pièces up selon les tracés sur le wafer.

1.6 Cuisson pour les pièces down.

Placer « moule en résine in vivo » sur une plaque chauffante, chauffer à 100 °C jusqu'à ce qu'il soit possible de décoller la membrane PDMS du wafer.

1.7 Collage des pièces up et down = pièces PDMS finales.

Placer les pièces up et le moule en résine « 2 in » (H=10 μm ou H=20 μm ou H=40 μm) au plasma O₂ (pièces up faces planes vers le haut). 100 watts, 10

secondes. (Pour l'utilisation du plasma, bien respecter les 2 minutes de vide et les 2 minutes d'introduction d' O_2). Déposer les pièces PDMS sur les pièces PDMS down, découper au scalpel les pièces down selon le contour des pièces PDMS up, décoller tout doucement les pièces PDMS finales et les déposer chacune dans une boîte de pétri.

1.8 Perçage des pièces PDMS finales.

Perçer plusieurs trous à l'entrée et à la sortie des pièces PDMS finales à l'emporte-pièce blanc.

2 Fermeture du circuit microfluidique et injection des cellules dans les chambres microfluidiques.

2.1 Lavage des pièces PDMS finales.

Passer les 5 pièces PDMS finales à la pissette d'eau milli-Q et passer 5 lames en verre 76x26 à la pissette d'eau également.

2.2 Préparation des cellules.

Pour une manipulation, centrifuger des cellules pour obtenir 1 mL de suspension cellulaire à 2.106 cellules/mL. Placer ce volume dans une petite boîte de culture et la placer dans l'incubateur.

2.3 Collage d'une pièce PDMS finale sur la lame.

Placer au plasma O_2 une lame en verre et une pièces PDMS finale face membrane vers le haut. 100 watts, 30 secondes. Déposer la pièces PDMS finale sur la lame en verre face membrane contre la lame en verre.

2.4 "Loading" des chambres microfluidiques.

Tout de suite après le collage, injecter 0,5 mL de suspension cellulaire à 2.106 cellules/mL dans le réservoir d'entrée. Attendre que toutes les chambres se remplissent (en observant au microscope) puis vider le réservoir d'entrée et le remplir par du milieu de culture. Remplir le bain iso-osmotique de 0,8 mL de milieu de culture. Enfin, recouvrir la pièce PDMS par une membrane collante (Greiner bio-one).

3 Changement du milieu de culture.

Enlever la membrane collante, vider les réservoirs d'entrée et de sortie et le bain iso-osmotique puis remplir le réservoir d'entrée et le bain iso-osmotique avec 0,5 mL et 0,8 mL de milieu de culture respectivement. Remettre une membrane collante sur la pièce de PDMS.

Protocole 12 : Montage et utilisation de la puce à cellules, avec plafond de PDMS épais (500 μm d'épaisseur) par la méthode plasma et par la méthode simple contact.

1 Fabrication des puces PDMS.

1.1 Dégazage du PDMS (DOW CORNING, KIT SYLGARD 184).

Ratio curing agent :silicon elastomer = 1 :10 (PDMS). Mélanger 2 g de réticulant + 20 g de DMS dans un récipient en plastique 1. Mélanger 4 g de réticulant + 40 g de DMS dans un autre récipient en plastique 2. Dégazer ces deux mélanges dans une cloche à vide jusqu'à ce qu'il n'y ait plus aucune bulle (30 à 40 minutes).

1.2 Cuisson du PDMS.

Poser le wafer 1 contenant les motifs en résine et le wafer 2 contenant les formes hachurées chacun dans une boîte de petri en verre de taille adaptée au contour du wafer. Couler le PDMS 1 du récipient 1 sur le wafer 1. Couler le PDMS 2 du récipient 2 sur le wafer 2. Mettre les deux PDMS à cuire chacun sur une plaque chauffante (STUART) à 100 °C jusqu'à ce que la surface du PDMS soit solide (en recouvrant d'un couvercle pour éviter que les poussières intègrent le PDMS).

1.4 Découpage des pièces PDMS.

Au scalpel, découper le PDMS 1 selon le contour des hachures (intérieur et extérieur des hachures). Récupérer les 5 pièces "up" (qui constituent des petites piscines) et les déposer face inférieure contre le PDMS 2 en alignant les piscines au dessus des chambres sans flux. Au scalpel, découper le PDMS 1 selon le contour des pièces "up". Récupérer les pièces "up" (piscines) et les déposer, face inférieure vers le haut, sur un "wafer" rincé à l'alcool 70 %. Récupérer les pièces "down" (canaux) et les déposer, face canaux vers le bas, sur un "wafer" rincé à l'alcool 70 %.

1.5 Sellage au plasma O_2 . des parties "up" et "down" du PDMS.

Mettre les wafers sur lesquels sont posées les pièces "down" et "up" au plasma O_2 : 100 watts, 10 secondes. Après s'être assuré que les pièces "up" soient bien à plat sur le "wafer", récupérer les pièces "down" pour les coller sur les pièces "up" en les alignant selon leur contour (face "plasmée" contre face "plasmée").

1.6 Perçage des "inlet" et de "l'outlet".

Placer les 5 puces dans une boîte de pétri stérile face canaux vers le haut.

Récupérer une puce, la poser dans une autre boîte de pétri (dediée au perçage). Avec un emporte-pièce circulaire (HARRIS UNI-CORE 6.00 mm) , percer un ou deux trous à "l'inlet" (réservoir d'entrée) et plusieurs trous à "l'outlet" (pas de réservoir de sortie). Reposer la puce dans sa boîte de pétri.

2 Fermeture du circuit microfluidique et injection des cellules dans une puce adhésive (méthode plasma).

Récupérer une puce, la placer dans une boîte de pétri stérile de la façon suivante : en diagonale, un des cotés de la puce chevauchant le rebord d'un capuchon stérile avec le moins de contact possible entre le PDMS et le reste. Déposer une lamelle en verre de 100 μm d'épaisseur passée à la soufflette dans la boîte de pétri à coté de la puce. Passer la boîte de pétri contenant la puce et la lamelle verre au plasma 02 : 100 watts, 10 secondes.

Coller la puce sur la lamelle en verre (face canaux contre le verre) et, sans attendre, injecter, dans le réservoir d'entrée, à la pipette, 100 μL de suspension cellulaire avec une densité de 1 à 2 millions de cellules par mL.

Contrôler au microscope faible grossissement en lumière transmise que les chambres sans flux soient bien remplies par le milieu contenant les cellules.

Remplir le réservoir d'entrée de milieu avec une pipette, faire quelques aller-retours à la pipette pour re-suspendre les cellules qui sont au fond du réservoir, puis aspirer la totalité du volume du réservoir d'entrée.

Remplir le réservoir d'entrée et la piscine avec du milieu à 37 °C de façon à ce que la surface libre des liquides soit plane.

3 Injection des cellules dans une puce non adhésive (méthode simple contact) :

Récupérer une puce, la passer à la soufflette, puis la mettre délicatement en contact avec une lamelle 100 μm d'épaisseur recouverte d'une couche de silane-polyethylene glycol 5 kilodaltons (face canaux contre le PEG) juste sortie du réfrigérateur 4 °C.

Injecter dans le réservoir d'entrée, à la pipette, 100 μL de suspension cellulaire avec une densité de 1 à 2 millions de cellules par mL.

Contrôler, au microscope faible grossissement en lumière transmise, que les chambres sans flux soient bien remplies par le milieu contenant les cellules.

Remplir le réservoir d'entrée de milieu avec une pipette, faire quelques aller-retours à la pipette pour re-suspendre les cellules qui sont au fond du réservoir, puis aspirer la totalité du volume du réservoir d'entrée.

Remplir le réservoir d'entrée et la piscine avec du milieu à 37 °C de façon à ce que la surface libre des liquides soit plane.

Chapitre 3

Perspectives

Chapitre 3

perspectives

3.1 Mesure des forces contractiles de l'anneau de cytokinèse

Les forces contractiles exercées lors de la cytokinèse ont déjà été mesurées sur des cellules isolées [28]. Grâce à la technologie des gels polyacrylamide ultra-extensibles, il est possible de mesurer les forces contractiles directement sur l'anneau de cytokinèse reconstitué *in vitro* (Figure 1). Le gel polyacrylamide solidaire aux micropatterns mDia se contracterait sous l'effet des forces induites par la contraction de l'anneau d'actine. La mesure du déplacement de micro-billes contenues dans le gel permettrait alors de cartographier la répartition des forces contractiles sur toute la circonférence de l'anneau d'actine. Ainsi, nous pourrions faire varier les paramètres spatiaux (diamètre de l'anneau, densité en filaments d'actine, longueur des filaments d'actine) et les paramètres temporels (variation de la concentration d'actine, temps d'intervention des moteurs moléculaires, temps d'intervention des protéines de liaison) puis déterminer quels sont ceux qui favorisent ou défavorisent la génération de forces contractiles dans le processus de cytokinèse.

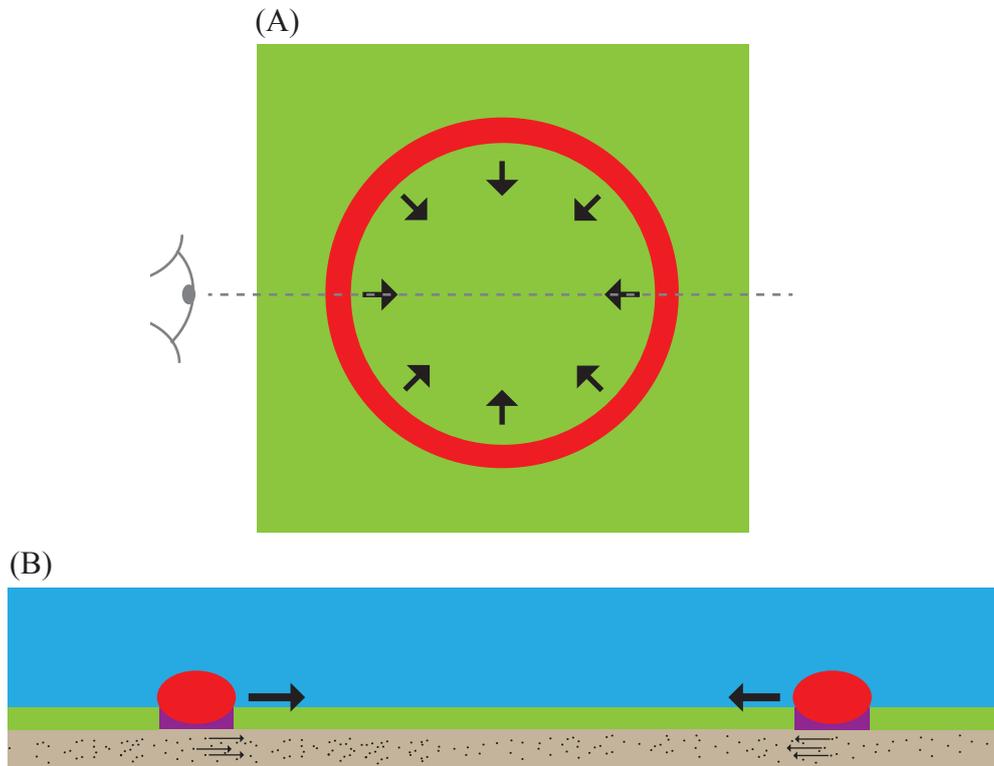


FIGURE 3.1 – Mesure des forces contractiles d’un anneau de cytokinèse *in vitro*. (A) Anneau de filaments d’actine (rouge) se contractant sur lui-même (les flèches noires indiquant les directions des forces) sur une surface de PEG (vert). (B) Vue en coupe selon la ligne pointillée. En bleu : la solution biochimique; en rouge : le câble de filaments d’actine constituant l’anneau; en violet : les formines; en gris : le gel de polyacrylamide contenant des micro-billes fluorescentes représentées par les points noirs. Les flèches noires indiquent les direction du mouvement de l’anneau d’actine et des billes du gel de polyacrylamide au cours de la contraction par les myosines.

3.2 Architectures d'actine sous contrainte hydrodynamique

Dans cette thèse j'ai travaillé sur le cytosquelette d'actine reconstitué dans un environnement sans flux. Mais nous pouvons aussi utiliser le flux pour étudier les architectures d'actine reconstituées par le micropatterning. Pour cela, nous utilisons une géométrie de circuit microfluidique simple (Figure 2).

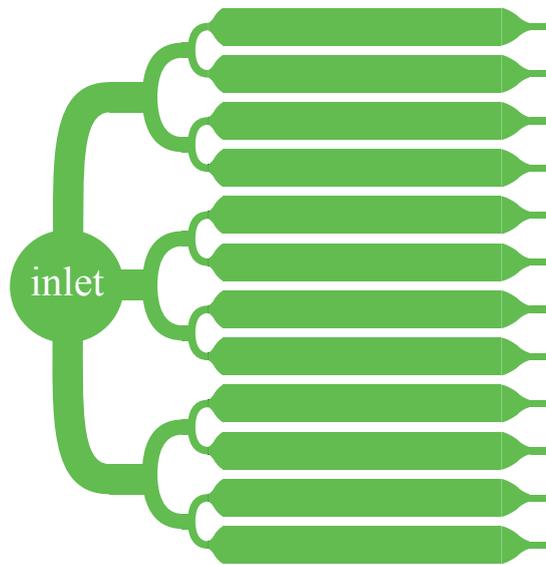


FIGURE 3.2 – Circuit microfluidique à écoulement laminaire rectiligne (2D).

Nous avons déjà utilisé ce circuit pour réaliser une expérience de renouvellement du micro-environnement biochimique sur un réseau de filaments d'actine parallèles à orientation identique généré par un micropattern WASP et le résultat est prometteur (Figure 3).

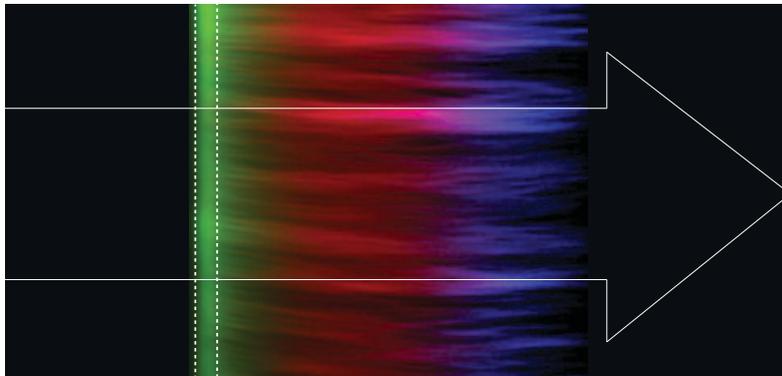
Réseau de filaments d'actine parallèles à polarité identique sous flux

FIGURE 3.3 – Changements séquentiels de la solution biochimique sous flux sur un réseau de filaments parallèles à polarité identique issus d'un micropattern WASP. Le micropattern WASP est délimité par les lignes en pointillés blancs. Le flux indiqué par la flèche blanche est perpendiculaire au micropattern en bande. Flux 1 : monomères d'actine marqués par Alexa 488 (vert), flux 2 : monomères d'actine marqués par Alexa 568 (rouge), flux 3 : monomères d'actine marqués par Alexa 647 (bleu).

Le micro-pattern en bande est orienté perpendiculairement à la direction du flux. En dosant la vitesse du flux, les filaments parallèles du réseau formé sont étirés par les lignes de courant mais le réseaux branché d'actine reste solidaire au micropattern. La dépolymérisation des filaments d'actine dans une telle configuration sous flux est plus rapide que dans la configuration sans flux. L'étude de la vitesse de dépolymérisation d'un réseau de filaments d'actine mécaniquement hétérogène que nous avions du mal à réaliser devient donc faisable. De plus l'alignement des filaments avec les lignes de courant rend les mesures plus rapides.

En diminuant fortement la densité de filaments d'actine issus du micropattern (ce qui est possible en diminuant la quantité de complexes Arp2/3 greffés sur le micropattern) et en utilisant la microscopie de fluorescence à onde évanescente, nous pourrions étudier le filament d'actine individuel sous contrainte hydrodynamique, l'extrémité pointue ancrée dans le réseau branché sur le micropattern et l'extrémité barbée libre. L'étude des interaction des protéines associées à l'actine sur ces filament dont l'étirement est contrôlable par le flux pourrait révéler des résultats intéressants.

Fibre de stress sous flux

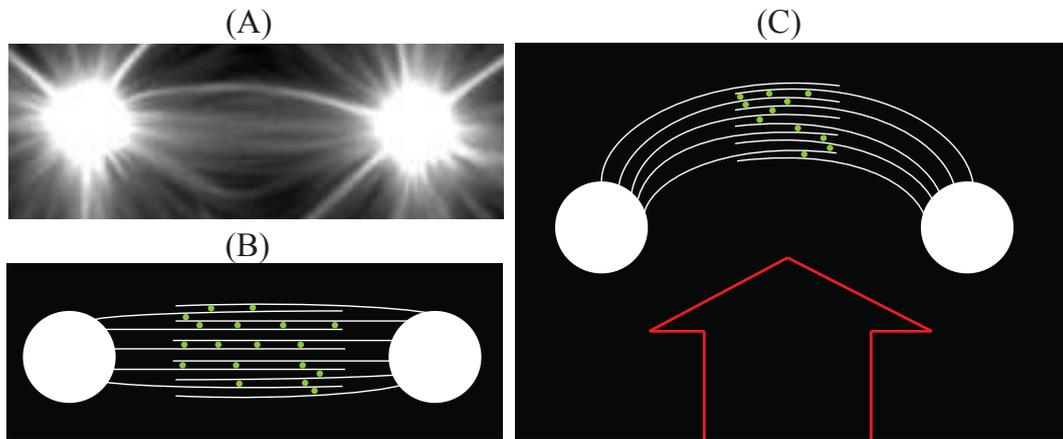


FIGURE 3.4 – (A) Une fibre de stress élémentaire reconstituée *in vitro* : deux micropat-
terns WASP en disque polymérisent des filaments d’actine qui se croisent parallèlement.
(B) Schéma d’une fibre de stress élémentaire reconstituée *in vitro* et mise sous tension par
des myosines (points verts). (C) Schéma d’application d’un flux hydrodynamique perpen-
diculairement à la fibre de stress dans un canal microfluidique.

En imposant un flux hydrodynamique perpendiculairement à une fibre stress élémentaire, cette dernière aurait tendance à se courber sous l’effet des forces en présence. Ceci créerait une force au sein de la fibre de stress allant à l’opposé de celle qui est générée par les myosines. Ce type d’étude peut permettre de répondre à des questions intéressantes : - Quelle est la valeur de la force contractile exercée, dans une fibre de stress, par tête de myosine et par unité de longueur de filament d’actine ? - Quel est le seuil de force au delà duquel la myosine n’effectue plus son travail sur les filaments d’actine ? - Comment les myosines sont-elles recrutées en fonction de la tension dans la fibre de stress ? etc.

3.3 Commercialisation et utilisation de la puce à cellules

Commercialisation

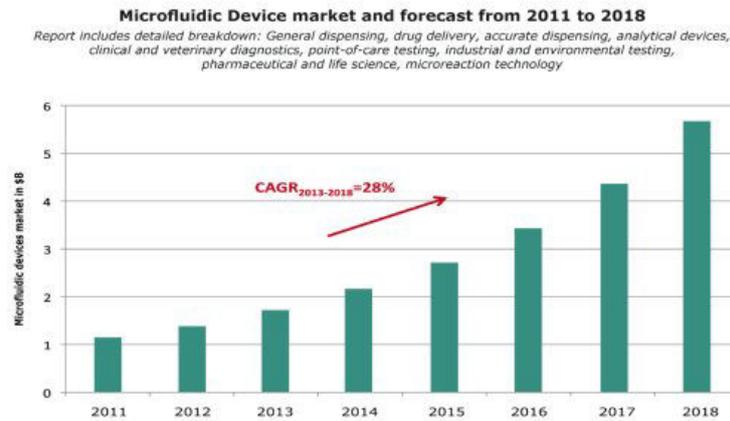


FIGURE 3.5 – Le marché de la microfluidique.

L'industrie des systèmes microfluidiques est dans un marché florissant. L'entreprise IBIDI possède les dernières technologies pour produire des puces microfluidiques en matière plastique bio-compatible dédiées à diverses applications. Cette entreprise est intéressé par la géométrie de la puce à chambre sans flux que nous avons développée. Nous pourrions collaborer avec eux à la fabrication de notre puce, en matière plastique, et dotée d'un traitement adhésif sur la surface microstructurée (Figure 6).

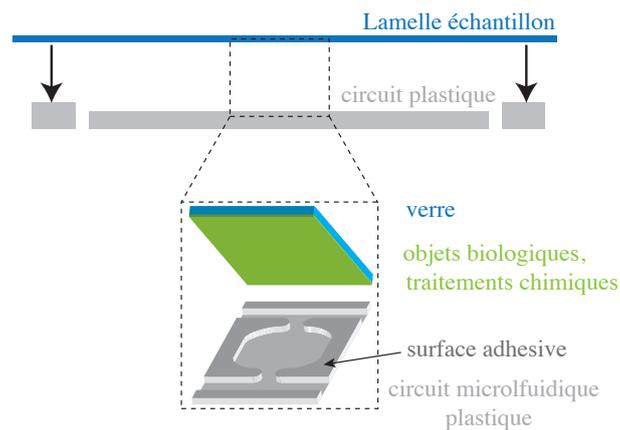


FIGURE 3.6 – Schéma de montage d'une puce à chambre sans flux en matière plastique à surface collante.

Utilisation pour l'étude des cellules souches hématopoïétiques

Le terme cellule souche hématopoïétique (CSH) est un terme générique qui désigne en fait une large population de cellules. De manière générale, la puce à cellules peut permettre de déterminer comment les facteurs physico-chimiques influencent la différenciation d'une cellule souche hématopoïétique individuelle. Mais nous pourrions aussi l'utiliser pour étudier comment l'adhésion cellulaire, la rigidité du substrat, et la présence de cellules voisines régulent la différenciation et les divisions des CSHs. Pour examiner les interactions qui existent entre les cellules souches hématopoïétiques et les cellules de leur niche, nous pourrions soit remplir les chambres microfluidiques avec les cellules de la niche et les CSHs en même temps (co-culture), soit remplir d'abord les chambres microfluidiques avec les CSHs puis injecter le milieu de culture des cellules de la niche contenant tous les facteurs biochimiques qu'elles sécrètent dans les canaux d'alimentation. La comparaison de ces deux approches nous permettra de discerner les effets induits par le contact des CSHs avec les cellules de leur niche.

3.4 Puce à gradient de flux hydrodynamique pour les cellules adhérentes

In vivo, les forces hydrodynamiques générées par les flux interstitiels sont de l'ordre de 3 dyn.cm^2 [154] et le flux artériel physiologique est de l'ordre de 15 dyn.cm^2 [172]. Les cellules sont très sensibles aux forces de cisaillement hydrodynamiques externes. Des forces de 0.4 à 0.8 dyn.cm^2 suffisent à modifier significativement le niveau d'expression de certains gènes [8, 121]. Une force de 1 dyn.cm^2 suffit à induire la dépolymérisation des filaments d'actine de cellules de rein [7]. Sous un flux exerçant des forces allant de 0.5 à 2 dyn.cm^2 les trophoblastes migrent dans la direction opposée au flux et sous un flux exerçant des forces allant de 4 à 6 dyn.cm^2 , ils migrent dans la direction du flux [67]. Des forces de 2.5 à 10 dyn.cm^2 jouent un rôle critique dans la régulation de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses [81]. Quand des cellules endothéliales de l'artère ombilicale sont exposées à des flux laminaires exerçant des forces hydrodynamiques de 15 dyn.cm^2 , tous les cils primaires se désassemblent [172]. Une force de 30 dyn.cm^2 sur des cellules A549 induit une réorganisation structurale des réseaux de filaments intermédiaires [151].

L'entreprise IBIDI (et d'autres entreprises) produisent des circuits microfluidiques dédiés à l'étude de l'influence des forces hydrodynamiques sur les cellules adhérentes. Nous pourrions utiliser le phénomène de gradient de flux qui se produit dans les premières et les dernières chambres d'une ligne et amplifier ce phénomène en adaptant la géométrie pour avoir toute la gamme d'intensité de flux hydrodynamique de chambre à chambre. Ainsi, nous pourrions isoler des cellules adhérentes dans les chambres, stopper le flux le temps de l'adhésion des cellules, sur des micropatterns fibronectine éventuellement, puis relancer le flux pour étudier toute la gamme des forces de cisaillement hydrodynamiques sur les cellules (Figure 7).

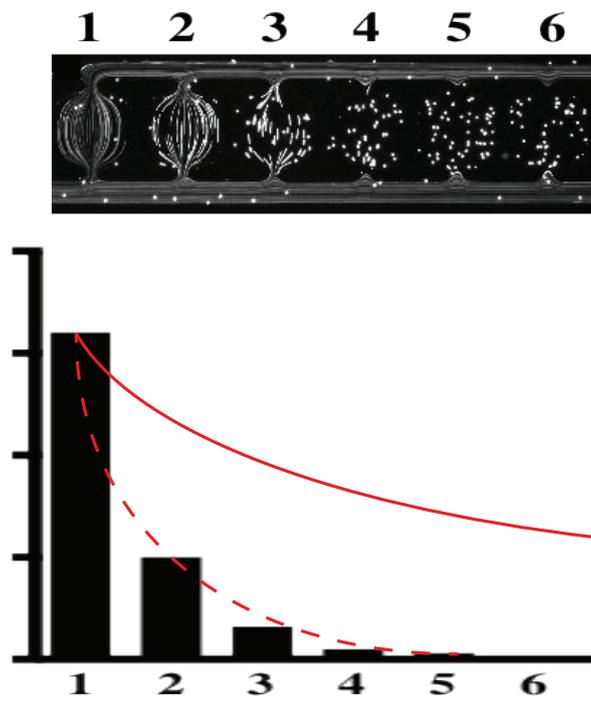


FIGURE 3.7 – En haut : écoulement de billes dans les 6 premières chambres d'une ligne (voir Figure 2.33). En bas : histogramme des vitesses mesurées dans les 6 premières chambres d'une ligne. Courbe rouge en pointillés : "fit" du gradient de flux d'une chambre à l'autre. Courbe rouge pleine : gradient de flux d'une chambre à l'autre (hypothétique) après modification adaptée de la géométrie de la ligne de chambres.

Bibliographie

- [1] Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy. 1387–402.
- [2] Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. 423–35.
- [3] Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. 13–23.
- [4] The role of the FH1 domain and profilin in formin-mediated actin-filament elongation and nucleation. 9–19.
- [5] Biomimetic F-actin cortex models. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 10, 16 (Nov. 2009), 2777–86.
- [6] VASP is a processive actin polymerase that requires monomeric actin for barbed end association. 571–84.
- [7] Fluid-shear-stress-induced translocation of aquaporin-2 and reorganization of actin cytoskeleton in renal tubular epithelial cells. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 3, 2 (Feb. 2011), 134–41.
- [8] Flow-induced prostaglandin E2 release regulates Na and K transport in the collecting duct. *American journal of physiology. Renal physiology* 303, 5 (Sept. 2012), F632–8.
- [9] ACHARD, V., MARTIEL, J.-L., MICHELOT, A., GUÉRIN, C., REYMANN, A.-C., BLANCHOIN, L., AND BOUJEMAA-PATERSKI, R. A "primer"-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Current biology : CB* 20, 5 (Mar. 2010), 423–8.
- [10] ALBRECHT, D. R., UNDERHILL, G. H., RESNIKOFF, J., MENDELSON, A., BHATIA, S. N., AND SHAH, J. V. Microfluidics-integrated time-lapse imaging for analysis of cellular dynamics. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 2, 5-6 (June 2010), 278–87.

- [11] ALLARD, J., AND MOGILNER, A. NIH Public Access. 107–115.
- [12] ANENE-NZELU, C. G., PEH, K. Y., FRAISZUDEEN, A., KUAN, Y. H., NG, S. H., TOH, Y. C., LEO, H. L., AND YU, H. Scalable alignment of three-dimensional cellular constructs in a microfluidic chip. *Lab on a Chip* 13, 20 (Oct. 2013), 4124–33.
- [13] ATENCIA, J., MORROW, J., AND LOCASCIO, L. E. The microfluidic palette : a diffusive gradient generator with spatio-temporal control. *Lab on a chip* 9, 18 (Sept. 2009), 2707–14.
- [14] AZIOUNE, A., STORCH, M., BORNENS, M., THÉRY, M., AND PIEL, M. Simple and rapid process for single cell micro-patterning. *Lab on a chip* 9, 11 (June 2009), 1640–2.
- [15] BALAGADDÉ, F. K., YOU, L., HANSEN, C. L., ARNOLD, F. H., AND QUAKE, S. R. Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. *Science (New York, N.Y.)* 309, 5731 (July 2005), 137–40.
- [16] BARBULOVIC-NAD, I., AU, S. H., AND WHEELER, A. R. A microfluidic platform for complete mammalian cell culture. *Lab on a chip* 10, 12 (June 2010), 1536–42.
- [17] BARBULOVIC-NAD, I., YANG, H., PARK, P. S., AND WHEELER, A. R. Digital microfluidics for cell-based assays. *Lab on a chip* 8, 4 (Apr. 2008), 519–26.
- [18] BARRAL, J., AND MARTIN, P. The physical basis of active mechanosensitivity by the hair-cell bundle. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery* 19, 5 (2011), 369–375.
- [19] BARTOLO, D., DEGRÉ, G., NGHE, P., AND STUDER, V. Microfluidic stickers. *Lab on a chip* 8, 2 (Mar. 2008), 274–9.
- [20] BELTZNER, C. C., AND POLLARD, T. D. Pathway of actin filament branch formation by Arp2/3 complex. *The Journal of biological chemistry* 283, 11 (Mar. 2008), 7135–44.
- [21] BHATTACHARYA, S., DATTA, A., BERG, J., AND GANGOPADHYAY, S. Studies on surface wettability of poly(dimethyl) siloxane (PDMS) and glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength. *Journal of Microelectromechanical Systems* 14, 3 (June 2005), 590–597.
- [22] BLAGOVIC, K., KIM, L. Y., AND VOLDMAN, J. Microfluidic perfusion for regulating diffusible signaling in stem cells. *PloS one* 6, 8 (Jan. 2011), e22892.

BIBLIOGRAPHIE

- [23] BLANCHOIN, L., AMANN, K. J., HIGGS, H. N., MARCHAND, J.-B., KAISER, D. A., AND POLLARD, T. D. Direct observation of dendritic actin complex and WASP / Scar proteins. 1007–1011.
- [24] BODAS, D., AND KHAN-MALEK, C. Formation of more stable hydrophilic surfaces of PDMS by plasma and chemical treatments. *Microelectronic Engineering* 83, 4-9 (Apr. 2006), 1277–1279.
- [25] BOONE, T. D., FAN, Z. H., HOOPER, H. H., RICCO, A. J., TAN, H., AND WILLIAMS, S. J. Peer reviewed : plastic advances microfluidic devices. *Analytical chemistry* 74, 3 (2002), 78–A.
- [26] BREITSPRECHER, D., KIESEWETTER, A. K., LINKNER, J., VINZENZ, M., STRADAL, T. E. B., SMALL, J. V., CURTH, U., DICKINSON, R. B., AND FAIX, J. Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation. *The EMBO journal* 30, 3 (Feb. 2011), 456–67.
- [27] BURRIDGE, K., AND WITTCHEM, E. S. The tension mounts : stress fibers as force-generating mechanotransducers. *The Journal of cell biology* 200, 1 (Jan. 2013), 9–19.
- [28] BURTON, K., AND TAYLOR, D. L. Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata. *Nature* 385, 6615 (Jan. 1997), 450–4.
- [29] BUXBOIM, A., AND DISCHER, D. E. Stem cells feel the difference. *Nature methods* 7, 9 (Sept. 2010), 695–7.
- [30] CAMERON, L. A., SVITKINA, T. M., VIGNJEVIC, D., THERIOT, J. A., AND BORISY, G. G. Dendritic organization of actin comet tails. *Current biology : CB* 11, 2 (Jan. 2001), 130–5.
- [31] CHEN, H., ROSENGARTEN, G., LI, M., AND NORDON, R. E. Design of microdevices for long-term live cell imaging. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 22, 6 (June 2012), 065033.
- [32] CHEN, Q., WU, J., ZHUANG, Q., LIN, X., ZHANG, J., AND LIN, J.-M. Microfluidic isolation of highly pure embryonic stem cells using feeder-separated co-culture system. *Scientific reports* 3 (Jan. 2013), 2433.
- [33] CHESARONE, M. A., DUPAGE, A. G., AND GOODE, B. L. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11, 1 (Jan. 2010), 62–74.
- [34] CHHABRA, E. S., AND HIGGS, H. N. The many faces of actin : matching assembly factors with cellular structures. *Nature cell biology* 9, 10 (Oct. 2007), 1110–21.

- [35] CHRISTAKIS, N. A., AND FOWLER, J. H. The collective dynamics of smoking in a large social network. *The New England journal of medicine* 358, 21 (May 2008), 2249–58.
- [36] CHUNG, S., SUDO, R., MACK, P. J., WAN, C.-R., VICKERMAN, V., AND KAMM, R. D. Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform. *Lab on a chip* 9, 2 (Jan. 2009), 269–75.
- [37] CIMETTA, E., SIRABELLA, D., YEAGER, K., DAVIDSON, K., SIMON, J., MOON, R. T., AND VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Microfluidic bioreactor for dynamic regulation of early mesodermal commitment in human pluripotent stem cells. *Lab on a chip* 13, 3 (Feb. 2013), 355–64.
- [38] CRAMER, L. P., SIEBERT, M., AND MITCHISON, T. J. Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts : implications for the generation of motile force. *The Journal of cell biology* 136, 6 (Mar. 1997), 1287–305.
- [39] DESHPANDE, S., AND PFOHL, T. Hierarchical self-assembly of actin in micro-confinements using microfluidics. *Biomicrofluidics* 6, 3 (Jan. 2012), 34120.
- [40] DI CARLO, D., WU, L. Y., AND LEE, L. P. Dynamic single cell culture array. *Lab on a chip* 6, 11 (Nov. 2006), 1445–9.
- [41] DOMANSKY, K., LESLIE, D. C., MCKINNEY, J., FRASER, J. P., SLIZ, J. D., HAMKINS-INDIK, T., HAMILTON, G. A., BAHINSKI, A., AND INGBER, D. E. Clear castable polyurethane elastomer for fabrication of microfluidic devices. *Lab on a chip* 13, 19 (Oct. 2013), 3956–64.
- [42] DUFFY, D. C., McDONALD, J. C., SCHUELLER, O. J., AND WHITESIDES, G. M. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Analytical chemistry* 70, 23 (Dec. 1998), 4974–84.
- [43] FALEY, S. L., COPLAND, M., REBOUD, J., AND COOPER, J. M. Cell chip array for microfluidic proteomics enabling rapid in situ assessment of intracellular protein phosphorylation. *Biomicrofluidics* 5, 2 (June 2011), 24106.
- [44] FALEY, S. L., COPLAND, M., WLODKOWIC, D., KOLCH, W., SEALE, K. T., WIKSWO, J. P., AND COOPER, J. M. Microfluidic single cell arrays to interrogate signalling dynamics of individual, patient-derived hematopoietic stem cells. *Lab on a chip* 9, 18 (Sept. 2009), 2659–64.

- [45] FALZONE, T. T., LENZ, M., KOVAR, D. R., AND GARDEL, M. L. Assembly kinetics determine the architecture of α -actinin crosslinked F-actin networks. *Nature communications* 3, May (Jan. 2012), 861.
- [46] FLETCHER, D. A. function. 644–650.
- [47] FLETCHER, D. A., AND MULLINS, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463, 7280 (Jan. 2010), 485–92.
- [48] FUJII, T., IWANE, A. H., YANAGIDA, T., AND NAMBA, K. Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. *Nature* 467, 7316 (Oct. 2010), 724–8.
- [49] FUSHIMI, K., AND VERKMAN, A. S. Low viscosity in the aqueous domain of cell cytoplasm measured by picosecond polarization microfluorimetry. *The Journal of cell biology* 112, 4 (Feb. 1991), 719–25.
- [50] GAO, Y., LI, P., AND PAPPAS, D. A microfluidic localized, multiple cell culture array using vacuum actuated cell seeding : integrated anti-cancer drug testing. *Biomedical microdevices* 15, 6 (Dec. 2013), 907–15.
- [51] GOBAA, S., HOEHNEL, S., ROCCIO, M., NEGRO, A., KOBEL, S., AND LUTOLF, M. P. Artificial niche microarrays for probing single stem cell fate in high throughput. *Nature methods* 8, 11 (Nov. 2011), 949–55.
- [52] GOODSSELL, D. S. The machinery of life.
- [53] GROISMAN, A., LOBO, C., CHO, H., CAMPBELL, J. K., DUFOUR, Y. S., STEVENS, A. M., AND LEVCHENKO, A. A microfluidic chemostat for experiments with bacterial and yeast cells. 685–689.
- [54] HAO, N., NAYAK, S., BEHAR, M., SHANKS, R. H., NAGIEC, M. J., ERREDE, B., HASTY, J., ELSTON, T. C., AND DOHLMAN, H. G. Regulation of cell signaling dynamics by the protein kinase-scaffold Ste5. *Molecular cell* 30, 5 (June 2008), 649–56.
- [55] HARASIM, M., WUNDERLICH, B., PELEG, O., KRÖGER, M., AND BAUSCH, A. Direct Observation of the Dynamics of Semiflexible Polymers in Shear Flow. *Physical Review Letters* 110, 10 (Mar. 2013), 108302.
- [56] HARRIS, E. S., AND HIGGS, H. N. Actin cytoskeleton : formins lead the way. *Current biology : CB* 14, 13 (July 2004), R520–2.
- [57] HAVIV, L., GILLO, D., BACKOUCHE, F., AND BERNHEIM-GROSWASSER, A. A cytoskeletal demolition worker : myosin II acts as an actin depolymerization agent. *Journal of molecular biology* 375, 2 (Jan. 2008), 325–30.

- [58] HEYMAN, N. S., AND BURT, J. M. Hindered diffusion through an aqueous pore describes invariant dye selectivity of Cx43 junctions. *Biophysical journal* 94, 3 (Feb. 2008), 840–54.
- [59] HIGASHIDA, C., MIYOSHI, T., FUJITA, A., OCEGUERA-YANEZ, F., MONYPENNY, J., ANDOU, Y., NARUMIYA, S., AND WATANABE, N. Actin polymerization-driven molecular movement of mdia1 in living cells. *Science* 303, 5666 (2004), 2007–2010.
- [60] HONG, S., PAN, Q., AND LEE, L. P. Single-cell level co-culture platform for intercellular communication. *Integr. Biol.* 4, 4 (2012), 374–380.
- [61] HOTULAINEN, P., AND LAPPALAINEN, P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *The Journal of cell biology* 173, 3 (May 2006), 383–94.
- [62] HSU, T.-H., XIAO, J.-L., TSAO, Y.-W., KAO, Y.-L., HUANG, S.-H., LIAO, W.-Y., AND LEE, C.-H. Analysis of the paracrine loop between cancer cells and fibroblasts using a microfluidic chip. *Lab on a chip* 11, 10 (May 2011), 1808–14.
- [63] HUANG, C. P., LU, J., SEON, H., LEE, A. P., FLANAGAN, L. A., KIM, Y., PUTNAM, A. J., AND JEON, N. L. NIH Public Access. 1740–1748.
- [64] HUANG, N.-P., VÖRÖS, J., DE PAUL, S. M., TEXTOR, M., AND SPENCER, N. D. Biotin-derivatized poly (l-lysine)-g-poly (ethylene glycol) : A novel polymeric interface for bioaffinity sensing. *Langmuir* 18, 1 (2002), 220–230.
- [65] HUI, A. Y. N., WANG, G., LIN, B., AND CHAN, W.-T. Microwave plasma treatment of polymer surface for irreversible sealing of microfluidic devices. *Lab on a chip* 5, 10 (Oct. 2005), 1173–7.
- [66] IRIMIA, D., CHARRAS, G., AGRAWAL, N., MITCHISON, T., AND TONER, M. Polar stimulation and constrained cell migration in microfluidic channels. *Lab on a chip* 7, 12 (Dec. 2007), 1783–90.
- [67] JAMES, J. L., CARTWRIGHT, J. E., WHITLEY, G. S., GREENHILL, D. R., AND HOPPE, A. The regulation of trophoblast migration across endothelial cells by low shear stress : consequences for vascular remodelling in pregnancy. *Cardiovascular research* 93, 1 (Jan. 2012), 152–61.
- [68] JANMEYSONLL, P. A., HVIDT, S., KASSO, J., LERCHESS, D., MAGGSOO, A., SACKMANNLLII, E., SCHLIWA, M., AND STOSSELSON, T. P. The Mechanical Properties of Actin Gels. 32503–32513.
- [69] JÉGOU, A., CARLIER, M.-F., AND ROMET-LEMONNE, G. © 2012 Landes Bioscience . © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . 271–276.

- [70] JÉGOU, A., NIEDERMAYER, T., ORBÁN, J., DIDRY, D., LIPOWSKY, R., CARLIER, M.-F., AND ROMET-LEMONNE, G. Individual actin filaments in a microfluidic flow reveal the mechanism of ATP hydrolysis and give insight into the properties of profilin. *PLoS biology* 9, 9 (Sept. 2011), e1001161.
- [71] JEGOU, ANTOINE AND CARLIER, MARIE-FRANCE AND ROMET-LEMONNE, GUILLAUME, JOURNAL=NATURE COMMUNICATIONS, V. P. Y. P. Formin mdial senses and generates mechanical forces on actin filaments.
- [72] KAMASAKI, T., OSUMI, M., AND MABUCHI, I. Three-dimensional arrangement of F-actin in the contractile ring of fission yeast. *The Journal of cell biology* 178, 5 (Aug. 2007), 765–71.
- [73] KAMEI, K.-I., GUO, S., YU, Z. T. F., TAKAHASHI, H., GSCHWENG, E., SUH, C., WANG, X., TANG, J., MCLAUGHLIN, J., WITTE, O. N., LEE, K.-B., AND TSENG, H.-R. An integrated microfluidic culture device for quantitative analysis of human embryonic stem cells. *Lab on a chip* 9, 4 (Feb. 2009), 555–63.
- [74] KANG, E., CHOI, Y. Y., JUN, Y., CHUNG, B. G., AND LEE, S.-H. Development of a multi-layer microfluidic array chip to culture and replat uniform-sized embryoid bodies without manual cell retrieval. *Lab on a chip* 10, 20 (Oct. 2010), 2651–4.
- [75] KANTSLER, V., AND GOLDSTEIN, R. E. Fluctuations, Dynamics, and the Stretch-Coil Transition of Single Actin Filaments in Extensional Flows. *Physical Review Letters* 108, 3 (Jan. 2012), 038103.
- [76] KAWADA, J., KIMURA, H., AKUTSU, H., SAKAI, Y., AND FUJII, T. Spatiotemporally controlled delivery of soluble factors for stem cell differentiation. *Lab on a chip* 12, 21 (Nov. 2012), 4508–15.
- [77] KEENAN, T. M., FREVERT, C. W., WU, A., WONG, V., AND FOLCH, A. A new method for studying gradient-induced neutrophil desensitization based on an open microfluidic chamber. *Lab on a chip* 10, 1 (Jan. 2010), 116–22.
- [78] KEYMER, J. E., GALAJDA, P., MULDOON, C., PARK, S., AND AUSTIN, R. H. Bacterial metapopulations in nanofabricated landscapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 46 (Nov. 2006), 17290–5.
- [79] KHADEMOSSEINI, A., YEH, J., JON, S., ENG, G., SUH, K. Y., BURDICK, J. A., AND LANGER, R. Molded polyethylene glycol microstructures for capturing cells within microfluidic channels. *Lab on a chip* 4, 5 (Oct. 2004), 425–30.

- [80] KHOURY, M., BRANSKY, A., KORIN, N., KONAK, L. C., ENIKOLOPOV, G., TZCHORI, I., AND LEVENBERG, S. A microfluidic traps system supporting prolonged culture of human embryonic stem cells aggregates. *Biomedical microdevices* 12, 6 (Dec. 2010), 1001–8.
- [81] KIM, D. H., HEO, S.-J., KIM, S.-H., SHIN, J. W., PARK, S. H., AND SHIN, J.-W. Shear stress magnitude is critical in regulating the differentiation of mesenchymal stem cells even with endothelial growth medium. *Biotechnology letters* 33, 12 (2011), 2351–2359.
- [82] KIM, J., HEGDE, M., KIM, S. H., WOOD, T. K., AND JAYARAMAN, A. A microfluidic device for high throughput bacterial biofilm studies. *Lab on a chip* 12, 6 (Mar. 2012), 1157–63.
- [83] KING, K. R., WANG, S., IRIMIA, D., JAYARAMAN, A., TONER, M., AND YARMUSH, M. L. A high-throughput microfluidic real-time gene expression living cell array. *Lab on a chip* 7, 1 (Jan. 2007), 77–85.
- [84] KING, K. R., WANG, S., JAYARAMAN, A., YARMUSH, M. L., AND TONER, M. Microfluidic flow-encoded switching for parallel control of dynamic cellular microenvironments. *Lab on a chip* 8, 1 (Jan. 2008), 107–16.
- [85] KOBEL, S. A., BURRI, O., GRIFFA, A., GIROTRA, M., LUTOLF, M. P., AND SEITZ, A. Automated analysis of single stem cells in microfluidic traps. *Lab on a chip* 12, 16 (Aug. 2012), 2843–9.
- [86] KOHLER, S., AND BAUSCH, A. R. Contraction mechanisms in composite active actin networks. *PloS one* 7, 7 (Jan. 2012), e39869.
- [87] KOLNIK, M., TSIMRING, L. S., AND HASTY, J. Vacuum-assisted cell loading enables shear-free mammalian microfluidic culture. *Lab on a chip* 12, 22 (Nov. 2012), 4732–7.
- [88] KORN, E. D., CARLIER, M.-F., AND PANTALONI, D. Actin polymerization and atp hydrolysis. *Science* 238, 4827 (1987), 638–644.
- [89] KÖSTER, S., STEINHAUSER, D., AND PFOHL, T. Brownian motion of actin filaments in confining microchannels. *Journal of Physics : Condensed Matter* 17, 49 (Dec. 2005), S4091–S4104.
- [90] LACAYO, C. I., PINCUS, Z., VANDUIJN, M. M., WILSON, C. A., FLETCHER, D. A., GERTLER, F. B., MOGILNER, A., AND THERIOT, J. A. Emergence of large-scale cell morphology and movement from local actin filament growth dynamics. *PLoS biology* 5, 9 (Sept. 2007), e233.
- [91] LAPORTE, D., OJKIC, N., VAVYLONIS, D., AND WU, J.-Q. α -Actinin and fimbrin cooperate with myosin II to organize actomyosin bundles

- during contractile-ring assembly. *Molecular biology of the cell* 23, 16 (Aug. 2012), 3094–110.
- [92] LAWRENZ, A., NASON, F., AND COOPER-WHITE, J. J. Geometrical effects in microfluidic-based microarrays for rapid, efficient single-cell capture of mammalian stem cells and plant cells. *Biomicrofluidics* 6, 2 (June 2012), 24112–2411217.
- [93] LECAULT, V., VANINSBERGHE, M., SEKULOVIC, S., KNAPP, D. J. H. F., WOHRER, S., BOWDEN, W., VIEL, F., MCLAUGHLIN, T., JARANDEHEI, A., MILLER, M. M., FALCONNET, D., WHITE, A. K., KENT, D. G., COPLEY, M. R., TAGHIPOUR, F., EAVES, C. J., HUMPHRIES, R. K., PIRET, J. M., AND HANSEN, C. L. High-throughput analysis of single hematopoietic stem cell proliferation in microfluidic cell culture arrays. *Nature Methods* 8, 7 (July 2011), 581–586.
- [94] LEE, J. N., PARK, C., AND WHITESIDES, G. M. Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices. *Analytical chemistry* 75, 23 (Dec. 2003), 6544–54.
- [95] LEE, K., GALLOP, J. L., RAMBANI, K., AND KIRSCHNER, M. W. Self-assembly of filopodia-like structures on supported lipid bilayers. *Science (New York, N.Y.)* 329, 5997 (Sept. 2010), 1341–5.
- [96] LEE, P. J., HUNG, P. J., RAO, V. M., AND LEE, L. P. Nanoliter Scale Microbioreactor Array for Quantitative Cell Biology.
- [97] LIN, L., CHU, Y.-S., THIERY, J. P., LIM, C. T., AND RODRIGUEZ, I. Microfluidic cell trap array for controlled positioning of single cells on adhesive micropatterns. *Lab on a chip* 13, 4 (Feb. 2013), 714–21.
- [98] LIU, A. P., AND FLETCHER, D. A. Photopatterning of actin filament structures. *Nano letters* 5, 4 (Apr. 2005), 625–8.
- [99] LIU, K., PITCHIMANI, R., DANG, D., BAYER, K., HARRINGTON, T., AND PAPPAS, D. Cell culture chip using low-shear mass transport. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 24, 11 (June 2008), 5955–60.
- [100] LIU, Z., XIAO, L., XU, B., ZHANG, Y., MAK, A. F., LI, Y., MAN, W.-Y., AND YANG, M. Covalently immobilized biomolecule gradient on hydrogel surface using a gradient generating microfluidic device for a quantitative mesenchymal stem cell study. *Biomicrofluidics* 6, 2 (June 2012), 24111–2411112.
- [101] LOISEL, T. P., BOUJEMAA, R., PANTALONI, D., AND CARLIER, M. F. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 401, 6753 (Oct. 1999), 613–6.

BIBLIOGRAPHIE

- [102] LUBY-PHELPS, K. Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm : volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *International review of cytology* 192 (Jan. 2000), 189–221.
- [103] LUO, C., JIANG, L., LIANG, S., OUYANG, Q., JI, H., AND CHEN, Y. High-throughput microfluidic system for monitoring diffusion-based monolayer yeast cell culture over long time periods. *Biomedical microdevices* 11, 5 (Apr. 2009), 981–986–986.
- [104] LUO, C., ZHU, X., YU, T., LUO, X., OUYANG, Q., JI, H., AND CHEN, Y. A fast cell loading and high-throughput microfluidic system for long-term cell culture in zero-flow environments. *Biotechnology and bioengineering* 101, 1 (Sept. 2008), 190–5.
- [105] LUTOLF, M. P., DOYONNAS, R., HAVENSTRITE, K., KOLECKAR, K., AND BLAU, H. M. Perturbation of single hematopoietic stem cell fates in artificial niches. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 1, 1 (Jan. 2009), 59–69.
- [106] MACHESKY, L. M., MULLINS, R. D., HIGGS, H. N., KAISER, D. A., BLANCHON, L., MAY, R. C., HALL, M. E., AND POLLARD, T. D. Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7 (Mar. 1999), 3739–44.
- [107] MAMMOTO, T., MAMMOTO, A., TORISAWA, Y.-s., TAT, T., GIBBS, A., DERDA, R., MANNIX, R., DE BRUIJN, M., YUNG, C. W., HUH, D., AND INGBER, D. E. Mechanochemical control of mesenchymal condensation and embryonic tooth organ formation. *Developmental cell* 21, 4 (Oct. 2011), 758–69.
- [108] MANBACHI, A., SHRIVASTAVA, S., CIOFFI, M., CHUNG, B. G., MORETTI, M., DEMIRCI, U., YLIPERTTULA, M., AND KHADEMHOSEINI, A. Microcirculation within grooved substrates regulates cell positioning and cell docking inside microfluidic channels. *Lab on a chip* 8, 5 (May 2008), 747–54.
- [109] MÄNNIK, J., DRIESSEN, R., GALAJDA, P., KEYMER, J. E., AND DEKKER, C. Bacterial growth and motility in sub-micron constrictions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 35 (Sept. 2009), 14861–6.
- [110] MANUSCRIPT, A. NIH Public Access. 1293–1304.
- [111] MATA, A., FLEISCHMAN, A. J., AND ROY, S. Characterization of polydimethylsiloxane (PDMS) properties for biomedical micro/nanosystems. *Biomedical microdevices* 7, 4 (Dec. 2005), 281–93.

BIBLIOGRAPHIE

- [112] MAZZEI, D., GUZZARDI, M. A., GIUSTI, S., AND AHLUWALIA, A. A low shear stress modular bioreactor for connected cell culture under high flow rates. *Biotechnology and Bioengineering* 106, 1 (2010), 127–137.
- [113] McDONALD, J. C., AND WHITESIDES, G. M. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Accounts of chemical research* 35, 7 (July 2002), 491–9.
- [114] MICHEL, R., PASCHE, S., TEXTOR, M., AND CASTNER, D. G. NIH Public Access. 12327–12332.
- [115] MIRZAEI, M., PLA-ROCA, M., SAFAVIEH, R., NAZAROVA, E., SAFAVIEH, M., LI, H., VOGEL, J., AND JUNCKER, D. Microfluidic perfusion system for culturing and imaging yeast cell microarrays and rapidly exchanging media. *Lab on a chip* 10, 18 (Sept. 2010), 2449–57.
- [116] MIZUNO, H., HIGASHIDA, C., YUAN, Y., ISHIZAKI, T., NARUMIYA, S., AND WATANABE, N. Rotational movement of the formin mDia1 along the double helical strand of an actin filament. *Science (New York, N.Y.)* 331, 6013 (Jan. 2011), 80–3.
- [117] MRKSICH, M., CHEN, C. S., XIA, Y., DIKE, L. E., INGBER, D. E., AND WHITESIDES, G. M. Controlling cell attachment on contoured surfaces with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 20 (Oct. 1996), 10775–8.
- [118] MRKSICH, M., DIKE, L. E., TIEN, J., INGBER, D. E., AND WHITESIDES, G. M. Using microcontact printing to pattern the attachment of mammalian cells to self-assembled monolayers of alkanethiolates on transparent films of gold and silver. *Experimental cell research* 235, 2 (Sept. 1997), 305–13.
- [119] MULLINS, R. D., HEUSER, J. A., AND POLLARD, T. D. The interaction of Arp2/3 complex with actin : nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11 (May 1998), 6181–6.
- [120] MURRELL, M. P., AND GARDEL, M. L. F-actin buckling coordinates contractility and severing in a biomimetic actomyosin cortex.
- [121] MYERS, K. A., RATTNER, J. B., SHRIVE, N. G., AND HART, D. A. Osteoblast-like cells and fluid flow : cytoskeleton-dependent shear sensitivity. *Biochemical and biophysical research communications* 364, 2 (Dec. 2007), 214–9.

BIBLIOGRAPHIE

- [122] NARASIMHAN, J., AND PAPAUTSKY, I. Polymer embossing tools for rapid prototyping of plastic microfluidic devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 14, 1 (Jan. 2004), 96–103.
- [123] NARITA, A., AND MAÉDA, Y. Molecular determination by electron microscopy of the actin filament end structure. *Journal of molecular biology* 365, 2 (Jan. 2007), 480–501.
- [124] NIEDERMAYER, T., JÉGOU, A., CHIÈZE, L., GUICHARD, B., HELFER, E., ROMET-LEMONNE, G., CARLIER, M.-F., AND LIPOWSKY, R. Intermittent depolymerization of actin filaments is caused by photo-induced dimerization of actin protomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 27 (July 2012), 10769–74.
- [125] ONG, S.-M., ZHANG, C., TOH, Y.-C., KIM, S. H., FOO, H. L., TAN, C. H., VAN NOORT, D., PARK, S., AND YU, H. A gel-free 3D microfluidic cell culture system. *Biomaterials* 29, 22 (Aug. 2008), 3237–44.
- [126] PALUCH, E., VAN DER GUCHT, J., JOANNY, J.-F., AND SYKES, C. Deformations in actin comets from rocketing beads. *Biophysical journal* 91, 8 (Oct. 2006), 3113–22.
- [127] PARK, J., BERTHIAUME, F., TONER, M., YARMUSH, M. L., AND TILLES, A. W. Microfabricated grooved substrates as platforms for bioartificial liver reactors. *Biotechnology and bioengineering* 90, 5 (June 2005), 632–44.
- [128] PASIC, L., KOTOVA, T., AND SCHAFER, D. A. Ena/VASP proteins capture actin filament barbed ends. *The Journal of biological chemistry* 283, 15 (Apr. 2008), 9814–9.
- [129] PELLEGRIN, S., AND MELLOR, H. Actin stress fibres. *Journal of cell science* 120, Pt 20 (Oct. 2007), 3491–9.
- [130] POLLARD, T. D. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *The Journal of cell biology* 103, 6 Pt 2 (Dec. 1986), 2747–54.
- [131] POLLARD, T. D. Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. *Current opinion in cell biology* 22, 1 (Feb. 2010), 50–6.
- [132] POLLARD, T. D., BLANCHOIN, L., AND MULLINS, R. D. M m c a f d n c.
- [133] POLLARD, T. D., AND COOPER, J. A. Actin and actin-binding proteins. a critical evaluation of mechanisms and functions. *Annual review of biochemistry* 55, 1 (1986), 987–1035.

BIBLIOGRAPHIE

- [134] POLLARD, T. D., AND WU, J.-Q. Understanding cytokinesis : lessons from fission yeast. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11, 2 (Feb. 2010), 149–55.
- [135] PONTANI, L.-L., VAN DER GUCHT, J., SALBREUX, G., HEUVINGH, J., JOANNY, J.-F., AND SYKES, C. Reconstitution of an actin cortex inside a liposome. *Biophysical journal* 96, 1 (Jan. 2009), 192–8.
- [136] PORTRAN, D., GAILLARD, J., VANTARD, M., AND THERY, M. Quantification of MAP and molecular motor activities on geometrically controlled microtubule networks. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 70, 1 (Jan. 2013), 12–23.
- [137] REYMANN, A.-C., BOUJEMAA-PATERSKI, R., MARTIEL, J.-L., GUÉRIN, C., CAO, W., CHIN, H. F., DE LA CRUZ, E. M., THÉRY, M., AND BLANCHOIN, L. Actin network architecture can determine myosin motor activity. *Science (New York, N.Y.)* 336, 6086 (June 2012), 1310–4.
- [138] REYMANN, A.-C., MARTIEL, J.-L., CAMBIER, T., BLANCHOIN, L., BOUJEMAA-PATERSKI, R., AND THÉRY, M. Nucleation geometry governs ordered actin networks structures. *Nature materials* 9, 10 (Sept. 2010), 827–832.
- [139] REYMANN, A.-C., SUAREZ, C., GUÉRIN, C., MARTIEL, J.-L., STAIGER, C. J., BLANCHOIN, L., AND BOUJEMAA-PATERSKI, R. Turnover of branched actin filament networks by stochastic fragmentation with ADF/cofilin. *Molecular biology of the cell* 22, 14 (July 2011), 2541–50.
- [140] ROBINSON, R. C., TURBEDSKY, K., KAISER, D. A., MARCHAND, J. B., HIGGS, H. N., CHOE, S., AND POLLARD, T. D. Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science (New York, N.Y.)* 294, 5547 (Nov. 2001), 1679–84.
- [141] ROMERO, S., LE CLAINCHE, C., DIDRY, D., EGILE, C., PANTALONI, D., AND CARLIER, M.-F. Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* 119, 3 (Oct. 2004), 419–29.
- [142] RONDELEZ, Y., TRESSET, G., TABATA, K. V., ARATA, H., FUJITA, H., TAKEUCHI, S., AND NOJI, H. Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology. *Nature biotechnology* 23, 3 (Mar. 2005), 361–5.
- [143] ROTTNER, K., BEHRENDT, B., SMALL, J. V., AND WEHLAND, J. Vasp dynamics during lamellipodia protrusion. *Nature Cell Biology* 1, 5 (1999), 321–322.

- [144] ROWAT, A. C., BIRD, J. C., AGRESTI, J. J., RANDO, O. J., AND WEITZ, D. A. Tracking lineages of single cells in lines using a microfluidic device. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 43 (Oct. 2009), 18149–54.
- [145] SAADI, W., RHEE, S. W., LIN, F., VAHIDI, B., CHUNG, B. G., AND JEON, N. L. Generation of stable concentration gradients in 2D and 3D environments using a microfluidic ladder chamber. *Biomedical microdevices* 9, 5 (Oct. 2007), 627–35.
- [146] SCHLAPAK, R., ARMITAGE, D., SAUCEDO-ZENI, N., CHRZANOWSKI, W., HOHAGE, M., CARUANA, D., AND HOWORKA, S. Selective protein and dna adsorption on pll-peg films modulated by ionic strength. *Soft Matter* 5, 3 (2009), 613–621.
- [147] SHAMLOO, A., MA, N., POO, M.-M., SOHN, L. L., AND HEILSHORN, S. C. Endothelial cell polarization and chemotaxis in a microfluidic device. *Lab on a chip* 8, 8 (Aug. 2008), 1292–9.
- [148] SI, G., YANG, W., BI, S., LUO, C., AND OUYANG, Q. A parallel diffusion-based microfluidic device for bacterial chemotaxis analysis. *Lab on a chip* 12, 7 (Apr. 2012), 1389–94.
- [149] SI, G., ZHU, X., KANG, Y., LUO, C., OUYANG, Q., AND CHEN, Y. Diffusion-based concentration control in microcavities during long time period by programmed syringe pumps. *Microelectronic Engineering* 87, 5-8 (May 2010), 793–797.
- [150] SINGHVI, R., KUMAR, A., LOPEZ, G. P., STEPHANOPOULOS, G. N., WANG, D., WHITESIDES, G. M., AND INGBER, D. E. Engineering cell shape and function. *Science* 264, 5159 (1994), 696–698.
- [151] SIVARAMAKRISHNAN, S., SCHNEIDER, J. L., SITIKOV, A., GOLDMAN, R. D., AND RIDGE, K. M. Shear Stress Induced Reorganization of the Keratin Intermediate Filament Network Requires Phosphorylation by Protein Kinase C . 2755–2765.
- [152] SKELLEY, A. M., KIRAK, O., SUH, H., JAENISCH, R., AND VOLDMAN, J. Microfluidic control of cell pairing and fusion. 147–152.
- [153] SOFLA, A. Y. N., AND MARTIN, C. Study of the vapor-assisted method for bonding PDMS and glass : effect of the vapor source. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 20, 12 (Dec. 2010), 125024.
- [154] SONG, J. W., AND MUNN, L. L. Fluid forces control endothelial sprouting. 1–6.
- [155] SQUIRES, T. M. Microfluidics : Fluid physics at the nanoliter scale.

- [156] STUDER, V., PEPIN, A., AND CHEN, Y. Nanoembossing of thermoplastic polymers for microfluidic applications. *Applied physics letters* 80, 19 (2002), 3614–3616.
- [157] SUN, P., LIU, Y., SHA, J., ZHANG, Z., TU, Q., CHEN, P., AND WANG, J. High-throughput microfluidic system for long-term bacterial colony monitoring and antibiotic testing in zero-flow environments. *Biosensors & bioelectronics* 26, 5 (Jan. 2011), 1993–9.
- [158] SURANENI, P., RUBINSTEIN, B., UNRUH, J. R., DURNIN, M., HANEIN, D., AND LI, R. The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration. *The Journal of cell biology* 197, 2 (Apr. 2012), 239–51.
- [159] SVITKINA, T. M., AND BORISY, G. G. Organization and Treadmilling of Actin Filament Array in Lamellipodia. 1009–1026.
- [160] TABELING, P. *Introduction to microfluidics*. Oxford University Press, 2010.
- [161] THERIOT, J. A., AND MITCHISON, T. J. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature* 352, 6331 (1991), 126–131.
- [162] THÉRY, M. Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *Journal of cell science* 123, Pt 24 (Dec. 2010), 4201–13.
- [163] THÉRY, M., RACINE, V., PÉPIN, A., PIEL, M., CHEN, Y., SIBARITA, J.-B., AND BORNENS, M. The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nature Cell Biology* 7, 10 (2005), 947.
- [164] THORESEN, T., LENZ, M., AND GARDEL, M. L. Reconstitution of contractile actomyosin bundles. *Biophysical journal* 100, 11 (June 2011), 2698–705.
- [165] THORESEN, T., LENZ, M., AND GARDEL, M. L. Thick filament length and isoform composition determine self-organized contractile units in actomyosin bundles. *Biophysical journal* 104, 3 (Feb. 2013), 655–65.
- [166] TOEPKE, M. W., AND BEEBE, D. J. PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. *Lab on a chip* 6, 12 (Dec. 2006), 1484–6.
- [167] TOH, Y.-C., LIM, T. C., TAI, D., XIAO, G., VAN NOORT, D., AND YU, H. A microfluidic 3D hepatocyte chip for drug toxicity testing. *Lab on a chip* 9, 14 (July 2009), 2026–35.
- [168] TOJKANDER, S., GATEVA, G., AND LAPPALAINEN, P. Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles. *Journal of cell science* 125, Pt 8 (Apr. 2012), 1855–64.

- [169] TRICHET, L., CAMPÀS, O., SYKES, C., AND PLASTINO, J. VASP governs actin dynamics by modulating filament anchoring. *Biophysical journal* 92, 3 (Feb. 2007), 1081–9.
- [170] UHRIG, K., KURRE, R., SCHMITZ, C., CURTIS, J. E., HARASZTI, T., CLEMEN, A. E.-M., AND SPATZ, J. P. Optical force sensor array in a microfluidic device based on holographic optical tweezers. *Lab on a chip* 9, 5 (Mar. 2009), 661–8.
- [171] VAN DER GUCHT, J., PALUCH, E., PLASTINO, J., AND SYKES, C. Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 22 (May 2005), 7847–52.
- [172] VAN DER HEIDEN, K., GROENENDIJK, B. C. W., HIERCK, B. P., HOGERS, B., KOERTEN, H. K., MOMMAAS, A. M., GITTENBERGER-DE GROOT, A. C., AND POELMANN, R. E. Monocilia on chicken embryonic endocardium in low shear stress areas. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235, 1 (Jan. 2006), 19–28.
- [173] VANDERSARL, J. J., XU, A. M., AND MELOSH, N. A. Rapid spatial and temporal controlled signal delivery over large cell culture areas. *Lab on a Chip* 11, 18 (2011), 3057–3063.
- [174] VANDERSARL, J. J., XU, A. M., AND MELOSH, N. A. Rapid spatial and temporal controlled signal delivery over large cell culture areas. *Lab on a Chip* 11, 18 (2011), 3057–3063.
- [175] VIDALI, L., VAN GISBERGEN, P. A. C., GUÉRIN, C., FRANCO, P., LI, M., BURKART, G. M., AUGUSTINE, R. C., BLANCHOIN, L., AND BEZANILLA, M. Rapid formin-mediated actin-filament elongation is essential for polarized plant cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 32 (Aug. 2009), 13341–6.
- [176] VIGNAUD, T., GALLAND, R., TSENG, Q., BLANCHOIN, L., COLOMBELLI, J., AND THÉRY, M. Reprogramming cell shape with laser nano-patterning *Journal of Cell Science*. 1–10.
- [177] VIGNJEVIC, D., YARAR, D., WELCH, M. D., PELOQUIN, J., SVITKINA, T., AND BORISY, G. G. Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *The Journal of cell biology* 160, 6 (Mar. 2003), 951–62.
- [178] VINZENZ, M., NEMETHOVA, M., SCHUR, F., MUELLER, J., NARITA, A., URBAN, E., WINKLER, C., SCHMEISER, C., KOESTLER, S. A.,

- ROTTNER, K., ET AL. Actin branching in the initiation and maintenance of lamellipodia. *Journal of cell science* 125, 11 (2012), 2775–2785.
- [179] VOGEL, S. K., PETRASEK, Z., HEINEMANN, F., AND SCHWILLE, P. Myosin motors fragment and compact membrane-bound actin filaments. *eLife* 2 (Jan. 2013), e00116.
- [180] WACHSSTOCK, D., SCHWARZ, W., AND POLLARD, T. Cross-linker dynamics determine the mechanical properties of actin gels. *Biophysical Journal* 66, 3 (Mar. 1994), 801–809.
- [181] WAGNER, B., THARMANN, R., HAASE, I., FISCHER, M., AND BAUSCH, A. R. Cytoskeletal polymer networks : The molecular structure of cross-linkers determines.
- [182] WANG, H.-Y., BAO, N., AND LU, C. A microfluidic cell array with individually addressable culture chambers. *Biosensors & bioelectronics* 24, 4 (Dec. 2008), 613–7.
- [183] WANG, S., LI, E., GAO, Y., WANG, Y., GUO, Z., HE, J., ZHANG, J., GAO, Z., AND WANG, Q. Study on invadopodia formation for lung carcinoma invasion with a microfluidic 3D culture device. *PloS one* 8, 2 (Jan. 2013), e56448.
- [184] WEISSE, S., HEYDT, M., MAIER, T., SCHULZ, S., SPATZ, J. P., GRUNZE, M., HARASZTI, T., AND ROSENHAHN, A. Flow conditions in the vicinity of microstructured interfaces studied by holography and implications for the assembly of artificial actin networks. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 13, 29 (Aug. 2011), 13395–402.
- [185] WU, J.-Q. in Fission Yeast Counting Cytokinesis Proteins Globally and Locally in Fission Yeast.
- [186] WU, J.-Q., KUHN, J. R., KOVAR, D. R., AND POLLARD, T. D. Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis. *Developmental cell* 5, 5 (Nov. 2003), 723–34.
- [187] XIAOZHEN, D., SHAOXI, C., QUNFANG, Y., JIAHUAN, J., XIAOQING, Y., AND XIN, X. NIH Public Access. 3301–3309.
- [188] YANG, C., SVITKINA, T., AND VASP, E. Focus on the Arp2 / 3 complex and formins Filopodia initiation. 402–408.
- [189] YARAR, D., TO, W., ABO, A., AND WELCH, M. D. The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Current biology : CB* 9, 10 (May 1999), 555–8.

BIBLIOGRAPHIE

- [190] YU, M. K., PARK, J., AND JON, S. Targeting strategies for multi-functional nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Theranostics* 2, 1 (2012), 3.
- [191] ZENOBI, R. Single-cell metabolomics : analytical and biological perspectives. *Science (New York, N.Y.)* 342, 6163 (Dec. 2013), 1243259.
- [192] ZHANG, C., ZHAO, Z., ABDUL RAHIM, N. A., VAN NOORT, D., AND YU, H. Towards a human-on-chip : culturing multiple cell types on a chip with compartmentalized microenvironments. *Lab on a chip* 9, 22 (Nov. 2009), 3185–92.
- [193] ZHANG, M., DESAI, T., AND FERRARI, M. Proteins and cells on PEG immobilized silicon surfaces. *Biomaterials* 19, 10 (May 1998), 953–60.
- [194] ZUMDIECK, A., KRUSE, K., BRINGMANN, H., HYMAN, A. A., AND JÜLICHER, F. Stress generation and filament turnover during actin ring constriction. *PloS one* 2, 8 (Jan. 2007), e696.

Chapitre 4

Annexes : Publications et Brevet

Chapitre 4

Annexes : Publications et Brevet

Article 1

Nucléation geometry governs ordered actin networks structures
Reymann A.C., Martiel J.L., Cambier T., Blanchoin L., Boujemaa-Paterski R., They M.
Nat Mater, 2010.

Article 2

Design of a 2D no-flow chamber to monitor hematopoietic stem cells.
Cambier T., Honegger T., Vanneaux V., Berthier J., Peyrade D., Blanchoin L., Larghero J., They M.
Lab Chip, 2015.

Brevet

A microfluidic device including at least one no-flow chamber.
Cambier T., Honegger T., Berthier J., Larghero J., They M.
Demande européenne de brevet 2015, n^o EP14306645.4.

Article 1

Nucléation geometry governs ordered actin networks structures

Reymann A.C., Martiel J.L., Cambier T., Blanchoin L., Boujemaa-Paterski
R., They M.
Nat Mater, 2010.

nature materials

OCTOBER 2010 VOL 9 NO 10
www.nature.com/naturematerials

Boundary rules for actin

PRESSURE SENSORS
Rivals to human skin

MAGNETOELECTRICS
Room-temperature operation

SCIENCE IN MEXICO
The long road to progress

Nucleation geometry governs ordered actin networks structures

Anne-Cécile Reymann¹, Jean-Louis Martiel^{1,2}, Théo Cambier¹, Laurent Blanchoin¹,
Rajaa Boujemaa-Paterski^{1*} and Manuel Théry^{1*}

Actin filaments constitute one of the main components of cell cytoskeleton. Assembled into bundles in filopodia or in stress fibres, they play a pivotal role in eukaryotes during cell morphogenesis, adhesion and motility. The bundle emergence has been extensively related to specific actin regulators¹⁻³ *in vivo*⁴⁻⁷. Such dynamic modulation was also highlighted by biochemical reconstitution of the actin-network assembly, in bulk solution or with biomimetic devices⁸⁻¹⁸. However, the question of how geometrical boundaries, such as those encountered in cells, affect the dynamic formation of highly ordered actin structures remains poorly studied^{14,19}. Here we demonstrate that the nucleation geometry in itself can be the principal determinant of actin-network architecture. We developed a micropatterning method that enables the spatial control of actin nucleation sites for *in vitro* assays. Shape, orientation and distance between nucleation regions control filament orientation and length, filament-filament interactions and filopodium-like bundle formation. Modelling of filament growth and interactions demonstrates that basic mechanical and probabilistic laws govern actin assembly in higher-order structures.

In cells, actin nucleation occurs at various locations at the plasma membrane, and bundles of parallel actin filaments are initiated at focal adhesion sites¹ or result from the rearrangement of the dynamic branched actin network of the lamellipodium⁶. Here, we modulate the positioning of nucleation sites at scales corresponding to cellular dimensions. As a first step and to precisely regulate the position of actin nucleation sites *in vitro*, we used a recently developed ultraviolet-based micropatterning approach²⁰ to create a template for the localization of the nucleation promoting factor pWA (Fig. 1a). pWA comprises the C-terminal domains from the WASP/Scar proteins, a ubiquitous family of proteins that initiate actin polymerization on a pre-existing actin filament in the presence of the Arp2/3 complex and an actin monomer²¹⁻²³. A small volume of solution made of a minimal set of purified proteins ensuring actin polymerization^{8,10} was placed between the pWA-coated micropatterned slide and a glass support. Functionalized micropatterns specifically initiate actin filament nucleation on their surface and promote two-dimensional growth of actin filaments (Fig. 1b). Real-time visualization of actin-filament nucleation and growth highlighted the autocatalytic process of network formation (see Supplementary Fig. S1). These networks consist of filaments growing from the pWA-coated regions, with their fast-growing, barbed end oriented outwards (Fig. 1c and Supplementary Fig. S2 and Videos S1–S3). In agreement with actin-filament growth on glass rods¹⁵, as the nucleation waves propagate, dense and interconnected

networks are formed on the micropattern (Supplementary Fig. S1). Collectively, actin filaments emanating from this dense meshwork self-organize normally to the micropattern edge, except within the narrow region close to the bar end (Fig. 1c,d). Although densely organized into a parallel network, these filaments can be further gathered into larger bundles by the addition of cross-linking factors; we therefore refer to them as filaments rather than bundles. We term as bundles the structures unaffected by the subsequent addition of cross-linkers (see Supplementary Fig. S6a and Video S5). We validated that filament growth on the micropattern was sensitive to known biochemical parameters: filament length increased with the concentration of G-actin, and reduced with increasing concentrations of Arp2/3 or capping protein. In addition, these filaments are bundled by α -actinin or fascin (see Supplementary Figs S1 and S6).

We took advantage of the geometrical control of actin growth to investigate the interaction between two sets of actin filaments growing toward each other. We therefore analysed actin growth from individual, concentric or eccentric circles. Twenty- to thirty-micrometre-long actin filaments grew radially inwards and outwards (Fig. 2a). Surprisingly, the networks generated by three concentric circles spaced 15 μm apart did not simply superimpose and the centripetal arrangement of parallel bundles disappeared. Instead, the interactions between inward- and outward-growing filaments formed short and thin antiparallel bundles between adjacent circles. Interestingly, actin-filament elongation seemed to be blocked by the presence of the dense actin network formed on the adjacent circles. To verify this, we quantified the local actin-network density by averaging several images taken separately on identical micropatterns (Fig. 2b). In addition, to understand how actin-filament growth could lead to these actin density profiles, we carried out numerical simulations, where actin filaments were nucleated with a constant linear density along the circle (see Supplementary Fig. S3 and Equations). Filaments grew normally out of the circle and their length was determined by the biochemical conditions. Actin filaments were then allowed or not to cross adjacent nucleation regions (see Supplementary Fig. S3), and theoretical density maps were derived from the local density of simulated actin filaments (Fig. 2b). Numerical simulations showed that, on concentric circles, filaments did not cross the dense network region lying on their path. Conversely, when the distance between separate nucleation regions was reduced, as in the case of eccentric circles, the density within the inner circle was no longer isotropic. Numerical simulations confirmed that extra filaments enter this innermost region to locally increase fluorescence intensity (Fig. 2b). This demonstrates that short, and thus stiff, filaments can grow through the dense network whereas longer and more

¹Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, iRTSV, Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, CNRS/CEA/INRA/UJF, Grenoble, 38054, France, ²Laboratoire Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité, CNRS/UJF, Pavillon Taillefer Faculté de Médecine, La Tronche, 38706, France. *e-mail: rajaa.paterski@cea.fr; manuel.thery@cea.fr.

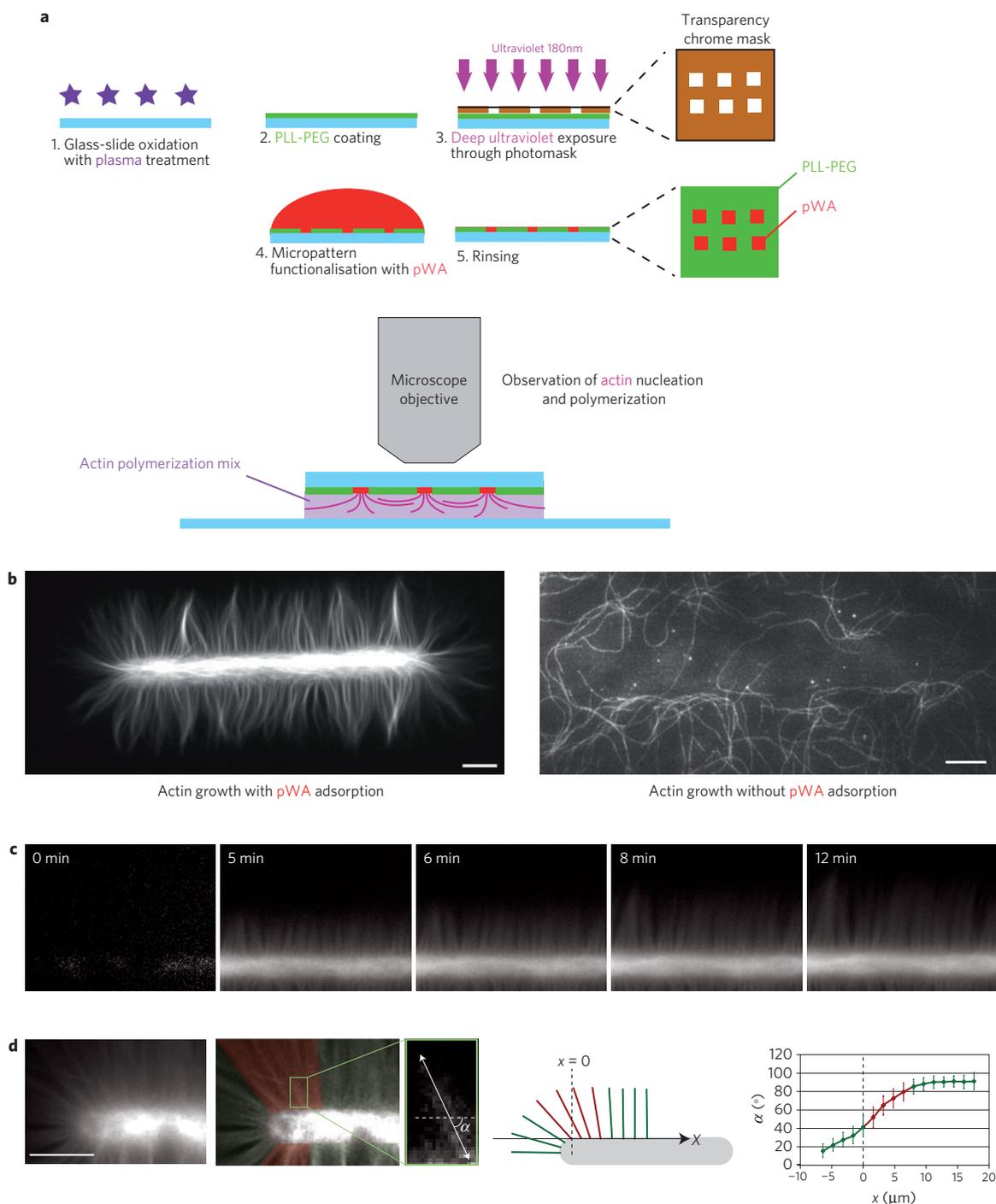


Figure 1 | Geometrical control of actin nucleation and growth. **a**, Surface-micropatterning method. **b**, Epifluorescence-microscopy images of actin filaments specifically nucleated on the pWA-coated micropattern, and of spontaneous filament polymerization in the solution in the absence of pWA-coating—no actin filament is recruited to the uncoated micropattern. **c**, Actin-filament nucleation and growth on a pWA-coated micropattern. **d**, The fluorescence image is filtered and the angle between the actin filament and the bar micropattern major axis manually measured with respect to their position (x) along the bar. The error bars (rightmost panel) represent the standard deviation calculated for 65 angles measured at each position (x). Filaments normal to the pattern edges are coloured green, and filaments of the transition region red. Scale bars indicate $10\ \mu\text{m}$. See also Supplementary Videos S1–S3.

flexible filaments become entangled and blocked by an adjacent actin network. Consequently, physical constraints in addition to biochemical cues regulate actin-filament length.

To further explore the role of geometrical parameters on actin-filament interactions and their resulting network structure, we forced contacts between filaments at various angles. When nucleated from two short bars, filaments first grew perpendicularly

to the bars, then interacted and zipped to form a filopodium-like parallel bundle (Fig. 3a, see Supplementary Fig. S4 and Video S4), reminiscent of that present *in vivo*⁶. This interaction forced the filaments to bend, so bundle formation depended on filaments' ability to change their growing direction. We tested this parameter by varying the angle between the two short bars (Fig. 3b) and quantified the formation of parallel bundles (Fig. 3c). For

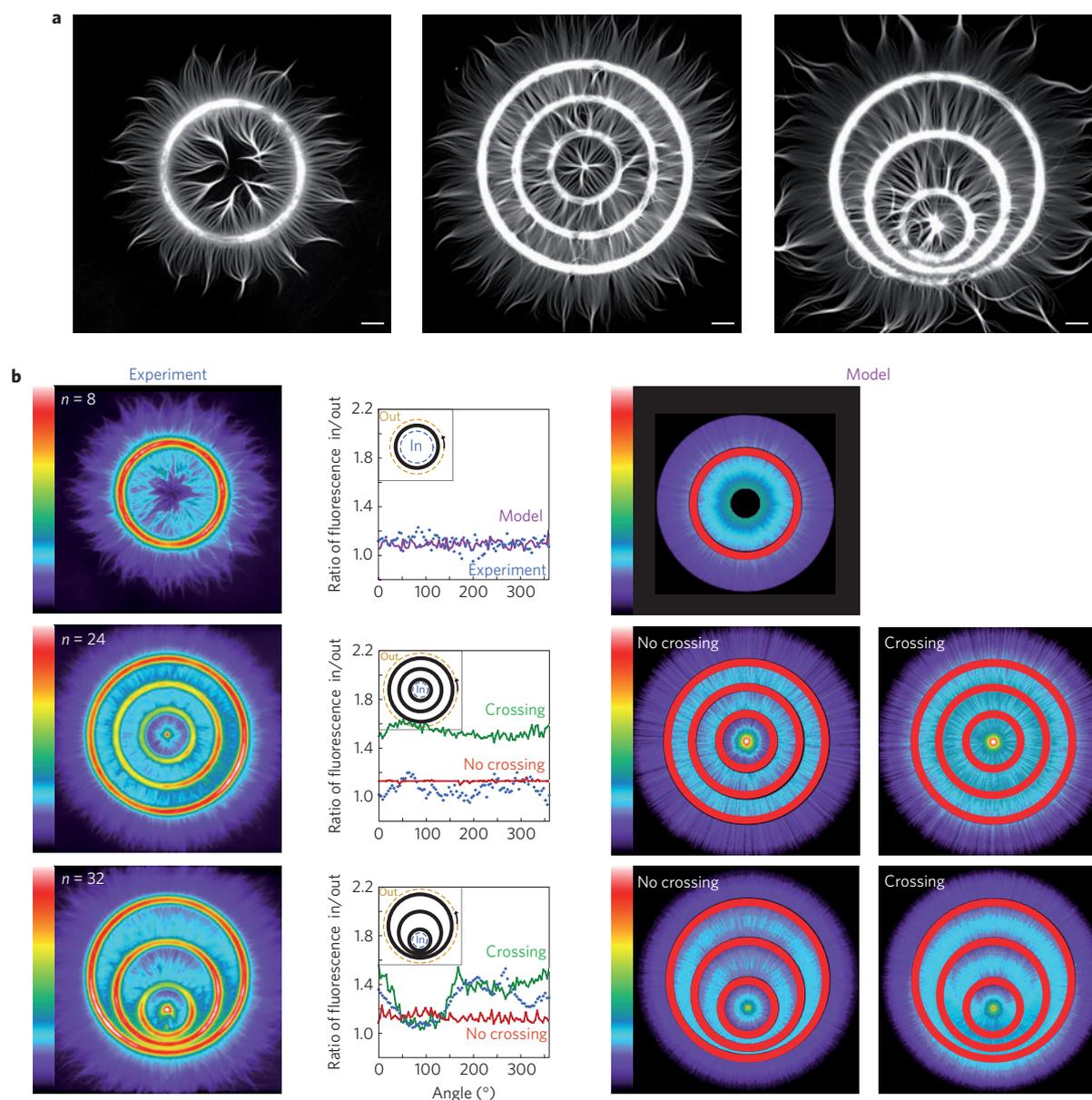


Figure 2 | Filament length controls their ability to cross dense actin networks. **a**, Fluorescent-microscopy images of actin structures formed on nucleation circles. Inward-growing filaments were brought together by the circle curvature and generated parallel bundles. **b**, Actin-network density maps calculated by overlaying and averaging several images (first column) and from numerical simulations of actin-filament growth (third and fourth columns). The averaged structure was colour-coded (see also Supplementary Fig. S3) and nucleation regions are represented in red. We measured the fluorescence ratio of line scans along the innermost circle and the external side of the outermost circle (as a reference) as in the inset image (second column, coloured dashed circles). The second column shows the comparison between the ratios of the experimental density maps (dots) and the ratios of the numerical simulations (lines) where actin filaments can or cannot cross the dense actin network. Scale bars indicate 10 μm .

nucleation bar angles close to 22° , filaments are associated into short and thin antiparallel bundles. Parallel bundles only started to form above a critical angle between 22° and 45° , and averaged image analysis confirmed the existence of an optimal angle to promote the coalescence of numerous filaments into a parallel bundle (Fig. 3d).

As we had demonstrated that the length and rigidity of filaments modulate their interaction with actin-filament networks, we investigated whether or not a variation in the distance at a given angle between two nucleation regions would affect bundle formation. For this purpose we designed eight-branched radial arrays where the rays were moved in and out from the origin. As expected, filaments grew outward from each ray and formed parallel bundles on the bisecting line between adjacent rays (Fig. 4a,b, and see Supplementary Fig. S4). When rays were sufficiently distant,

short parallel bundles formed precisely along the bisecting line and maintained this orientation. As the distance between rays decreased, bundles were longer, mis-positioned and curved (Fig. 4b,c). In all cases, the transition between the assembly of antiparallel bundles in the proximal part of the rays and the assembly of parallel bundles in their distal part occurred at a fairly variable position (Fig. 4d,e). Consequently, the distance between nucleation sites, in the range tested, was not critical to the generation of the final structure. The position of the transition from antiparallel to parallel bundles could be modelled as the result of intrinsic filament properties and collective assembly (Fig. 4f). If filaments assembled exclusively into antiparallel bundles in the proximal part of the network, filaments that contact one another would have a probability p to assemble into parallel bundles. This intrinsic probability p depends only on

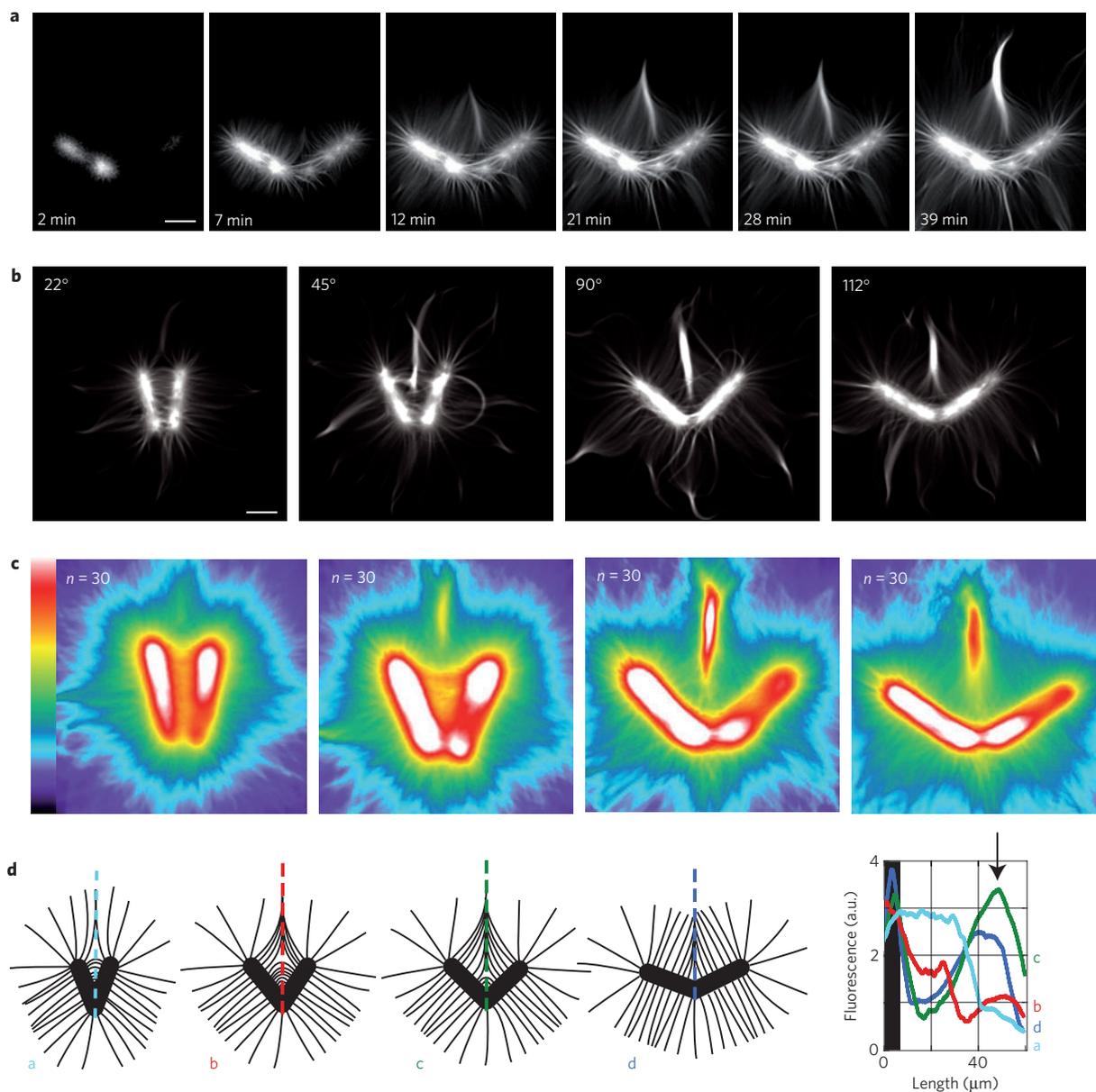


Figure 3 | Orientation of nucleation regions controls bundle formation. **a**, Nucleation, elongation and deformation of actin filaments nucleated on a 120° V-shaped nucleation zone. **b**, Fluorescence-microscopy images of actin structures formed on V-shaped zones with four different angles. **c**, Average fluorescent projection of 30 images for each angle. **d**, Schematic representation of bundle formation resulting from the interaction of actin filaments nucleated on the micropattern. The fluorescent-intensity distribution along the line scans (dotted lines) carried out on the averaged images relates the actin filament number involved in the bundle; the arrow, against curve c, indicates the maximum fluorescence corresponding to the bundle thickening at 45°. Scale bars indicate 10 μm. See also Supplementary Video S4.

filament orientation and therefore on their position along the ray (Fig. 1d and see Supplementary Fig. S5). If filaments formed a parallel bundle in the proximal network, the encountering filaments are forced to bend and contribute to this parallel bundle. Therefore the probability Q to form a parallel bundle is given by

$$Q(y+1) = p(y)(1 - Q(y)) + Q(y)$$

which gives

$$Q(y) = 1 - \prod_{k=0}^{y-1} (1 - p(k)) \quad (1)$$

where y is a discrete variable characterizing the position along the bisecting axis (see Supplementary Equations). The transition positions obtained from the probability function Q precisely

matched experimental data (Fig. 4g). As a transition point generates a parallel bundle made of all distal filaments, we calculated the bundle size and fluorescent intensity associated with each transition point (see Supplementary Equations). Our model accurately accounted for both the increase of fluorescence due to filament assembly into the bundle and the reduction of fluorescence due to various filament lengths within the bundle (Fig. 4h). These geometrically mediated bundles still occur in presence of two distinct actin cross-linkers in a concentration-dependent manner (see Supplementary Fig. S6 and Video S5). This confirms that bundle emergence is tightly controlled by mechanical properties of the actin filament²⁴.

Our reconstitution of the filopodium-like bundles relies on the spontaneous formation of a precursor structure formed by the collapse and the further coalescence of actin filaments emanating from

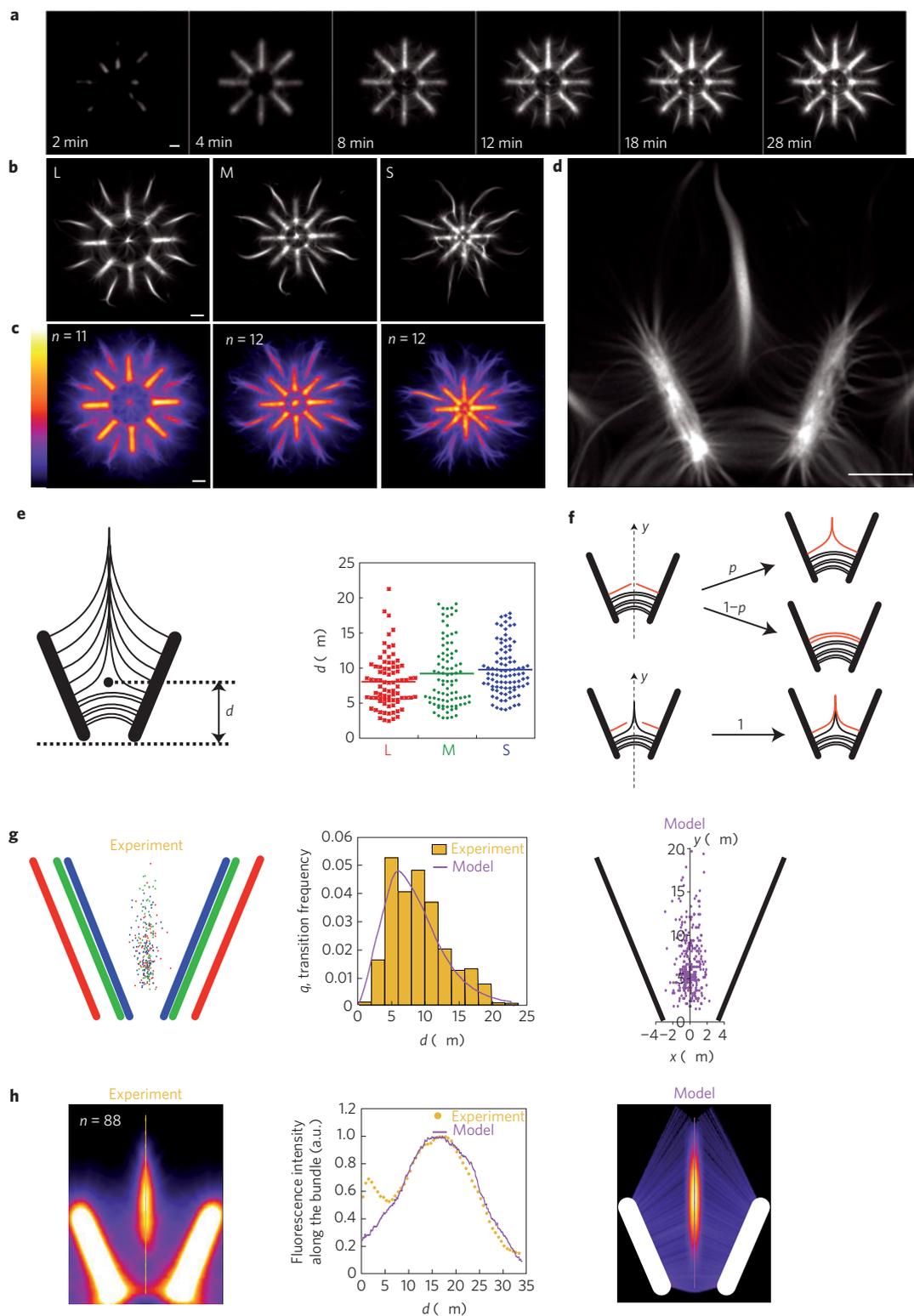


Figure 4 | Intrinsic properties and collective assembly of actin filaments regulate parallel-bundle formation. **a**, Time-lapse acquisition of the nucleation and elongation of actin filaments on an eight-branched radial array. **b**, Fluorescence images of three sizes of the radial array at steady state of actin assembly. **c**, Average fluorescent projections. **d** A zoom of the L-sized radial array of **b**. **e**, The distance d between the bottom of the bar and the position of the transition point did not vary between the three radial array sizes. **f**, Model assumptions: actin filaments' probabilistic compartment depends on their local environment. **g**, Left: combined experimental measures from **e** for the three different radial array sizes. Right: 200 transition-point positions calculated from the probability $Q(y)$ (equation (1)) and a normal variability along the x axis. Middle: comparison of experimental measures of the transition-point position and the model function $Q(y)$ (equation (1)). **h**, Left: average fluorescent projection of each sector of the large radial array. Right: the calculated fluorescent intensity of 10,000 parallel filaments constituting the bundle generated according to the function $Q(y)$. Middle: comparison of fluorescence intensity along the bisecting line on the experimental averaged image (dots) and on the analytical formulation obtained from the model. Scale bars indicate $10\ \mu\text{m}$.

the dense actin network, to which adjacent elongating filaments will systematically converge (see Supplementary Video S4). Interestingly, this propagative coalescence of actin filaments initiated by a precursor, such as the Λ -precursors corresponding to the splayed filopodial roots observed *in vivo*⁶, accounts for the emergence of the parallel bundles from the dense surrounding network in cells. Moreover, this propagative process explains the presence of short actin filaments within bundles²⁵, consistent with the high barbed-end capping activity present at the leading edge of lamellipodia²⁶.

Our innovative methodology has demonstrated that, independently of the mixture of actin-binding proteins, nucleation geometry plays a key role in the determination of the actin-filament network architecture. Respective positioning of adjacent nucleation zones results in the entanglement of actin filaments into networks and the control of their length. Actin-filament orientation determines their ability to interact with neighbours and to form bundles. Fundamentally, basic mechanical and probabilistic laws govern the spatial arrangements of antiparallel and filopodium-like parallel filaments in response to defined geometrical boundary conditions. By extension to living cells, this work emphasizes the importance of the spatial and temporal organization of the nucleation areas, giving rise to specific actin-network architectures and hence controlling the location of force production. Although the spatio-temporal regulation of actin growth is known to influence cell shape^{27,28}, our work has revealed, in quantitative terms, that reciprocally physical boundaries, within or around the cell, control actin cytoskeleton architectures.

Methods

Micropatterning. Glass coverslips were oxidized with oxygen plasma (10 s, 30 W, Harrick Plasma, Ithaca, NY) and incubated with 0.1 mg ml⁻¹ of polylysine-L-g-polyethyleneglycol (JenKem Technology, TX) in HEPES 10 mM at pH 7.4 for 1 h. Pegylated coverslips were placed on a chromium synthetic-quartz photomask (Toppan Photomasks, Corbeil, France) using a home-made vacuum holder. The chromium layer of the photomask contained 3- μ m-wide transparent micropatterns. The mask-covered coverslips were then exposed to deep ultraviolet light ($\lambda < 200$ nm, UVO Cleaner, Jelight Company, Irvine, CA) for 5 min and coated with a solution of the nucleation promoting factor pWA at 0.5 μ M for 15 min.

Actin polymerization. Protein mixtures were diluted in freshly prepared fluorescence buffer containing 10 mM imidazole-HCl (pH 7.8), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 100 mM dithiothreitol, 3 mg ml⁻¹ glucose, 20 μ g ml⁻¹ catalase, 100 mg ml⁻¹ glucose oxidase and 0.5% methylcellulose to induce actin polymerization. Actin polymerization was induced in a solution containing 2 μ M actin monomers (7% labelled with Alexa568) and 6 μ M profilin, and 30 nM Arp2/3 complex.

Image acquisition. Images were taken using an upright BX61 Olympus microscope equipped with a $\times 40$ dry objective (UPLFLN, NA = 0.75), an XY motorized stage (Marzhauser, Germany) and a CoolSnap HQ2 camera (Roper Scientific, Germany). The microscope and devices were driven by MetaMorph (Molecular Devices, Downingtown, PA).

Image treatment. All images were taken using the same light intensity and exposure time. However, before being overlaid and averaged, image grey scales were adjusted to have the same minimum and maximum grey values. The images shown were filtered using the 'unsharp mask' and the 'Gaussian blur' filters from Image J software to highlight filaments from the background.

Received 18 March 2010; accepted 11 August 2010;
published online 19 September 2010

References

- Naumanen, P., Lappalainen, P. & Hotulainen, P. Mechanisms of actin stress fibre assembly. *J. Microsc.* **231**, 446–454 (2008).
- Welch, M. D. & Mullins, R. D. Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **18**, 247–288 (2002).
- Chesarone, M. A., DuPage, A. G. & Goode, B. L. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **11**, 62–74 (2010).
- Hotulainen, P. *et al.* Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *J. Cell. Biol.* **185**, 323–339 (2009).
- Korobova, F. & Svitkina, T. Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol. Biol. Cell.* **21**, 165–176.
- Svitkina, T. M. *et al.* Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J. Cell. Biol.* **160**, 409–421 (2003).
- Vignjevic, D. *et al.* Role of fascin in filopodial protrusion. *J. Cell. Biol.* **174**, 863–875 (2006).
- Loisel, T. P., Boujemaa, R., Pantaloni, D. & Carlier, M. F. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* **401**, 613–616 (1999).
- Theriot, J. A., Mitchison, T. J., Tilney, L. G. & Portnoy, D. A. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature* **357**, 257–260 (1992).
- Welch, M. D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D. A. & Mitchison, T. J. Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* **281**, 105–108 (1998).
- Bernheim-Groswasser, A., Wiesner, S., Golsteyn, R. M., Carlier, M. F. & Sykes, C. The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature* **417**, 308–311 (2002).
- Cameron, L. A., Footer, M. J., van Oudenaarden, A. & Theriot, J. A. Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 4908–4913 (1999).
- Romero, S. *et al.* Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* **119**, 419–429 (2004).
- Liu, A. P. *et al.* Membrane-induced bundling of actin filaments. *Nature Phys.* **4**, 789–793 (2008).
- Achard, V. *et al.* A primer-based mechanism underlies branched actin filament networks formation and motility. *Curr. Biol.* **20**, 423–428 (2010).
- Brieher, W. M., Coughlin, M. & Mitchison, T. J. Fascin-mediated propulsion of *Listeria monocytogenes* independent of frequent nucleation by the Arp2/3 complex. *J. Cell. Biol.* **165**, 233–242 (2004).
- Haviv, L. *et al.* Reconstitution of the transition from lamellipodium to filopodium in a membrane-free system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 4906–4911 (2006).
- Vignjevic, D. *et al.* Formation of filopodia-like bundles *in vitro* from a dendritic network. *J. Cell. Biol.* **160**, 951–962 (2003).
- Mogilner, A. & Rubinstein, B. The physics of filopodial protrusion. *Biophys. J.* **89**, 782–795 (2005).
- Azioune, A., Storch, M., Bornens, M., Thery, M. & Piel, M. Simple and rapid process for single cell micro-patterning. *Lab Chip* **9**, 1640–1642 (2009).
- Blanchoin, L. *et al.* Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* **404**, 1007–1011 (2000).
- Machesky, L. M. *et al.* Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 3739–3744 (1999).
- Mullins, R. D., Heuser, J. A. & Pollard, T. D. The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 6181–6186 (1998).
- Courson, D. S. & Rock, R. S. Actin crosslink assembly and disassembly mechanics for alpha-actinin and fascin. *J. Biol. Chem.* **285**, 26350–26357 (2010).
- Medalia, O. *et al.* Organization of actin networks in intact filopodia. *Curr. Biol.* **17**, 79–84 (2007).
- Iwasa, J. H. & Mullins, R. D. Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. *Curr. Biol.* **17**, 395–406 (2007).
- Parker, K. K. *et al.* Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *Faseb. J.* **16**, 1195–1204 (2002).
- Thery, M., Pepin, A., Dressaire, E., Chen, Y. & Bornens, M. Cell distribution of stress fibres in response to adhesive environment geometry. *Cell. Motil. Cytoskeleton* **63**, 341–355 (2006).

Acknowledgements

We are grateful to C. J. Staiger, J. Plastino and D. Pellman for critical reading of the manuscript and suggestions. This work was supported by grants from Agence National pour la Recherche to L.B. (ANR-06-PCV1-0022 and ANR-08-BLAN-0012) and M.T. (ANR-08-JC-0103 and ANR-PCV08-322457); A-C.R. is supported by an IRTÉLIS fellowship from CEA.

Author contributions

A-C.R. and T.C. carried out the experiments. J-L.M. carried out the physical modelling. L.B., R.B-P. and M.T. directed the project and wrote the manuscript.

Additional information

The authors declare no competing financial interests. Supplementary information accompanies this paper on www.nature.com/naturematerials. Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions>. Correspondence and requests for materials should be addressed to R.B-P. or M.T.

a low-field (~ 10 mT) magnetoelectric effect at room temperature. Specifically, they demonstrate that in this compound a magnetic field induces an electrical polarization. Furthermore, the direction of the induced polarization can be switched through a magnetoelectric annealing procedure, an effect suggesting an unusual non-volatile, low-power memory device.

Note that these materials are not ferroelectric and therefore are not multiferroic. Nor do they display a magnetoelectric effect in the usual sense. A multiferroic phase, however, does play a key role in the observed magnetic-field-induced polarization. The authors suspect that the paraelectric-magnetic room temperature phase is close in energy to a state in which ferroelectricity is induced by a magnetic spin spiral structure, which is common in multiferroic hexaferrites. In the present case, a small magnetic field could drive the system into this multiferroic state, producing a magnetoelectric response. This large magnetoelectric response is therefore better thought of from the perspective of phase competition.

This material is not the first hexaferrite to display such an effect. For example, in 2005 one of the authors was able to apply a large magnetic field (~ 1 T) to the Y hexaferrite $\text{Ba}_{0.5}\text{Sr}_{1.5}\text{Zn}_2\text{Fe}_{12}\text{O}_{22}$ (ref. 7). Unfortunately, owing to electrical leakage a magnetoelectric effect could only be measured below 130 K in $\text{Ba}_{0.5}\text{Sr}_{1.5}\text{Zn}_2\text{Fe}_{12}\text{O}_{22}$ — it was

not sufficiently insulating. Next, Ishiwata and co-workers⁸ chemically tuned the magnetic structure of this Y hexaferrite and discovered that the strength of the magnetic field required to drive the system into the multiferroic phase was two orders of magnitude less in $\text{Ba}_3\text{Mg}_5\text{Fe}_{12}\text{O}_{22}$, for which beautiful neutron studies confirmed the phase competition scenario suggested to explain the magnetoelectric response of these Y and Z hexaferrites⁹. By further exploring the rich structural chemical space of the hexaferrites, the present work has discovered an outstanding material with the desirable combination of small magnetic field and high-temperature operation.

Still, several fundamental and technological challenges exist in the field of magnetoelectrics and multiferroics. One potential drawback of the present work is that the value of the induced polarization may be several orders of magnitude smaller than that required for applications. Furthermore, when it comes to technological applications, electric fields are far easier to route in devices than magnetic fields, and being able to use a voltage, rather than a current, to locally control magnetism will revolutionize the field of low-power magneto-electronic devices. One promising route has been the use of multiferroics in an exchange-bias device^{10,11}. Single-phase multiferroics, in which an electric field can deterministically switch the magnetization by 180° , have

yet to be experimentally demonstrated. That this still holds true after an intense search within the last decade is a statement about the fundamental issues that still confront us.

A dozen years after the resurgence of interest and fervent international activity in multiferroics, key challenges remain: to create a multiferroic with a strong coupling and with sizable moments regardless of temperature, and strategies to realize these effects at room temperature. Kitagawa and colleagues have shown that persistence is not futile. \square

Craig J. Fennie is in the School of Applied & Engineering Physics, Cornell University, Ithaca, New York 14853-3501, USA; Darrell G. Schlom is in the Department of Materials Science and Engineering, Cornell University, Ithaca, New York 14853-1501, USA.
e-mail: fennie@cornell.edu

References

1. Kitagawa, Y. *et al.* *Nature Mater.* **9**, 797–802 (2010).
2. Standley, K. J. *Nature* **178**, 1371–1373 (1956).
3. Wijn, H. P. J. *Nature* **170**, 707–708 (1952).
4. Jonker, G. H., Wijn, H. P. J. & Braun, P. B. *Philips Tech. Rev.* **18**, 145–154 (1956).
5. Braun, P. B. *Philips Res. Rep.* **12**, 491–548 (1957).
6. Kohn, J. A., Eckart, D. W. & Cook, C. F. *Jr Science* **172**, 519–525 (1971).
7. Kimura, T., Lawes, G. & Ramirez, A. P. *Phys. Rev. Lett.* **94**, 137201 (2005).
8. Ishiwata, S., Taguchi, Y., Murakawa, H., Onose, Y. & Tokura, Y. *Science* **319**, 1643–1646 (2008).
9. Ishiwata, S. *et al.* *Phys. Rev. B* **81**, 174418 (2010).
10. Chu, Y.-H. *et al.* *Nature Mater.* **7**, 478–482 (2008).
11. He, X. *et al.* *Nature Mater.* **9**, 579–585 (2010).

PROTEIN FILAMENTS

Bundles from boundaries

Using a micropatterning technique, the architecture of actin networks is revealed to be influenced by the spatial organization of actin filament nucleation. Considering the geometric boundaries within live cells, implications in the realm of actin-induced cell functions are vast.

Denis Wirtz and Shyam B. Khatau

Actin is a highly abundant, globular protein which assembles into dynamic, 8-nm diameter filaments (F-actin) that are nucleated and organized into distinct structures in different parts of the cell (Fig. 1). These different F-actin structures orchestrate a vast range of cellular functions, including cell shape determination, cell motility, cell adhesion and cell differentiation¹. It has long been assumed that to organize actin filaments into these cytoskeletal architectures, the cell requires specific auxiliary proteins,

in particular crosslinking and bundling proteins. In support of this, it is observed that crosslinking and bundling proteins *in vitro* readily organize actin filaments into elastic orthogonal networks and parallel bundles depending on the local concentration of the proteins and their intrinsic molecular architecture. Moreover, the depletion of such proteins induces considerable disorganization of the actin cytoskeleton and cell shape changes.

Using a micropatterning method, Reymann *et al.*² report in *Nature Materials*

that the spatial organization of F-actin nucleating factors can organize actin filaments into arrays very similar to those observed in live cells and reconstituted biomimetic systems³. Importantly, they show that the presence of high concentrations of crosslinking and bundling proteins does not overwhelm this F-actin ordering, suggesting that this process is a dominant regulator of F-actin organization and function in cells.

These exciting results add to a rapidly lengthening list of cellular phenomena

where physics complements chemistry for efficient biological function⁴. The study by Reymann *et al.* suggests that cell shape may spatially organize actin filaments and therefore regulate actin's ubiquitous involvement in cellular functions (Fig. 2). Moreover, because it is well established that actin organization regulates cell shape, these findings imply a bidirectional regulatory loop between cell shape and actin functions.

Central to F-actin's ability to self-organize into arrays is that it is a semi-flexible polymer — its intrinsic bending rigidity is such that its persistence length (17 μm) is similar to its total contour length (5–15 μm)⁵. If actin filaments were highly flexible, they would simply form amorphous disorganized polymer networks⁶. Reymann *et al.* show that changes in the length of actin filaments — and hence, the ratio between contour and persistence length — have marked effects on the spatial organization of actin filaments.

In live cells, actin structures are in close contact with cell membranes and organelles that may spatially organize the nucleation of F-actin (Fig. 1). At the curved cell's leading edge, actin polymerizes into growing dendritic networks that generate large forces that push the plasma membrane and, in turn, mediate cell motility⁷. In the confining space a few micrometres away from the leading edge, actin filaments form orthogonal networks of overlapping filaments intertwined with contractile bundles that are loosely compact. At the dorsal surface of the cell, in close contact with the interphase nucleus, actin filaments organize into highly compact, contractile, parallel bundles that form the perinuclear actin cap. The actin cap is tightly connected to the nuclear lamina, which regulates the shape of the nucleus in healthy cells and is missing in some human diseased cells⁸. In the expanded cytoplasmic region, actin filaments are crosslinked into approximately orthogonal networks that are highly elastic, but not contractile. At the relatively flat basal surface of the cell, actin filaments form discrete, contractile stress fibres containing the motor protein myosin II. One of the possible consequences of Reymann and co-workers' results is that the local shape of cell membranes could affect F-actin organization. Indeed, the disassembly of any of these structures has a significant effect on cellular and nuclear shape. Moreover, because nucleating factors are localized at the cell leading edge and at focal adhesions that terminate stress

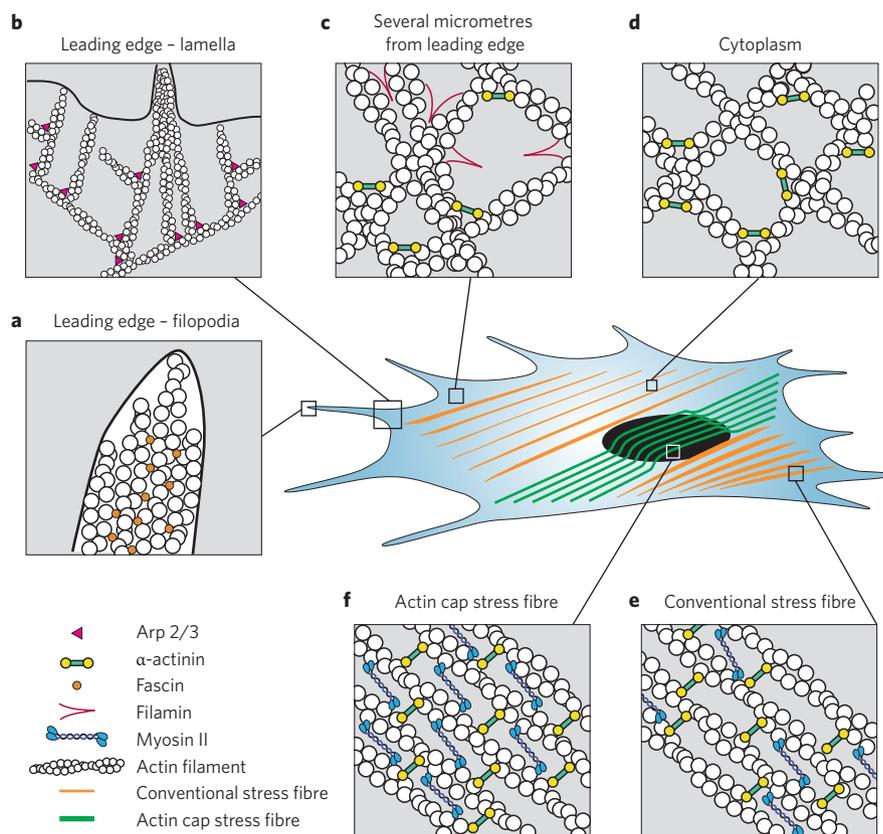


Figure 1 | Actin filaments are organized into highly diverse complex assemblies in different regions of the cell. These different structures are conventionally believed to be induced by specific F-actin crosslinking and bundling proteins. At the leading edge (**a**) filopodial protrusions are supported by parallel actin bundles containing the F-actin bundling protein fascin, whereas in the lamella (**b**) F-actin forms dendritic filament networks containing the F-actin nucleating factor Arp2/3. **c**, A few micrometres from the leading edge, actin forms orthogonal networks of overlapping filaments intertwined with contractile bundles containing crosslinking proteins α -actinin and filamin, and motor protein/bundling protein myosin II. **d**, In the cytoplasm, actin filaments are crosslinked into roughly orthogonal networks that are elastic, but not contractile because they are devoid of myosin II. **e**, At the basal surface of the cell, actin filaments form discrete, contractile stress fibres containing the motor protein myosin II. **f**, At the apical surface of the cell on top of the nucleus, actin filaments organize into highly compact, contractile, parallel bundles that form the perinuclear actin cap.

fibres, these new findings suggest that the diversity of actin structures found in cells could be induced by differences in local spatial organizations of nucleating factors and types of confinement by the cell membrane and the nucleus.

The interplay between conventional biochemical filament crosslinking by proteins and physical bundling by spatial organization of nucleating factors deserves further investigation⁹. Conventional filament crosslinking can largely be explained by the submolecular architecture of the crosslinking proteins and their overall concentration. For example, the F-actin crosslinking proteins filamin and α -actinin, which are enriched in the cytoplasm and near the leading edge, contain two actin-binding sites of low

F-actin affinity and long molecular arms that organize F-actin into orthogonal networks and loose bundles, at low and high concentrations, respectively. The generation of a wide range of actin networks by spatial organization of nucleation suggests that actin filaments can readily organize into a vast menagerie of complex architectures that resemble structures observed *in vivo* through edge and confinement effects alone.

A critical role of F-actin and crosslinking and bundling proteins is to provide mechanical strength to the cell. Different actin structures *in vitro* and *in vivo* containing different proteins display different microrheological properties. For example, computational modelling and reconstituted actin networks

indicate that the combination of compact bundles embedded into crosslinked orthogonal networks forms significantly stiffer structures than structures (with the same number of filaments) containing only bundles or only orthogonally crosslinked filaments. Even actin filament structures that have identical organizations may still react differently under mechanical stress or strain. Without the stabilizing effect of specific bundling proteins, actin bundles formed by the spatial organization of nucleating factors may allow for interfilament sliding within the bundle and, therefore, may display little resistance to shear forces. In contrast, fascin-containing F-actin structures in filopodial bundles bend little under force by preventing interfilament sliding¹⁰. Similarly, low concentrations of crosslinking proteins do not affect actin filament network organization, but by preventing filament sliding, crosslinking can greatly enhance network stiffness at low levels of shear, whereas past a threshold sliding stress, will mediate rapid decrease of network elasticity¹¹. It will be

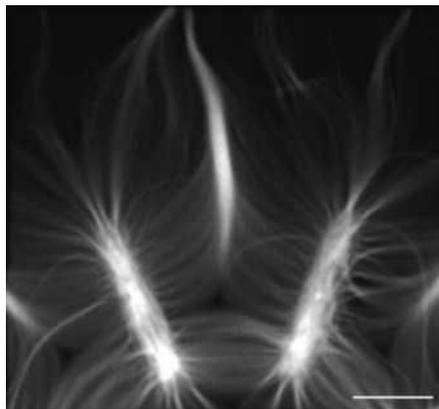


Figure 2 | A fluorescence image showing that actin filaments can organize into a filopodial-like compact bundle by the spatial organization of nucleating factors². Scale bar, 10 μm .

important to establish the relationship between structure and function in the various micropattern-induced actin structures reported by Reymann *et al.*, using microrheology techniques, and

to test whether they display different micromechanical properties in the absence and presence of crosslinking and bundling proteins. □

Denis Wirtz and Shyam B. Khatau are in the Department of Chemical and Biomolecular Engineering and the Johns Hopkins Physical Sciences in Oncology Center, Johns Hopkins University, 3400 North Charles Street, Baltimore, Maryland 21218, USA.
e-mail: wirtz@jhu.edu and shyam@jhu.edu

References

1. Pollard, T. D. & Borisy, G. G. *Cell* **112**, 453–465 (2003).
2. Reymann, A.-C. *et al. Nature Mater.* **9**, 827–832 (2010).
3. Liu, A. P. & Fletcher, D. A. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **10**, 644–650 (2009).
4. Sun, S. X., Walcott, S. & Wolgemuth, C. W. *Curr. Biol.* **20**, R649–R654 (2010).
5. Kas, J. *et al. Biophys. J.* **70**, 609–625 (1996).
6. de Gennes, P.-G. *Scaling Concepts in Polymer Physics* (Cornell Univ. Press, 1991).
7. Blanchoin, L. *et al. Nature* **404**, 1007–1011 (2000).
8. Khatau, S. B. *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 19017–19022 (2009).
9. Liu, A. P. *et al. Nature Phys.* **4**, 789–793 (2008).
10. Vignjevic, D. *et al. J. Cell Biol.* **160**, 951–962 (2003).
11. Xu, J., Tseng, Y. & Wirtz, D. *J. Biol. Chem.* **275**, 35886–35892 (2000).

FLEXIBLE ELECTRONICS

Within touch of artificial skin

Flexible arrays of transducers can now be fabricated with pressure sensitivity and response times approaching those of natural human skin.

John J. Boland

As humans, we interact with our immediate environment through our senses — sight, sound, smell, taste and touch. Emulation of the senses by electronic means has long been a grand challenge of artificial intelligence and is pivotal in the development of accessible and natural interfaces between man and machine. Sight and sound are the simplest technologically, and the past decades have seen significant developments in image acquisition and processing technologies, in addition to voice synthesis and recognition. From an electronic standpoint, smell and taste are one and the same, but despite significant advances in electronic nose¹ and chemical sensor² technologies, the sensitivity and discrimination levels of these engineered systems fall short of the performance of their human counterparts.

Touch also remains stubbornly difficult to mimic. The difficulty is not simply to

identify transduction mechanisms that can detect mechanical resistance or static mass loads; touch emulation necessitates the development of high spatial-resolution, pressure-sensitive artificial skins capable of discriminating between local stimuli on a textured surface. For example, by applying a pressure of 10 kPa over a 1 cm² contact area, the human touch can typically detect local roughness variations with a spatial resolution of 50 μm . Coupled with the fact that the softest touch corresponds to a mass-loading sensitivity of better than 0.1 g per mm² (or about 1 kPa), this highlights the very real challenge of developing touch technology that can compete with the performance in humans.

As now reported in *Nature Materials*, separate research groups have addressed this problem in two distinct ways^{3,4}. Both employ an active matrix array of transducers using flexible materials. Flexibility is desirable because it enables

the fabrication of transducer arrays that can conform to curved surfaces, which is essential if these engineered materials are to serve as artificial skins for prosthetic devices or in applications where a high degree of spatial resolution is required. Where the groups differ is in their approach to the transduction mechanism and the types of substrate used. Ali Javey and co-workers³ used Ge/Si-nanowire-array field-effect transistors (FETs) laminated on a flexible polyimide substrate with a pressure-sensitive rubber layer that acts as a tunable resistor in series with the nanowire FET (Fig. 1). On the other hand, Zhenan Bao and collaborators⁴ microstructured polydimethylsiloxane (PDMS) films to produce pressure-sensitive capacitor arrays that are integrated into the gate dielectrics of an organic FET array (Fig. 2). Both report pressure sensors with response times of less than 100 ms and a dynamic range of 0.5–20 kPa or

Article 2

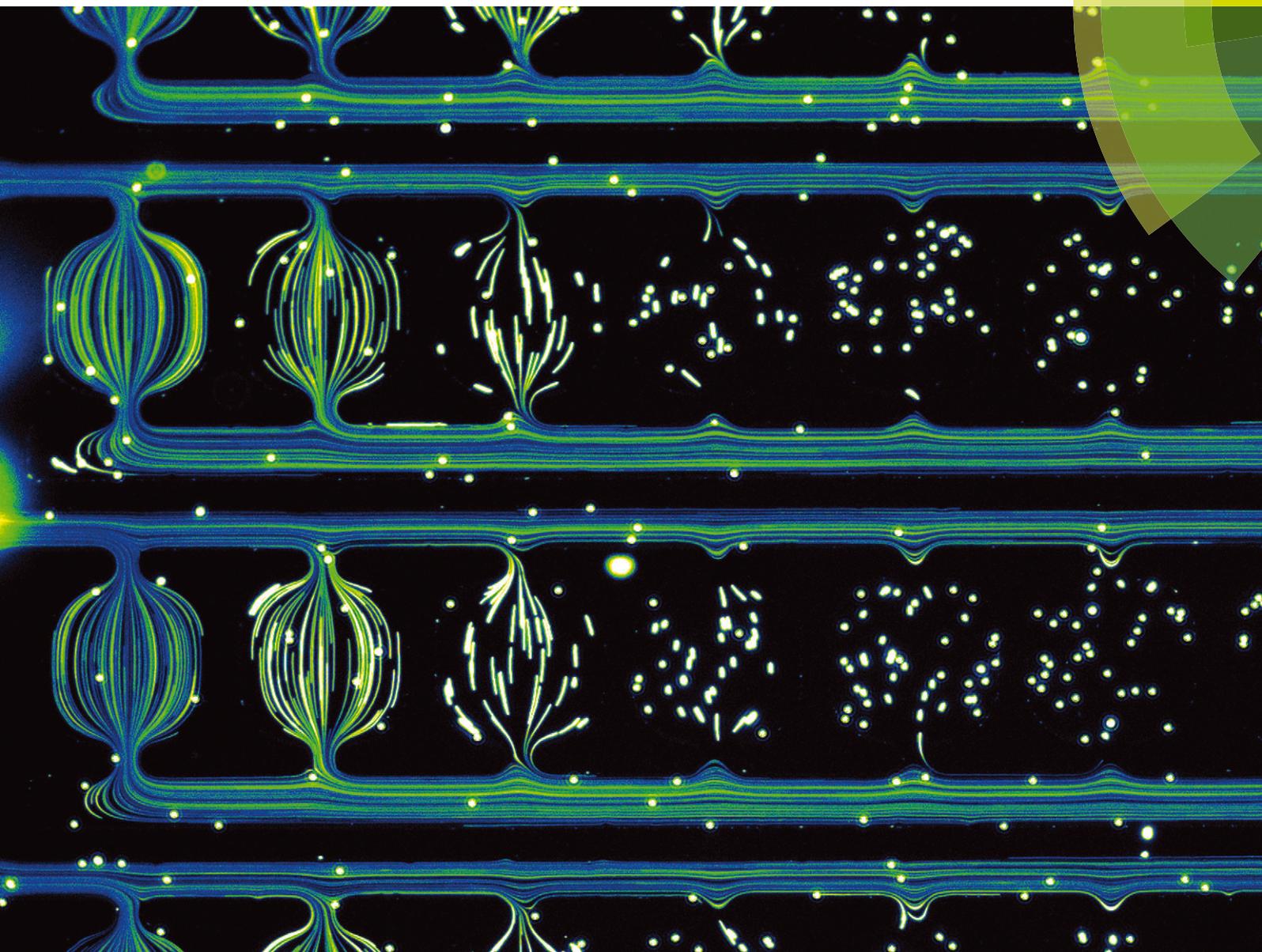
Design of a 2D no-flow chamber to monitor hematopoietic stem cells.

Cambier T., Honegger T., Vanneaux V., Berthier J., Peyrade D., Blanchoin L., Larghero J., They M.
Lab Chip, 2015.

Lab on a Chip

Miniaturisation for chemistry, physics, biology, materials science and bioengineering

www.rsc.org/loc



ISSN 1473-0197



PAPER

Manuel Théry *et al.*

Design of a 2D no-flow chamber to monitor hematopoietic stem cells


 Cite this: *Lab Chip*, 2015, 15, 77

Design of a 2D no-flow chamber to monitor hematopoietic stem cells†

 Théo Cambier,^a Thibault Honegger,^b Valérie Vanneau,^c Jean Berthier,^d
David Peyrade,^b Laurent Blanchoin,^a Jerome Larghero^c and Manuel Théry^{*ac}

Hematopoietic stem cells (HSCs) are the most commonly used cell type in cell-based therapy. However, the investigation of their behavior *in vitro* has been limited by the difficulty of monitoring these non-adherent cells under classical culture conditions. Indeed, fluid flow moves cells away from the video-recording position and prevents single cell tracking over long periods of time. Here we describe a large array of 2D no-flow chambers allowing the monitoring of single HSCs for several days. The chamber design has been optimized to facilitate manufacturing and routine use. The chip contains a single inlet and 800 chambers. The chamber medium can be renewed by diffusion within a few minutes. This allowed us to stain live human HSCs with fluorescent primary antibodies in order to reveal their stage in the hematopoiesis differentiation pathway. Thus we were able to correlate human HSCs' growth rate, polarization and migration to their differentiation stage.

 Received 10th July 2014,
Accepted 18th September 2014

DOI: 10.1039/c4lc00807c

www.rsc.org/loc

Introduction

Blood, milk, lymph, urine, sweat and mucus are some of the body fluids that run through our organs and tissues. Fluid flow is intimately coupled with cell function and organ physiology. Cells produce, sense and respond to fluid flow in various ways. Fluid flow generates shear stress on adherent cells, such as epithelial or endothelial cells, which tend to align their shape and polarity with respect to the flow.¹ Shear stress also regulates cell size,² cell proliferation and differentiation³ and thus tissue patterning⁴ and morphogenesis.⁵ In contrast, most cells of the lymphoid and myeloid lineages are less adhesive and thus much less resistant to high fluid-flow-induced shear stress. They are transported along the blood flow and home in to flow-protected regions in adjacent tissues. Shear stress modulates leukocyte adhesion, architecture and migration properties.⁶ This sensitivity to fluid flow is a matter of concern under classical cell culture conditions

where temperature-induced convection permanently displaces cells. These movements prevent long-term monitoring of their behavior by video microscopy. In addition, they are also likely to have consequences on hematopoietic stem cell (HSC) differentiation since shear stress and mechanical forces in general are major regulators of the stem cells' fate.^{7–9} Analysis and control of the HSC's fate is of paramount importance since HSCs are currently the most commonly used cell type for stem cell-based therapy.^{10,11} HSCs have been used clinically since 1959 and their use is now established as a standard therapeutic modality for a variety of malignant and non-malignant diseases.¹² Our incapacity to protect HSCs from fluid flow and monitor single cell behavior as they are submitted to biochemical signals is a serious matter of concern. While numerous microfluidic devices have been designed to control the flow speed and shear stress applied on adherent cells,¹³ much less attempts have been made to completely stop the flow in order to monitor and analyze HSCs in their unbiased state.

Multilayered chips with fluidic valves have been used to start/stop the flow and isolate reaction chambers.¹⁴ HSCs have also been protected from fluid flow in the bottom of deep microwells. Multilayered chips were used to start/stop the flow above the wells, load the HSCs and test the influence of several combinations of soluble factors in parallel.¹⁵ Multilayered chips have also been used to supply cells with soluble factors through a porous membrane protecting the cells from convection flow.¹⁶ The same concept was applied to single-layer chips in which the supply channels were connected to a reaction chamber *via* several thin channels in which the flow

^a Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Institut de Recherche en Technologie et Science pour le Vivant, UMR5168, CEA, INRA, CNRS, Université Grenoble-Alpes, Grenoble, France. E-mail: manuel.thery@cea.fr

^b Laboratoire des Technologies de la Microélectronique, CNRS, CEA, Université Grenoble-Alpes, Grenoble, France

^c Unité de Thérapie Cellulaire et Centre d'Investigation Clinique en Biothérapies, Hôpital Saint Louis, Institut Universitaire d'Hématologie, UMR5160, INSERM, AP-HP, Université Paris Diderot, Paris, France

^d Laboratoire d'Électronique et de Technologie de l'Information, CEA, Université Grenoble-Alpes, Grenoble, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c4lc00807c

was very low.¹⁷ Simpler devices made of a single layer of channels of equal height were also tested. As an alternative to thin channels, alignments of pillars were used to separate the supply channels from the reaction channel and limit the flow between them.^{18,19} In some other devices, the flow was prevented by using dead-end channels as reaction chambers.^{20,21} All of these devices have pros and cons. To be usable on a routine basis in biology, the device has to be easy and fast to manufacture. It also has to be robust and should allow the visualization of numerous chambers in parallel. Here we describe a 2D chip with a single inlet and 800 no-flow chambers per square centimeter.

Materials and methods

No-flow chamber manufacturing

The thick positive resist AZ9260 (AZ Electronic Materials) was spin-coated on a 4 inch silicon wafer at 750 rpm for 60 s to obtain a 20 micron thick layer. It was pre-baked on a hot plate for 1 min at 60 °C and then for 4 min at 110 °C. It was exposed to UV through a photomask (Toppan) bearing the features of interest for 50 s (35 mW mm⁻² at 405 nm and 16 mW mm⁻² at 365 nm) on a mask aligner (MJB4, SUSS MicroTec), developed in AZ400K (1:4 dilution in water) (AZ Electronic Materials) for 60 s and washed with deionized water. The developed resist was finally dried in air.

Polydimethylsiloxane (PDMS) (Sylgard 184 kit, Dow Corning) was mixed with the curing agent (10:1 ratio), degassed, poured onto the mold and cured for 10 minutes at 100 °C on a hot plate. The PDMS layer was then peeled off and stored away from the dust. The PDMS chip and a standard glass slide (76 mm × 26 mm borosilicate) were oxidized in an oxygen plasma cleaner for 10 s at 100 W (Femto, Diener Electronic) and brought into contact to ensure bonding and prevent fluidic leakage. Prior to bonding, the PDMS chip was punched using a hole puncher (Ted Pella) with an outer diameter smaller than 1/16'.

Medium was injected into the single device inlet with a pipette. Then, without applying additional external pressure, medium filled in the whole microfluidic circuitry.

HSC isolation and culture

Human umbilical cord blood samples were collected from normal full-term deliveries after maternal informed consent according to approved institutional guidelines (Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France). CD34+ cells were isolated using the direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) and cryopreserved in SVF (Hyclone)/10% DMSO (B Braun). After thawing, cells were resuspended in the culture medium HPO1 (Macopharma, France) supplemented with growth factors 100 ng μL⁻¹ SCF, 10 ng μL⁻¹ G-CSF, 20 ng μL⁻¹ TPO, and 100 ng μL⁻¹ FLT3I (PeproTech) just before being injected into the microfluidic device at a density of 10⁶ cells mL⁻¹.

CD34+ cells were stained by addition of PE-CD33, APC-CD34 and FITC-CD38 monoclonal antibodies (Becton Dickinson).

Image acquisition

Images were taken using an ECLIPSE Ti (Nikon) equipped with a confocal scanner unit (CSU-X1, Yokogawa), a 4-wavelength LED excitation device (CoolLED pE-2 collimator, Life Sciences and Analytical), and a CoolSNAP HQ2 camera (Photometrics). The microscope was controlled using MetaMorph software (Molecular Devices).

When it contained cells, the chip was maintained on the microscope on a heating stage and humidified chamber at 37 °C supplied with 5% CO₂ for pH buffering (Live Cell Instrument).

COMSOL simulations

Simulations of the fluid flow were performed by the finite element method using COMSOL Multiphysics (COMSOL). Each design was modeled in a 2D plane. A planar laminar flow was setup under the same input and output boundary flow conditions. A time-lapse diffusion model was monitored until full replacement of media in the chambers and asymmetric connecting microchannels.

Results

No-flow chamber design

We refer here to a no-flow chamber as a confined space in which fluid flow is absent or comparable to thermal agitation (Fig. 1A). Our aim was to design such a chamber in 2D with a minimum number of inlets/outlets to facilitate chamber manufacturing and use. We defined few key criteria for the design of the chamber. The no-flow chamber should contain one or several side channels for the supply of new solutes. Pressures should be balanced in order to restrict fluid flow to these side channels (Fig. 1B). The size of the openings between the side channels and the chamber should protect the chamber from fluid entry. However, these openings should allow solute diffusion from the side channels to the chamber. Finally, the chamber size should allow fluid renewal by diffusion within a few minutes (Fig. 1C).

Compartmentalized microenvironments protected from fluid flow by linear arrays of micropillars have been designed to confine multicellular clusters of adherent cells.¹⁸ The underlying concept is brilliant and has proved to be quite efficient to confine these cell groups.¹⁹ Numerical simulations revealed that in such a device a residual flow would persist and affect loosely adherent cells such as HSCs (Fig. S1A†). Physical barriers perpendicular to this residual flow in the chambers should reduce it (Fig. S1B†). Reducing the number of openings between the side channels and the main chamber should also reduce internal flow. Eventually, square chambers with two side openings, as shown in Fig. 1A, appeared optimal (Fig. S1D†).

A single opening should even be more efficient than two openings to protect the chamber from fluid entry. Dead-end chambers with a single opening have been proven to be efficient in confining cells.^{20–22} However, they require the use of vacuum and porous materials to remove the trapped air bubbles in the chambers and suck the cells inside.

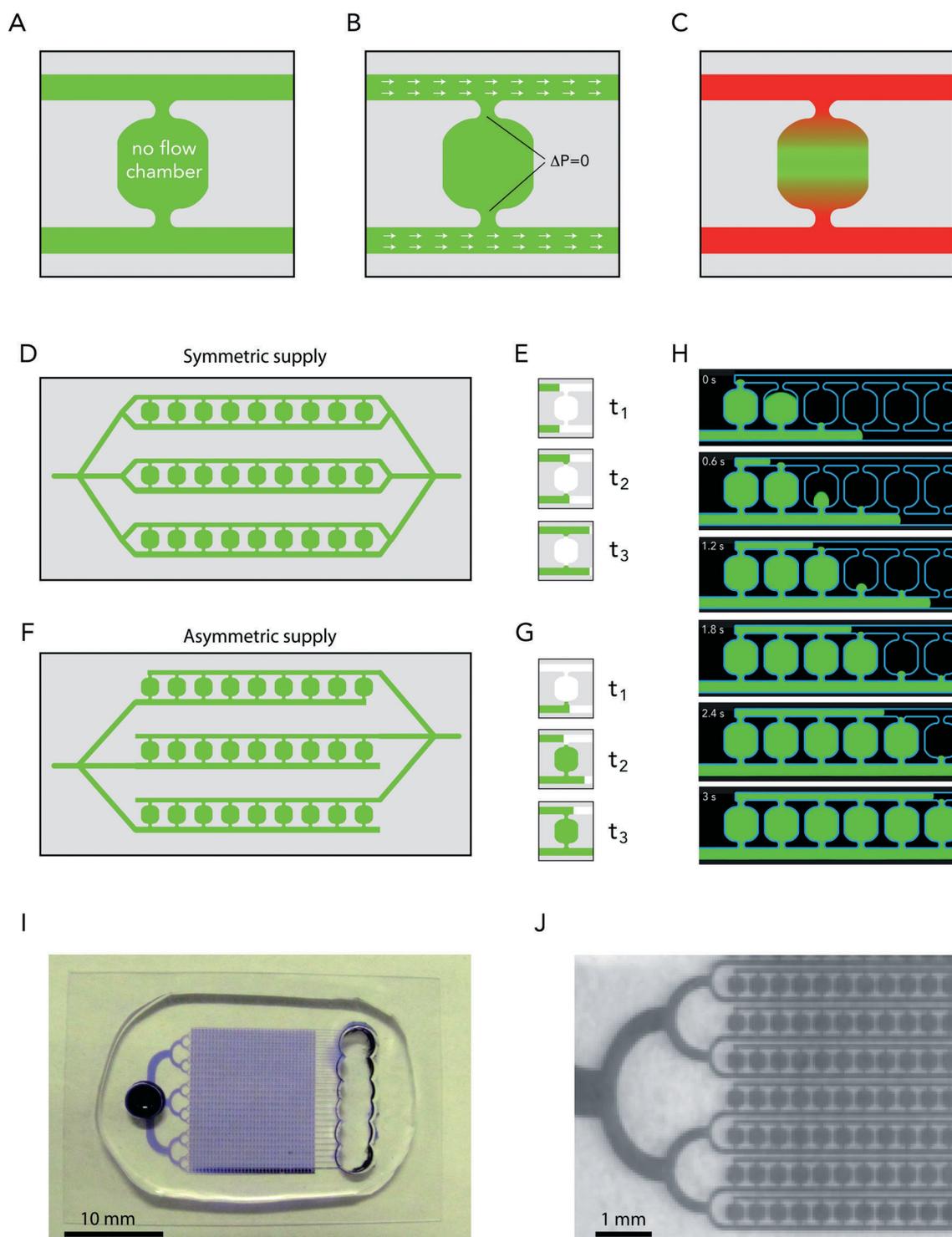


Fig. 1 No-flow chamber design. (A) Design principle showing the central chamber and the side channels allowing medium supply. (B) Illustration of the pressure balance condition required for protecting the central chamber from the flow in the side channels (shown as white arrows). (C) Illustration of medium renewal based on solute diffusion through chamber openings. (D) Array of no-flow chambers supplied with symmetric side channels. (E) Illustration of no-flow chamber filling from symmetric side channels. The liquid is shown in green, the air is in white. Air is trapped in the chamber. (F) Array of no-flow chambers supplied with asymmetric side channels. (G) Illustration of no-flow chamber filling from asymmetric side channels. The liquid is shown in green, the air is in white. The delay between the liquid progressions in the two channels prevents air trapping in the chamber. (H) Video recording of chamber filling with water containing Alexa-488 fluorophore as a marker (shown in green). Blue lines highlight the channel shapes. Time is in seconds. (I) Picture of the PDMS chip. (J) Zoomed picture of the PDMS chip.

Actually, trapped air bubbles constitute the most critical problem in no-flow devices, since they tend to form particularly in regions of interest where the flow is reduced. Intuitive symmetric designs, in which no-flow chambers are flanked with two side channels (Fig. 1D), induce the trapping of air bubbles in most chambers. Indeed, the synchrony of fluid filling in the two symmetric side channels immediately balances the pressure between the two openings and stops liquid flow in the central chamber, leading to air bubble trapping, as illustrated in the sequence described in Fig. 1E. We designed asymmetric supply channels to circumvent this problem (Fig. 1F). With asymmetric supply channels, fluid arrival close to the upper opening can be delayed so that the fluid fills the chamber from the bottom opening (Fig. 1G). The most straightforward way to ensure that the delay corresponds exactly to the time it takes to fill a chamber is to add one chamber as a delay line to the upper supply channel (Fig. 1F). In the time sequence shown in Fig. 1H, fluorescently

labeled proteins were used to show the filling of no-flow chambers with the asymmetric supply design (Movie S1†). Almost no bubbles were trapped with these asymmetric side channels. We also found that rounded chambers, rather than square chambers with right angles, improved chamber filling without trapping air bubbles (Fig. S2†).

The dimensions of the optimal chamber design are shown in Fig. S3A.† Importantly, our design offers the possibility to align chambers in series and to load many of those lines in parallel with a single inlet. We could thus design a 1 cm² chip with a single inlet distributing the fluid to 800 chambers (Fig. 1I, J and S3B†).

No-flow chamber test

The fluid flow in no-flow chambers was first estimated with numerical simulations. Fluid flow was present in the first three and the last three chambers of the line because of

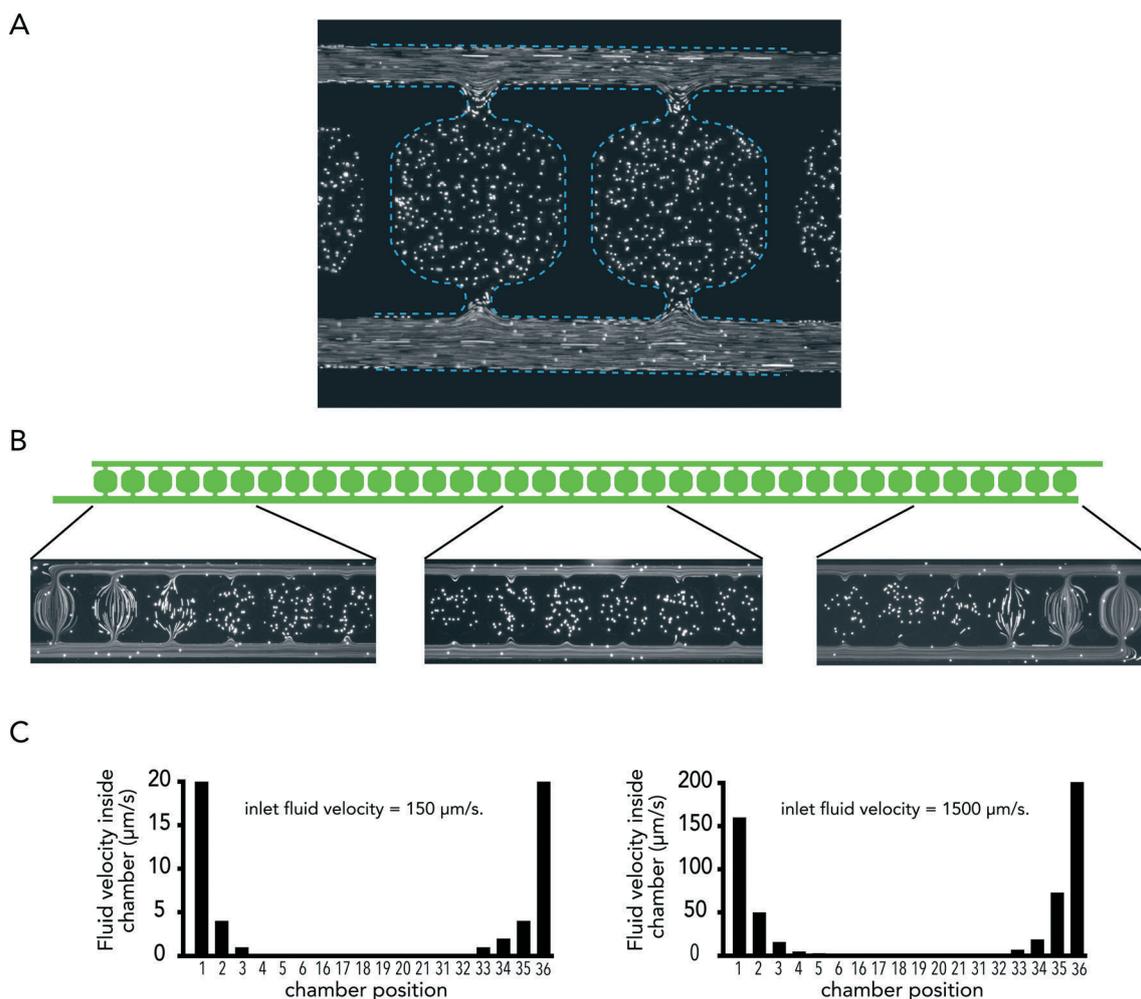


Fig. 2 Flow measurement in the no-flow chambers. (A) One-micron polystyrene beads were used as fiducial markers to reveal fluid flow. Images were taken with 200 ms exposure time (see Movie S2†) to record bead trajectories. The displayed image is the overlay of 10 images taken with a 500 ms time interval in order to reveal the field lines. The beads do not enter the no-flow chambers. (B) Bead motion movies were recorded at various positions in the chip, at the entry (left), in the middle (center) and at the exit (right) of the microchannels, and used to record bead velocities in the chambers. (C) Bead velocities were measured in all chambers along the microchannels for two inlet fluid velocities: 150 μm s⁻¹ (left) and 1500 μm s⁻¹ (right). Data showed that flow was null in the 30 central chambers.

the asymmetric supply but was almost absent from the 30 chambers in between (Fig. S4A, B†). In those chambers, the simulated flow in the supply channels barely entered the chambers (Fig. S4C†). This was further confirmed experimentally by looking at the motion of the fluorescent beads (Fig. 2A, Movie S2†). Long exposure during image acquisition revealed local bead displacements. Time-lapse acquisitions of such images revealed bead trajectories. Beads appeared almost immobile in the no-flow chambers, whereas they were rapidly transported in the supply channels (Fig. 2A). Measurements of bead displacement within chambers depending on their position along the supply channels confirmed that the 30 chambers at the center displayed no fluid flow even when the flow in the supply channel reached $1500 \mu\text{m s}^{-1}$ (Fig. 2B, C).

The possibility of renewing the medium in no-flow chambers was tested by switching the inlet from green to red fluorophores (Fig. 3A, Movie S3†). Since the new fluid could not flow through the chambers, the renewal was entirely supported by diffusion. We measured the green and the red fluorescence signals in the chamber (position A in Fig. 3B) and in the supply side channels (position B). The chamber content appeared completely renewed 7 minutes after the fluid switch. Larger chambers would have allowed larger observation fields but would have made this renewal time much longer.

HSC loading and monitoring

In order to test the design of the chamber which was optimized for fluid filling, flow blocking and medium renewal, we introduced living cells in the no-flow chambers. As a first test, we used the Jurkat cell line, which are easy-to-use non-adherent human T lymphocytes. They could survive and proliferate in the no-flow chambers for several days. We then switched to human HSCs. Cells were collected from human umbilical cord blood, sorted based on the expression of CD34 (ref. 23) and immediately frozen in liquid nitrogen. CD34 is a cell surface glycoprotein from the family of sialomucins that is commonly used as a marker of stemness during hematopoiesis.²⁴

HSCs were thawed, resuspended in the growth medium and loaded in no-flow chambers during initial chip filling. Cell density was adapted to obtain 1 to 10 cells per chamber (Fig. 4A). The cell culture medium in side channels was renewed every 6 hours. Cell growth and movements were monitored by phase contrast microscopy over several days using multiposition time-lapse acquisitions (Fig. 4B, Movie S4†). It appeared that HSC growth rates were highly variable: some cells divided up to six times in three days, whereas others remained quiescent. To gain further insights into the link between this variability and cell profile diversity, we took advantage of the key feature of our new device which is to

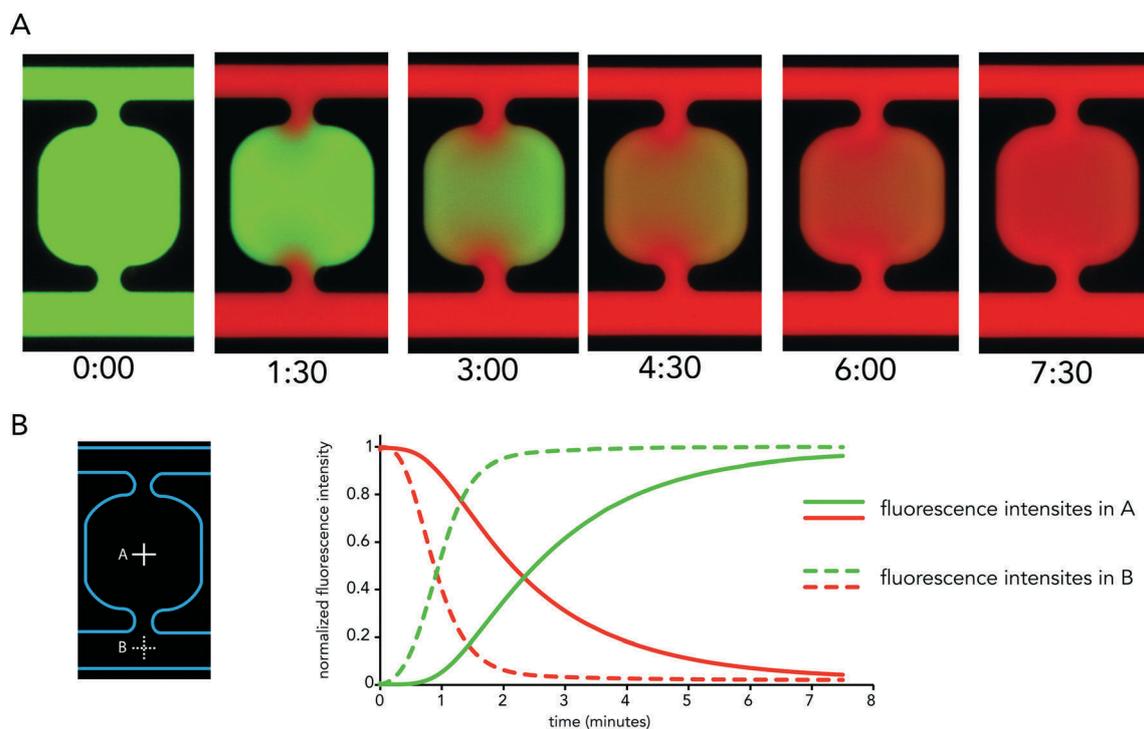


Fig. 3 Medium renewal. (A) The chip was filled with $1 \mu\text{M}$ Alexa-488 (green fluorescence emission) in water. The inlet was then switched to $1 \mu\text{M}$ Alexa-568 (red fluorescence emission) in water. Green and red fluorescence in the chambers were video-recorded. Time is indicated in min:s. (B) Green and red fluorescence emission signals were measured in the no-flow chamber (position A) and in the side channel (position B). Intensity values were normalized to the initial and final values for green and red, respectively. Dashed lines show the fluorescence in the side channel. Full lines show the fluorescence in the no-flow chambers. It took about 7 minutes after inlet switch to renew completely the medium in the chambers.

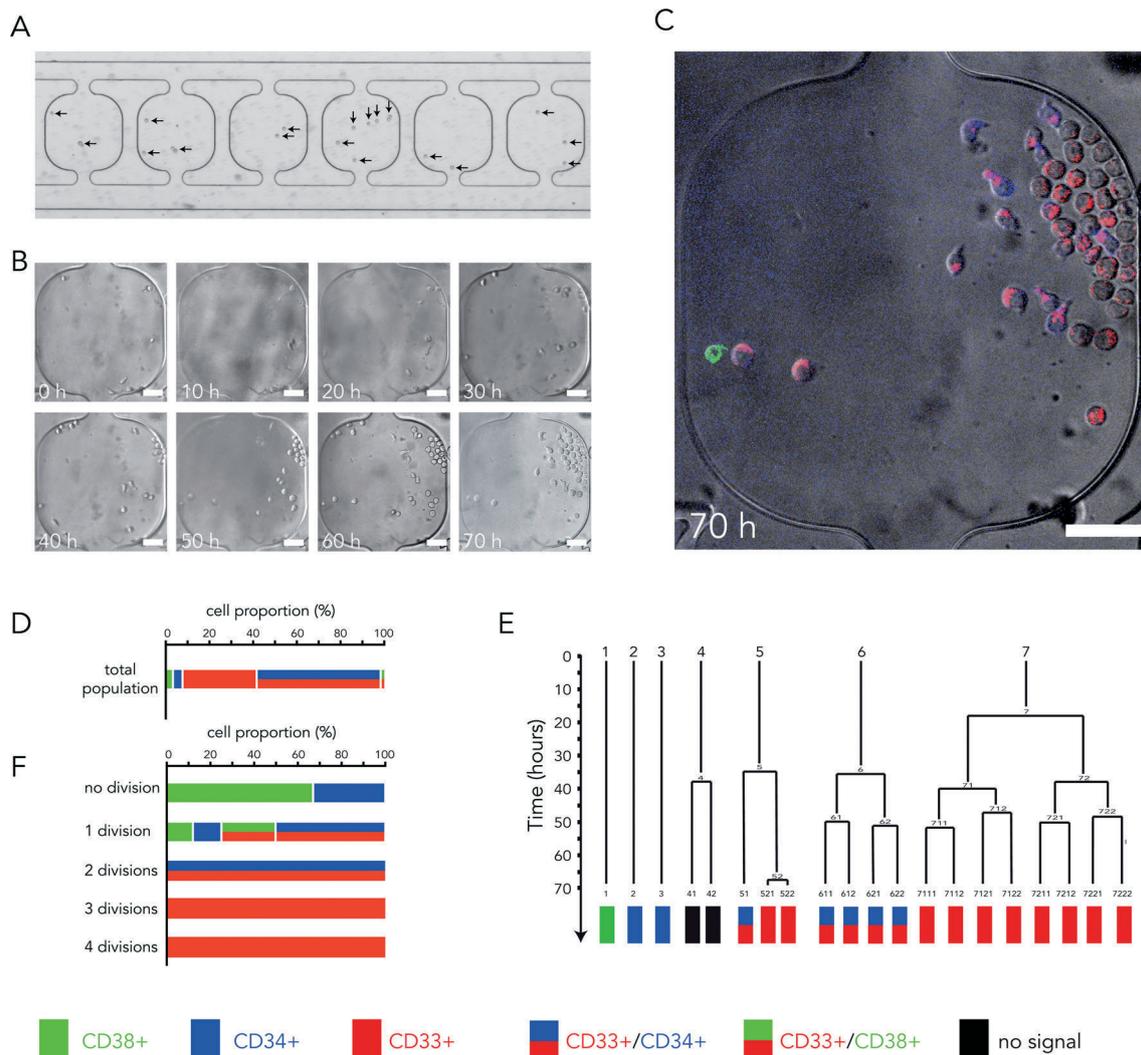


Fig. 4 HSC growth in no-flow chambers. (A) Observation of HSCs (arrows) under transmitted light after no-flow chamber filling. (B) Video recording of HSCs in a no-flow chamber under transmitted light. Time is in hours. Scale bar is 50 μ m. (C) Live HSC staining with fluorescent primary antibodies against CD38 (green), CD34 (blue) and CD33 (red) at the end of the video recording. Antibodies were added to the culture medium in the side channels. Scale bar is 50 μ m. (D) Quantification of the proportion of cells expressing the various makers after 3 days of culture in no-flow chambers. Color code is shown at the bottom. $N = 257$ cells, $n = 17$ chambers. (E) Example of a lineage tree obtained after visual tracking of HSCs in the no-flow chambers. Bottom line shows cell staining at the end of the movie. Color code is shown at the bottom. (F) Quantification of the surface receptor expression profiles depending on the number of cell division during three days of observation. $N = 257$ cells, $n = 17$ chambers.

change the cell culture medium without detaching non-adherent cells and introduced fluorescently labeled antibodies at the end of the acquisition (Fig. 4C). These antibodies targeted various surface receptors known to reveal the cell differentiation state. CD38 and CD34 were used as markers of non-differentiated cells,²⁴ whereas CD33 was used as a marker of early engagement in the myeloid lineage.²⁵

Three days after cell collection and loading in the no-flow chambers, most cells had started to express CD33, few cells were CD38 positive and only 60% were still expressing the stemness marker CD34. Thus the entire population appeared quite heterogeneous (Fig. 4D). Several hypotheses could account for this diversity. It could be the consequence of asymmetric HSC divisions, leading to daughter cells with distinct protein expression profiles. It could also be due to

differences in the proliferation rates of distinct sub-populations. Clues could be obtained by tracking individual cells and reconstituting cell lineage trees (Fig. 4E). Although some asymmetric divisions were observed (cell #5 in Fig. 4E for example), leading to daughter cells with distinct expression profiles, they were quite rare and most of the clones displayed identical surface markers. This favored the differential growth rate hypothesis. To further test it, we counted the number of division the cells went through for all combinations of surface markers. Cells that were still expressing CD38 after three days did not divide or divided only once. Cells expressing CD34 went up to two rounds of division. In contrast, cells expressing CD33 had divided two to four times (Fig. 4F). These data accounted for the massive presence of CD33 cells after three days and suggested that population

heterogeneity was mainly due to differences in cell proliferation capacities.

Cell monitoring revealed that most HSCs acquired elongated and polarized leukocyte-like shapes soon after being loaded in the chip.^{26,27} These cells developed dynamic membrane protrusions at their leading edge and displayed slow amoeboid-like migration throughout the no-flow chamber (Movie S4†). In contrast, static cells remained round. Here we also took advantage of the possibility of associating cell monitoring with fluorescence immunostaining to reveal the protein expression profiles of static and migrating cells. Three days after cell loading, the profiles of the static cells were heterogeneous: 60% were CD33+ and 30% were CD33+/CD34+ (Fig. 5A). Strikingly, 95% of migrating cells were CD33+/CD34+ (Fig. 5A). Thus the co-expression of CD34 and CD33 did not seem to be specific to but characteristic of all moving cells. To further understand the relationship between the CD33/CD34 co-expression and the acquisition of cell motility, we looked at receptor localization at the cell surface. In static cells, we could observe several patches of CD33, whereas in moving cells CD33 receptors were clustered at the cell rear in the uropod (Fig. 5B). These observations were further quantified by the measurement of the cell shape factor and surface marker distribution. Migrating cells appeared much more elongated than static cells (Fig. 5C). Surface

marker polarization was quantified by measuring the position of the center of mass of the fluorescence signal with respect to the cell center. CD34 appeared evenly distributed in both static cells and migrating cells, whereas CD33 was strongly polarized toward the rear of migrating cells (Fig. 5C). Backward polarization of CD33 in the uropod appeared as a specific signature of migrating CD34+ HSCs.

Discussion

Here we described the design and use of a new no-flow chamber. Sophisticated microfluidic 3D chambers with several layers of channels and valves were used to screen multiple compounds on a chip.¹⁵ The goal here was simply to protect the biological sample from fluid flow in a large array of chambers. The chamber shape and chip circuitry have been designed for routine use in biology. The aim was to minimize the manufacturing difficulties and to make the chip robust and easy-to-use. The outcome of our work is a single-layer 2D chip with a single inlet and 800 chambers per cm² (the complete chip is shown in Fig. S3†). The circuitry has been optimized to allow the fluid loading without formation of air bubbles. Since vacuum is not required to eliminate air bubbles, the chip can be produced in plastic or glass as an alternative to PDMS. Finally, the chamber shape and size allow

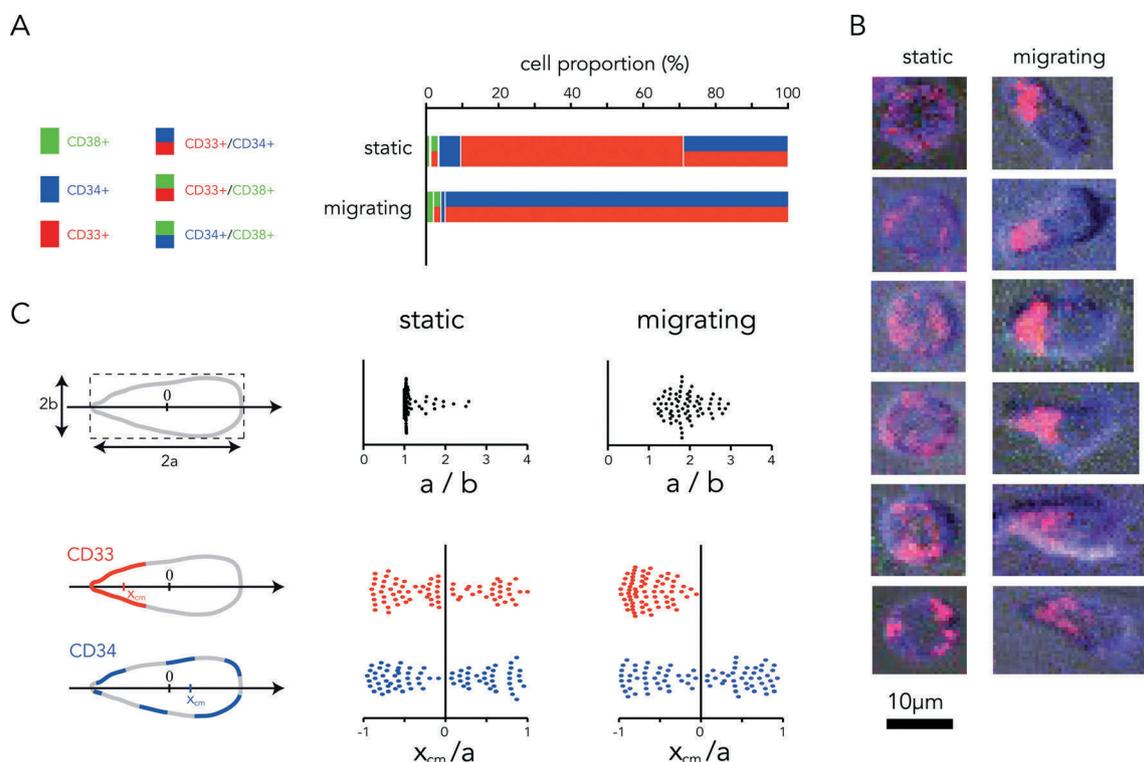


Fig. 5 HSC polarization. (A) Quantification of the surface receptor expression profiles in static and migrating cells. $N = 257$ cells, $n = 17$ chambers. (B) Images showing the spatial distribution of CD34 (blue) and CD33 (red) at the surface of static and migrating HSCs after three days of culture in no flow-chambers. (C) Measurement of cell aspect ratios (top line) and localization of surface markers (bottom line) in static and migrating HSCs. The cell aspect ratio was measured by fitting the cell shape with an ellipse and quantifying the ratio of the short and long axes. Migrating cells appeared more elongated. Surface marker localization was quantified by measuring the coordinate of the center of mass of the fluorescence signal along the long cell axis (x_{cm}) and normalizing it to the length of this axis. CD33 appeared systematically polarized in the rear of migrating HSCs.

rapid medium exchange by diffusion. This last feature is particularly useful since it is almost impossible to change the fluid on top of flow-sensitive biological samples under classical experimental conditions.

No-flow chambers are suited for biological systems that are sensitive to or could be damaged by fluid flow. For example, several biochemical assays are based on the detection of a specific protein or DNA strand in a sample due to its interaction with a surface-bound probe. These assays can be limited by the affinity between the probe and the ligand, particularly during the washing steps. Reducing fluid shear stress in no-flow chambers could improve the sensitivity of these assays. Another example relates to the cell types, such as endothelial or epithelial cells, which can be oriented in space or physiologically modified by fluid shear stress.¹³ No flow chambers could be used to prevent such stress and get rid of this bias. Here we took advantage of the absence of flow to monitor HSCs, which are loosely adherent cells and therefore often displaced by fluid convection under classical cell culture conditions.

As HSCs were used to validate the suitability of no-flow chambers for monitoring their behavior, we made two interesting observations that may have important implications in our understanding of stem cell physiology. First, the early rise in population heterogeneity seemed to involve mainly the differences in the proliferation rates of various cell types. Second, HSC migration appeared to be coupled with cell shape polarization and rear clustering of CD33 receptors. These two observations fully validated the relevance of the no-flow chambers for the study of HSC physiology and opened new questions that remained to be investigated.

Human primary HSCs were initially purified from umbilical cord blood samples by immunosorting based on the expression of CD34 according to the classical method that is commonly used in therapy protocols. The yield is known to be quite high and the initial proportion of CD34⁺ cells is around 90%. How this proportion decreased to 60% in three days is still not fully explained. CD34⁻/CD33⁺ cells proliferate quite fast and tend to predominate in the entire population. CD34⁺/CD33⁺ proliferated slightly slower and CD34⁺/CD33⁻ divided rarely. This suggests that the expression of CD33 and the loss of expression of CD34 tend to be correlated with the increased proliferation capacities. CD33⁺ cells are engaged in the myeloid lineage and somehow impair the regeneration capacities of bone marrow transplant. Further investigations are required to identify the mechanism underlying the early appearance of this marker and the loss of CD34 in order to prevent them and maintain the regeneration capacities of the transplant. The occurrence of asymmetric divisions in the very early stages of the cell culture is an attractive hypothesis that could account for the evolution we observed.

HSCs have been shown to display sometimes a polarized organization of cell surface receptors.^{28,29} Several receptors, such as ICAMs, mucins, CD44 and integrins, were shown to cluster in the cholesterol-rich membrane of the uropod at the

cell rear.^{28,30} Our study showed that CD33 should be added to this list. More importantly, the long-term HSC monitoring that was enabled by the absence of flow in the chambers revealed the tight coupling between this polarization and cell migration. This suggests that the early mechanisms involved in the initiation of cell migration are probably coupled with receptor clustering and cell polarization. Further studies are required to investigate the original symmetry break in HSCs. The association with cell migration suggests that the interplay between cell adhesion and contractility could be a key element in this event.³¹ No-flow chambers offer the best-suited experimental conditions to study these basic and fundamental questions and improve our understanding of HSC biology.

Acknowledgements

MT and JL acknowledge support from the European Research Council (starting grant ERC-310472) and the Agence National pour la Recherche (ANR-05PRIB01103, ANR-10-IBHU-0002). TC received a PhD fellowship from the president of Grenoble University.

References

- 1 M. A. Ostrowski, N. F. Huang, T. W. Walker, T. Verwijlen, C. Poplawski, A. S. Khoo, J. P. Cooke, G. G. Fuller and A. R. Dunn, *Biophys. J.*, 2014, **106**, 366–374.
- 2 C. Boehlke, F. Kotsis, V. Patel, S. Braeg, H. Voelker, S. Brecht, T. Beyer, H. Janusch, C. Hamann, M. Gödel, K. Müller, M. Herbst, M. Hornung, M. Doerken, M. Köttgen, R. Nitschke, P. Igarashi, G. Walz and E. W. Kuehn, *Nat. Cell Biol.*, 2010, **12**, 1115–1122.
- 3 K. Yamamoto, T. Takahashi, T. Asahara, N. Ohura, T. Sokabe, A. Kamiya and J. Ando, *J. Appl. Physiol.*, 2003, **95**, 2081–2088.
- 4 F. le Noble, D. Moyon, L. Pardanaud, L. Yuan, V. Djonov, R. Matthijsen, C. Bréant, V. Fleury and A. Eichmann, *Development*, 2004, **131**, 361–375.
- 5 J. G. Goetz, E. Steed, R. R. Ferreira, S. Roth, C. Ramspacher, F. Boselli, G. Charvin, M. Liebling, C. Wyart, Y. Schwab and J. Vermot, *Cell Rep.*, 2014, **6**, 799–808.
- 6 F. Moazzam, F. A. DeLano, B. W. Zweifach and G. W. Schmid-Schönbein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, **94**, 5338–5343.
- 7 L. Adamo, O. Naveiras, P. L. Wenzel, S. McKinney-Freeman, P. J. Mack, J. Gracia-Sancho, A. Suchy-Dacey, M. Yoshimoto, M. W. Lensch, M. C. Yoder, G. García-Cardeña and G. Q. Daley, *Nature*, 2009, **459**, 1131–1135.
- 8 A. Mammoto, T. Mammoto and D. E. Ingber, *J. Cell Sci.*, 2012, (13), 3061–3073.
- 9 J.-W. Shin, J. Swift, I. Ivanovska, K. R. Spinler, A. Buxboim and D. E. Discher, *Differentiation*, 2013, **86**, 77–86.
- 10 A. Gratwohl, H. Baldomero and J. Passweg, *Curr. Opin. Hematol.*, 2013, **20**, 485–493.

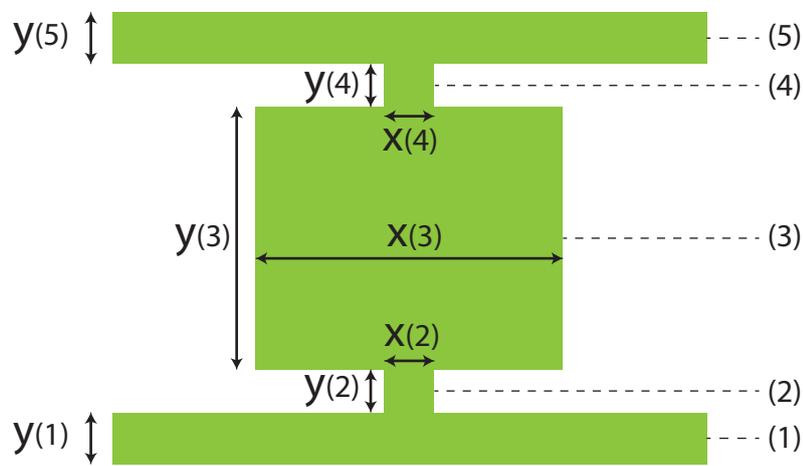
- 11 A. Trounson, R. G. Thakar, G. Lomax and D. Gibbons, *BMC Med.*, 2011, **9**, 52.
- 12 E. A. Copelan, *N. Engl. J. Med.*, 2006, **354**, 1813–1826.
- 13 W. J. Polacheck, R. Li, S. G. M. Uzel and R. D. Kamm, *Lab Chip*, 2013, **13**, 2252–2267.
- 14 W. Liu, L. Li, X. Wang, L. Ren, X. Wang, J. Wang, Q. Tu, X. Huang and J. Wang, *Lab Chip*, 2010, **10**, 1717–1724.
- 15 V. Lecault, M. Vaninsberghe, S. Sekulovic, D. J. H. F. Knapp, S. Wohrer, W. Bowden, F. Viel, T. McLaughlin, A. Jarandehi, M. Miller, D. Falconnet, A. K. White, D. G. Kent, M. R. Copley, F. Taghipour, C. J. Eaves, R. K. Humphries, J. M. Piret and C. L. Hansen, *Nat. Methods*, 2011, **8**, 581–586.
- 16 J. J. VanDersarl, A. M. Xu and N. A. Melosh, *Lab Chip*, 2011, **11**, 3057–3063.
- 17 T. M. Keenan, C. W. Frevert, A. Wu, V. Wong and A. Folch, *Lab Chip*, 2010, **10**, 116–122.
- 18 Y.-C. Toh, C. Zhang, J. Zhang, Y. M. Khong, S. Chang, V. D. Samper, D. van Noort, D. W. Hutmacher and H. Yu, *Lab Chip*, 2007, **7**, 302–309.
- 19 C. Zhang, Z. Zhao, N. A. Abdul Rahim, D. van Noort and H. Yu, *Lab Chip*, 2009, **9**, 3185–3192.
- 20 L. Wang, X.-F. Ni, C.-X. Luo, Z.-L. Zhang, D.-W. Pang and Y. Chen, *Biomed. Microdevices*, 2009, **11**, 679–684.
- 21 C. Luo, L. Jiang, S. Liang, Q. Ouyang, H. Ji and Y. Chen, *Biomed. Microdevices*, 2009, **11**, 981–986.
- 22 M. Kolnik, L. S. Tsimring and J. Hasty, *Lab Chip*, 2012, **12**, 4732–4737.
- 23 L. Lu, M. Xiao, R. N. Shen, S. Grigsby and H. E. Broxmeyer, *Blood*, 1993, **81**, 41–48.
- 24 L. W. Terstappen, S. Huang, M. Safford, P. M. Lansdorp and M. R. Loken, *Blood*, 1991, **77**, 1218–1227.
- 25 R. G. Andrews, B. Torok-Storb and I. D. Bernstein, *Blood*, 1983, **62**, 124–132.
- 26 J. S. Nielsen and K. M. McNagny, *J. Cell Sci.*, 2008, **4145**, 3683–3692.
- 27 A.-V. Fonseca, D. Freund, M. Bornhäuser and D. Corbeil, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 31661–31671.
- 28 F. Sánchez-Madrid and J. M. Serrador, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2009, **10**, 353–359.
- 29 A.-V. Fonseca and D. Corbeil, *Commun. Integr. Biol.*, 2011, **4**, 201–204.
- 30 N. Vannini, A. Roch, O. Naveiras, A. Griffa, S. Kobel and M. P. Lutolf, *Cell Cycle*, 2012, **11**, 1535–1543.
- 31 J. Shin, A. Buxboim, K. R. Spinler, J. Swift, D. A. Christian, C. A. Hunter, C. Léon, C. Gachet, P. C. D. P. Dingal, I. L. Ivanovska, F. Rehfeldt, J. A. Chasis and D. E. Discher, *Cell Stem Cell*, 2014, **14**, 81–93.

Brevet

A microfluidic device including at least one no-flow chamber.

Cambier T., Honegger T., Berthier J., Larghero J., Theyry M.

Demande européenne de brevet 2015, n^o EP14306645.4.



The microfluidic no flow chamber chip consist in a circuit composed of channels duged on a flat PDMS surface. Channel deepness is constant in the whole circuit wich is a one-layer circuit.

The circuit is composed of a serie of parallèle lines . All lines are connected to a common inlet at one extremity and are connected to a common outlet at the other extremity.

Each line have the same bidimensional geometry and is composed of two parallel alimentation channels consisting of two parallel rectangles : (1) and (5). If rectangle (1) is connected to the common inlet at his left extremity and closed at the other extremity, rectangle (5) is connected to the common outlet at his right extremity and closed at the other extremity.

Between the two parallele rectangles , theres is a serie of chambers : (3) aligned in the direction of rectangle lengths. In the serie, chamber centers are separated by « Xs ». In the serie there are at least 12 chambers.

Each chamber is a rounded corner square. Each chamber is connected to the lenght of rectangle (1) by an entry (2) centered on the chamber side that is parallel to rectangle (1). Each chamber is connected to the lenght of rectangle (5) by an entry (4) centered on the chamber side that is parallel to rectangle (5).

Each entry (2) and (4) have a square shape. The two entry sides that are perpendicular to rectangle lenghts (1) and (5) have a convexe curvature to fit to the chamber and to the rectangle.

$$\begin{aligned}
 &5 \mu\text{m} < x_s < 500 \mu\text{m} \\
 &10 \mu\text{m} < y(1) < 1000 \mu\text{m} \\
 &5 \mu\text{m} < x(2) = x(4) = y(2) = y(4) < 500 \mu\text{m} \\
 &30 \mu\text{m} < x(3) = y(3) < 3000 \mu\text{m} \\
 &7,5 \mu\text{m} < y(5) < 750 \mu\text{m}
 \end{aligned}$$

Résumé

Le cytosquelette d'actine régule la forme de la cellule au cours du temps. Pour le comprendre, il faut étudier les mécanismes moléculaires qui le constituent. *In vivo*, ces mécanismes sont masqués par la complexité du vivant. Si nous parvenons à reproduire pièce par pièce le cytosquelette d'actine *in vitro* et si nous pouvons le contrôler, aussi bien dans l'espace et dans le temps, alors nous pourrions élucider les secrets de son fonctionnement. Cette thèse montre que nous avons maintenant développé la technologie qui nous permet de le faire pour certaines architectures du cytosquelette d'actine.

Nous avons développé de nouvelles méthodes de « micropatterning » pour contrôler la nucléation des monomères d'actine dans l'espace en deux dimensions. Ceci nous a amenés à la reconstitution et au guidage de réseaux de filaments d'actine parallèles à polarité identique et à la reconstitution de l'anneau de cytokinèse.

J'ai créé une puce microfluidique innovante pour contrôler la composition biochimique des systèmes d'actine reconstitués au cours du temps. Ceci nous a permis de contrôler la cinétique de polymérisation du filament d'actine individuel libre, et de contrôler la séquence d'intervention des protéines sur les réseaux de filaments d'actine parallèles à polarité identique.

Enfin, nous avons utilisé cette même puce microfluidique pour étudier la différenciation des cellules souches hématopoïétiques.

Abstract

Actin cytoskeleton regulate cell shape over time. To understand that, we have to study molecular mechanisms that constitute actin cytoskeleton. *In vivo*, those mechanisms are hidden by cellular complexity. If we achieve to reproduce piece by piece actin cytoskeleton *in vitro* and if we can control it in space and time, then we are able to elucidate the secrets of it operate. This thesis show that we have developed the technology that allow us to do it for a few actin cytoskeleton architectures.

We have developed new micro-patterning methods to control actin monomers nucleation into two-dimensional space. This led us to the reconstitution and guidance of parallel actin filament networks with same polarity and allowed us to reconstitute actin contractil ring.

I created an innovating microfluidic chip to control biochemical composition of reconstituted actin systems over time. This allowed us to control kinetics of free individual actin filament polymerisation and to control the intervention sequence of proteins on parallel actin filament networks.

Finally, we used the microfluidic chip to study hematopoïetic stem cells differentiation.