



**HAL**  
open science

# Puce à cellules multiplexée pour l'étude de réponses cellulaires parallélisées

Ophélie Berthuy

► **To cite this version:**

Ophélie Berthuy. Puce à cellules multiplexée pour l'étude de réponses cellulaires parallélisées. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10133 . tel-01252556

**HAL Id: tel-01252556**

**<https://theses.hal.science/tel-01252556>**

Submitted on 7 Jan 2016

**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 DE L'UNIVERSITÉ DE LYON**

Délivrée par l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1  
Et l'ÉCOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ

Pour l'obtention du DIPLÔME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Spécialité BIOCHIMIE

Soutenue publiquement le 24 septembre 2015

par

Ophélie BERTHUY

---

PUCE À CELLULES MULTIPLEXÉE POUR L'ÉTUDE DE RÉPONSES  
CELLULAIRES PARALLÉLISÉES

---

Jury :

Pr. Loïc J. BLUM

Dr. Pascal COLPO

Pr. Bruno LE PIOUFLE

Dr. Christophe A. MARQUETTE

Président

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

**M. François-Noël GILLY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE



L'ensemble des travaux constituant cette thèse a été réalisé :

Sous la direction du Docteur Christophe Marquette

Dans l'équipe **Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires**



De l'**Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires**



UMR 5246 – Université Lyon 1 – CNRS – INSA Lyon – CPE Lyon  
Bâtiment Curien  
43 Bd du 11 novembre 1918  
69622 VILLEURBANNE Cédex, France

Au sein de l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé





# REMERCIEMENTS

---

Un grand MERCI...

... aux rapporteurs, le Dr. Pascal Colpo et le Pr. Bruno Le Pioufle, pour le temps qu'ils ont consacré à rapporter ma thèse.

... à l'ensemble de l'équipe GEMBAS pour tous ces moments partagés.

Tout d'abord au Pr. Loïc Blum pour m'avoir accueillie dans son laboratoire

À Christophe, pour ses conseils, sa disponibilité et pour la confiance et l'autonomie qu'il m'a accordées pour la réalisation de mon projet.

À Cloé, Julie, Marine, Steph, Céline, Léa et Meriem pour avoir été bien plus que des collègues de travail.

Aux stagiaires, thésards et post-docs du laboratoire avec qui j'ai eu le plaisir de partager quelques mois.

À Fred et Agnès, qui ont toujours été à mon écoute.

... à François, Pascal et Sinan pour m'avoir accueillie et aider lors de mes visites au JRC et à Giacomo et Valentina pour les expériences de XPS et ToF-SIMS.

... à tous ceux qui m'ont accompagnée d'une façon ou d'une autre dans cette thèse.

À Carole et Gabriel pour les dépôts d'or et les expériences de MEB.

Au Dr. François Rossi et au Pr. Sylvie Ricard Blum pour leur participation à mon comité de suivi de thèse.

À Frédéric et Charlène pour la lévitation des cellules.

À Guilhem pour son aide avec le spotter.

... à mes amis et ma famille.

À Steph et Karen pour cette belle amitié qui traverse les années.

À mes parents sans qui je n'en serais pas arrivé là, pour m'avoir toujours soutenue et aidée à aller de l'avant.

... à Maxime, pour sa présence, son soutien et sa patience à toute épreuve.

Merci à tous pour avoir fait de cette thèse une belle aventure.



## Table des matières

---

Abréviations .....	15
Introduction .....	19
Étude Bibliographique.....	23
1. Les puces à cellules : introduction .....	25
1.1. De nouveaux outils de biologie cellulaire .....	25
1.2. Caractéristiques expérimentales .....	26
1.3. Avantages .....	27
1.4. Applications majeures .....	27
1.5. Etudier des cellules isolées : <i>Single cells analysis</i> .....	28
2. Principales techniques utilisées dans la conception de biopuces .....	29
2.1. La lithographie douce .....	29
2.2. Le dépôt par microcontact .....	30
2.3. Dépôt automatisé.....	31
3. Stratégies d'immobilisation.....	32
3.1. Liaison covalente par l'intermédiaire de SAMs.....	33
3.2. Immobilisation par l'intermédiaire d'oligopeptides .....	33
3.3. Adsorption des protéines ou peptides d'adhésion .....	34
4. Principales techniques utilisées pour contrôler la localisation de cellules .....	34
4.1. La microtexturation de surface.....	34
4.2. Les micropuits.....	38
4.3. Les pièges à cellules.....	41
4.4. Les gouttelettes .....	47
4.5. Autres exemples de systèmes fluidiques.....	50
4.6. Bilan.....	52
5. Méthodes de dépôt.....	54
5.1. Dépôt d'ADN et transfection <i>in situ</i> .....	54

5.2.	Déposition électrique des cellules .....	60
5.3.	Encapsulation et immobilisation de cellules .....	60
5.4.	Dépôt de cellules sur un support fonctionnalisé .....	75
5.5.	Impression de cellules vivantes .....	76
5.6.	Approche microfluidique .....	80
6.	Techniques d'analyse .....	82
6.1.	La fluorescence .....	83
6.2.	L'électrochimiluminescence (ECL) .....	85
6.3.	L'Imagerie par résonance des plasmons de surface .....	86
6.4.	La mesure de force par la déformation de microcolonnes en élastomère .....	89
6.5.	L'ampérométrie .....	89
6.6.	L'impédance .....	90
7.	Applications .....	91
7.1.	Les tests de cytotoxicité et criblage de médicaments .....	91
7.2.	Les tests de migration cellulaire .....	91
7.3.	L'électroporation de cellules .....	92
7.4.	La différenciation de cellules souches .....	93
7.5.	La séparation des cellules .....	94
7.6.	La détection de protéines sécrétées .....	95
8.	Conclusion .....	96
	Matériels et Méthodes .....	99
1.	Matériels .....	101
1.1.	Réactifs .....	101
1.2.	Supports .....	103
1.3.	Instruments .....	103
1.4.	Logiciels .....	104
2.	Méthodes .....	104
2.1.	Microfabrication .....	104

2.2.	Dépôt automatisé des protéines .....	109
2.3.	Dépôt de fibronectine .....	110
2.4.	Dépôt des anticorps.....	110
3.	Culture cellulaire .....	111
3.1.	Cellules HeLa .....	111
3.2.	Cellules issues de carcinome de la prostate .....	111
3.3.	Obtention de transformants stables des cellules HeLa et LNCaP .....	112
3.4.	Transfection <i>in situ</i> des cellules HeLa .....	113
4.	Mise en contact des cellules sur le support.....	113
4.1.	Mise en culture sur le support.....	113
4.2.	Dépôt automatisé des cellules dans l'alginate.....	114
5.	Marquage des cellules et observation de la fluorescence en microscopie .....	114
5.1.	Marquage des cellules.....	115
5.2.	Microscopie de fluorescence .....	115
6.	Quantification du PSA sécrété .....	116
6.1.	ELISA.....	116
6.2.	SPRi.....	117
	Résultats et discussion .....	121
1.	Première approche : cellules immobilisées dans des micropuits .....	124
1.1.	Microfabrication .....	125
1.2.	Culture cellulaire sur la puce .....	135
1.3.	Transfection <i>in situ</i> .....	138
1.4.	Dépôt automatisé des cellules HeLa dans l'alginate .....	140
1.5.	Co-culture de cellules HeLa .....	144
1.6.	Adaptation aux cellules LNCaP .....	145
1.7.	Conclusion .....	153
2.	Deuxième approche : cellules encapsulées directement sur la couche sensible.....	155
2.1.	Immobilisation des anticorps et dépôt des cellules localisés.....	155

2.2.	Contrôle du nombre de cellules.....	156
2.3.	Possibilités d’avoir différentes lignées cellulaires sur le même support.....	157
2.4.	Mesures SPRi .....	160
2.5.	Conclusion .....	164
3.	Troisième approche : Culture localisée en système fermé .....	166
3.1.	Introduction.....	166
3.2.	Fabrication de la biopuce .....	167
3.3.	Culture cellulaire localisée .....	170
3.4.	Mesures SPRi .....	171
3.5.	Conclusion .....	173
4.	Billes d’alginate en solution.....	174
4.1.	Contrôle du nombre de cellules par goutte .....	174
4.2.	Application.....	176
4.3.	Conclusion .....	179
	Conclusion et perspectives.....	181
	Références .....	185





# ABRÉVIATIONS

---

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNi	Acide ribonucléique interférent (également appelé siRNA pour small interfering ribonucleic acid)
ARNm	Acide ribonucléique messenger
B2M	Beta-2-microglobuline
BSA	Albumine de sérum bovin, <i>bovine serum albumin</i>
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
CCD	Dispositive à transfert de charge, <i>charged coupled device</i>
CdS	Sulfure de cadmium
CMOS	Capteurs composés de photodiodes, <i>Complementarity Metal-Oxide-Semiconductor</i>
CRE	Élément de réponse cAMP
CRP	Protéine C réactive
DAPI	4',6'-diamino-2-phénylindole
DEP	Déposition électrophorétique
DHT	Dihydrotestosterone (5 $\alpha$ -Androstan-17 $\beta$ -ol-3one)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, milieu de culture
ECL	Électrochimiluminescence
EDTA	Éthylène diamine tétra-acétate
EGFP	<i>Enhanced-GFP</i>
ELISA	Dosage immuno-enzymatique, enzyme-linked immunosorbent assay
ELR	Peptides synthétiques <i>elastin-like, elastin-laminin receptor</i>
FADS	Appareil de tri de gouttelettes par fluorescence activée, <i>Fluorescence-activated droplet sorting</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanate

HeLa	Henrietta Lacks
HRP	Peroxidase de raifort, <i>horseradish peroxidase</i>
G418	Géniticine (également appelée néomycine)
GFP	Protéine fluorescente verte, <i>green fluorescent protein</i>
LC	Low cross buffer
LED	Light emitting diode
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate
LSPR	Résonance des plasmons de surface localisée, <i>localized surface plasmon resonance</i>
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B
PEO	Polyéthylène oxyde
PBS	Tampon phosphate salin, <i>phosphate-buffer saline</i>
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PDMS	Poly-(diméthylsiloxane)
PEG	Polyéthylène glycol
PEGA	Polyéthylène glycol diacrylate
PS	Polystyrène
PSA	<i>Prostate specific antigen</i>
RET	Transfert d'énergie, <i>resonance energy transfert</i>
RHS	Récepteurs aux hormones stéroïdiennes
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, milieu de culture
SAMs	Monocouches auto-assemblées, <i>self-assembled monolayers</i>
shRNA	Petits ARN en épingle à cheveux, <i>short hairpin ribonucleic acid</i>
SPRi	Imagerie par résonance des plasmons de surface, <i>surface plasmon resonance imaging</i>
SPRM	Microscopie par résonance des plasmons de surface, <i>surface plasmon resonance microscopy</i>
SVF	Sérum de veau fœtal

ToF-SIMS	Spéctrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol, <i>time of flight secondary ion mass spectrometry</i>
TPrA	Tri-n-propylamine
UV	Ultra-violet
VBS	Tampon véronal salin, <i>veronal-buffer saline</i>
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, <i>Vascular endothelial growth factor</i>
XPS	Spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X, <i>X-ray photoelectron spectrometry</i>



# INTRODUCTION

---

Ces dernières décennies ont connu une importante avancée dans le domaine des biotechnologies avec l'avènement des biopuces. Ces nouveaux outils d'analyse multiparamétriques ont permis d'envisager des concepts jusqu'alors irréalisables tels que le séquençage du génome humain, mais aussi des applications dans de nombreux domaines et notamment dans le domaine biomédical.

La compréhension de la réponse cellulaire aux signaux environnementaux est une question clé dans le domaine biomédical notamment pour la réparation de lésions tissulaires. Ces stimuli sont multiples et peuvent être de nature physique, mécanique, chimique ou biologique. De plus, la réponse cellulaire à ces signaux externes se produit en temps réel, c'est pourquoi elle est difficile à évaluer. La nécessité de rendre ces réponses cellulaires prévisibles et de répondre aux exigences d'expériences multiples en parallèle a conduit à l'élaboration de puces à cellules. En effet, les biopuces sont des outils prometteurs pour répondre à ce type de problématique, notamment en raison de leur capacité à permettre l'accès à des tests parallélisés et des petites quantités de matériel biologique requises. Ces puces à cellules sont développées comme outils expérimentaux permettant de caractériser les relations entre l'état cellulaire, les stimuli environnementaux et les réponses cellulaires. Les biopuces ont ainsi plusieurs applications importantes comme l'étude à haut-débit de protéines cibles (Fernandes *et al.*, 2008), de composés toxiques (Lee *et al.*, 2008) et pour étudier l'effet d'un médicament sur une cellule ou une population de cellules cibles (Collins *et al.*, 2012). Ces puces à cellules sont généralement divisées en deux catégories : les puces pour l'analyse et celles pour le traitement des cellules en flux.

Les nouvelles techniques basées sur des puces à cellules ou à tissus contribueront non seulement à la compréhension de la biologie cellulaire fondamentale, mais faciliteront aussi l'analyse de cibles moléculaires. En effet les cellules vivantes peuvent permettre de suivre certaines molécules cibles à travers les changements physiologiques qui sont induits lors de leur exposition à des médicaments, des toxines, des pathogènes ou d'autres agents.

Il y a quatre exigences principales pour réaliser des puces à cellules efficaces : maintenir les cellules vivantes *in vitro*, les immobiliser ou les confiner sur un support, contrôler l'apport des stimuli et mesurer les réponses cellulaires.

La capacité à cultiver des cellules *in vitro* date du début des années 1900 quand Harrison, Carrel et Burrows ont mis au point les premières techniques de culture cellulaire qui servent encore de base aux techniques modernes (Carrel *et al.*, 1911). Les progrès récents dans la culture cellulaire et des technologies de microfabrication ont stimulé la recherche sur l'intégration des cultures cellulaires sur puce (Michelini *et al.*, 2012).

Les puces à cellules permettent la détection simultanée de plusieurs activités cellulaires différentes situées à la surface ou à l'intérieur des cellules, permettant la caractérisation de complexes qui sont difficilement accessibles par d'autres techniques. De plus, la liaison des cellules à des anticorps ou d'autres ligands peuvent induire leur activation, et par conséquent les résultats de ces interactions tels que la phosphorylation, l'expression de gènes, la sécrétion de nombreux produits, la différenciation, la prolifération et l'apoptose des cellules sont aussi mesurables grâce à ces biopuces. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés au développement d'une puce à cellules permettant la détection en temps réel et sans marquage de molécules sécrétées par des cellules cancéreuses.

Ce manuscrit se divise en trois parties. La première rappelle le contexte de l'étude, elle se focalise donc sur les puces à cellules, décrivant notamment les différentes techniques qui peuvent être mises en œuvre dans leur conception ainsi que leur utilisation, la seconde partie correspond à la partie expérimentale et la dernière s'intéresse aux résultats obtenus au cours de la thèse.





---

## **ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---



## 1. LES PUCES À CELLULES : INTRODUCTION

Les puces à cellules ont succédé aux puces à ADN et aux puces à protéines dans l'élan de la miniaturisation. Miniaturiser permet ainsi de réaliser des dizaines voire des milliers de conditions différentes sur une même puce, mais également de ne pas moyenniser les résultats d'une grande population cellulaire. Les technologies de miniaturisation mises en œuvre dans la conception de puces à cellules proviennent des technologies utilisées pour les puces à ADN ainsi que pour les puces à protéines.

### 1.1. DE NOUVEAUX OUTILS DE BIOLOGIE CELLULAIRE

Les cellules sont des entités dynamiques complexes. Bien qu'elles possèdent le même génome, elles n'expriment pas les mêmes gènes ni les mêmes niveaux selon le tissu dans lequel elles se situent, selon leur degré de différenciation et selon les signaux environnementaux qu'elles reçoivent (facteurs solubles, matrice extracellulaire, cellules voisines, ...).

Les puces à cellules constituent de nouveaux outils d'études des cellules, et en particulier des cellules issues d'organismes multicellulaires. Ce sont des systèmes miniaturisés constitués d'un support de petite taille sur lequel sont isolés de petits groupes de cellules (de 1 à 100 cellules). Cet outil permet de tester simultanément plusieurs dizaines de conditions différentes mais aussi d'avoir un contrôle précis du microenvironnement cellulaire liquide et solide afin de se rapprocher des conditions *in vivo* et d'obtenir des résultats plus représentatifs de la réponse réelle des cellules dans leur contexte naturel.

## 1.2. CARACTÉRISTIQUES EXPÉRIMENTALES

Afin de réaliser des puces à cellules, quatre aspects sont à prendre en compte : maintenir les cellules vivantes, les isoler sur un support ou dans un volume défini, contrôler l'apport des stimuli et mesurer leur réponse.

Le maintien en culture des cellules non cancéreuses est difficile du fait de leur caractère non immortel. C'est pourquoi la majorité des cellules étudiées est issue de lignées de cellules cancéreuses. En 1952, Georges Otto Gey parvient à maintenir en culture les cellules cancéreuses d'Henrietta Lacks (Gey *et al.*, 1952). Ces cellules nommées HeLa en hommage à cette patiente sont aujourd'hui très utilisées dans les laboratoires de recherche.

La majorité des biopuces à cellules utilise des cellules adhérentes qui peuvent être aisément immobilisées sur un support. Cette immobilisation est obtenue grâce à leur propriété d'adhésion, par l'intermédiaire des protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène) elles-mêmes immobilisées sur la surface du support. A l'inverse, les cellules non adhérentes, en général des cellules circulantes, ne sont pas immobilisées au sens strict, mais isolées et étudiées dans des micro-compartiments.

Les stimuli environnementaux comme les facteurs solubles sont apportés à la cellule soit par simple incubation de la puce, soit par l'intermédiaire de micro-canaux faisant intervenir la microfluidique. Cette technologie permet de contrôler avec plus de précision l'apport de molécules solubles, que ce soit les nutriments nécessaires à la culture ou les inducteurs étudiés. De plus, elle permet de limiter les volumes de réactifs et d'échantillons mis en œuvre.

Enfin, plusieurs types de réponse cellulaire peuvent être étudiés. Cela peut être un changement de phénotype cellulaire, se traduisant par un processus comme la prolifération, la différenciation, l'attachement, la migration, l'apoptose ou encore la nécrose. Il peut également s'agir de réponses moléculaires, se traduisant par l'expression de gènes, la sécrétion de protéines ou encore la signalisation inter- et intracellulaire. Dans le premier cas, une observation au microscope en utilisant des marqueurs spécifiques des différents états phénotypiques peut être réalisée tandis que dans le second cas des méthodes de détection, comme les tests ELISA ou l'analyse des ARNm peuvent être mis en œuvre.

### 1.3. AVANTAGES

Les puces à cellules présentent de nombreux avantages :

- La miniaturisation et le multiplexage permettent la conception de laboratoire sur puce pour réaliser simultanément de nombreux essais.
- Le contrôle précis du microenvironnement : des composants microfluidiques peuvent être intégrés pour manipuler les flux et standardiser les conditions expérimentales (Li *et al.*, 2003).
- Une sensibilité augmentée grâce à la proximité entre les analytes et la zone de détection.
- Un flux continu et une analyse en temps réel : les puces à cellules peuvent être conçues de façon à obtenir des informations en temps réel, fournissant ainsi un meilleur aperçu des dynamiques de procédés spécifiques dans des cellules vivantes grâce à des méthodes rapides et non-invasives de détection.
- Une réduction des coûts. En effet, les puces à cellules utilisent de très faibles volumes de réactifs et de cellules et de nombreuses techniques de détection sont sans marquage, évitant ainsi l'utilisation de composés additionnels coûteux.

### 1.4. APPLICATIONS MAJEURES

Depuis la fin du séquençage du génome humain (Collins *et al.*, 2004), le nombre de gènes présents chez l'Homme est estimé à environ 30 000. Cependant, la fonction de 85% d'entre eux est encore inconnue. Un nouveau projet fait alors suite à celui du séquençage du génome humain : l'attribution d'une fonction à chacun de ces gènes. En permettant l'étude des interactions des biomolécules au niveau cellulaire, les puces à cellules peuvent contribuer à la réalisation de ce projet. Par ailleurs, les puces à cellules constituent une nouvelle méthode d'étude du comportement de la cellule face à des facteurs environnementaux comme les signaux de transduction par exemple. Enfin, les puces à cellules sont également développées dans le but de cribler les banques de molécules chimiques et génomiques. Elles interviendraient alors dans le processus de découverte de nouveaux médicaments, passant notamment par des études de cytotoxicité. Les puces à cellules ont aussi été utilisées afin de

contrôler différents aspects de biologie cellulaire tels que l'adhésion, la diffusion, le comptage et le tri cellulaire, la migration et les mécanismes de signalisation.

### 1.5. ETUDIER DES CELLULES ISOLÉES : *SINGLE CELLS ANALYSIS*

Les modèles génétiques et l'expression des protéines peuvent expliquer le comportement cellulaire dans une large mesure, mais l'étude dynamique des cellules vivantes peut accroître la compréhension des événements moléculaires interconnectés qui ont lieu continuellement dans chaque cellule. Chaque cellule est plus ou moins différente d'une autre, même dans un même type cellulaire (Spudich *et al.*, 1976). Pendant longtemps, il a été supposé que les cultures de cellules étaient de nature homogène, et que l'analyse d'une collection de cellules donnerait une évaluation précise du comportement de chacune des cellules de cette culture ou des tissus correspondants. La réponse moyenne des cellules était, et est encore souvent, interprétée comme la réponse de toutes les cellules de cet échantillon. De plus, l'effet du nombre de cellules (signalisation, interactions, etc.) sur le comportement des cellules était, et est encore souvent, négligé en raison des difficultés dans le suivi détaillé de tels phénomènes. L'attitude à l'égard des mesures d'ensemble commence à changer et les chercheurs sont aujourd'hui de plus en plus intéressés à étudier les effets résultants de l'hétérogénéité dans des échantillons de cellules, d'où l'émergence des études sur cellules isolées.

## 2. PRINCIPALES TECHNIQUES UTILISÉES DANS LA CONCEPTION DE BIOPUCES

Certaines techniques sont très fréquemment utilisées lors de la conception de biopuces. C'est pourquoi, ce paragraphe sera basé sur la description de ces techniques qui seront citées pour diverses applications au cours de ce chapitre.

### 2.1. LA LITHOGRAPHIE DOUCE

La lithographie est une technique permettant de transférer une image (généralement présente sur un masque) vers un substrat. Elle permet de masquer certaines zones du substrat et d'en laisser d'autres sans protection de façon à traiter particulièrement certaines parties de la surface en laissant les autres sans modifications. La lithographie douce met en œuvre de simples techniques de moulage d'élastomères. Le plus utilisé est le polydiméthylsiloxane (PDMS). Biocompatible, perméable au gaz et stable, il est adapté au matriçage de cellules ou de protéines. De plus, il est transparent jusqu'à des longueurs d'onde de 300 nm ce qui apporte un avantage lors de son utilisation avec des dispositifs de détection utilisant des systèmes optiques. Par cette méthode, seul le moule est réalisé par des techniques de lithographie dure, le reste des procédures est simple et économique (Kane *et al.*, 1999). Généralement, les moules sont réalisés à partir d'empreintes conçues par photolithographie sur du silicium ou des photopolymères comme le SU-8. Une couche d'élastomère à l'état liquide avant polymérisation est simplement appliquée sur l'empreinte. Il polymérise ensuite lorsqu'il est chauffé à 60°C pendant 2h (il peut polymériser à des températures inférieures mais cela prend plus de temps). Un schéma illustrant cette technique est présenté sur la Figure 1. Les outils en élastomères ainsi obtenus peuvent avoir plusieurs utilisations. Ils peuvent en effet servir de tampons « encreurs » pour le dépôt par microcontact, de micropuits ou de canaux microfluidiques. La résolution est de l'ordre du micromètre.

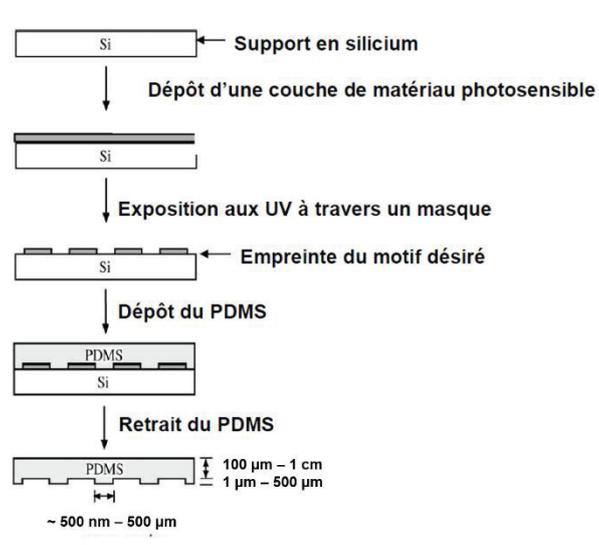


Figure 1 : Schéma illustrant la fabrication d'un moule en PDMS par la technique de photolithographie.

## 2.2. LE DÉPÔT PAR MICROCONTACT

Le dépôt par microcontact, également appelé impression microcontact (« microcontact printing »), permet le transfert de monocouches sur des surfaces. Pour cela, un timbre élastomérique (ou tampon encreur) de géométrie contrôlée, très généralement en PDMS, est fabriqué grâce à un moule 3D. Le timbre est alors « encré » avec la solution de biomolécules, rincé, séché, puis amené au contact de la surface pour y imprimer le matériel et former la matrice sur le substrat (Figure 2) (Marquette *et al.*, 2008).

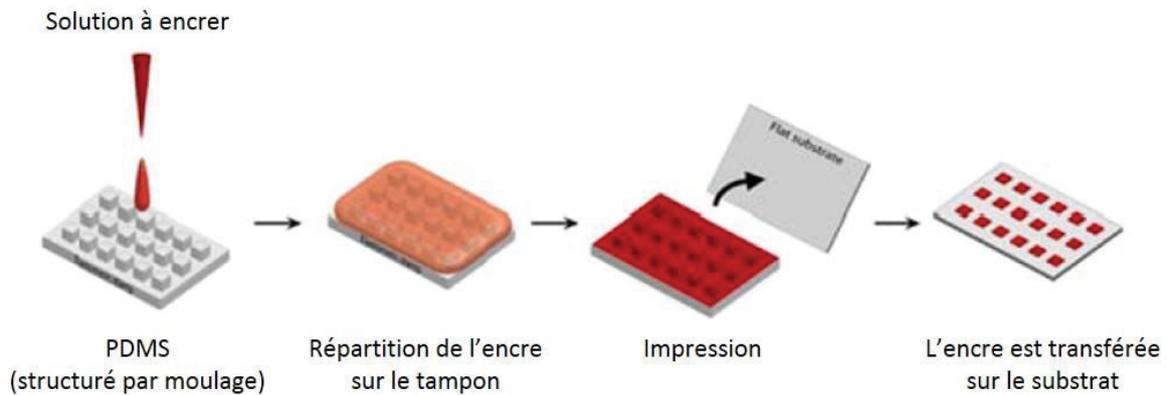


Figure 2 : Principe du dépôt par microcontact (extrait de Marquette et al, 2008).

### 2.3. DÉPÔT AUTOMATISÉ

Parmi les techniques de matricage de biomolécules, la plus répandue reste celle des *spotted arrays* : il s'agit de réaliser des dépôts de la solution de biomolécules (dans un tampon de dépôt) à des positions spécifiques de la surface à l'aide d'un robot à aiguilles. Deux technologies d'impression sont disponibles : « contact » et « non-contact ».

#### 2.3.1. IMPRESSION CONTACT

Le dépôt se fait par contact physique direct de l'aiguille avec la surface. L'aiguille, rigide et creuse, est au préalable immergée dans la solution à déposer, de sorte qu'un petit volume entre dans l'aiguille par capillarité. Le robot amène ensuite celle-ci à la position souhaitée, puis, la goutte est transférée sur le substrat lors de la mise en contact. Le diamètre des spots obtenus dépend des propriétés physicochimiques de la surface et de la solution, mais aussi de la géométrie de l'aiguille. Cette technique a l'avantage d'être simple et robuste mais elle souffre de problèmes de reproductibilité, d'homogénéité du dépôt, de contamination, et risque d'endommager la surface.

### 2.3.2. IMPRESSION NON-CONTACT

La solution est prélevée dans un réservoir puis déposée par éjection de gouttes sur la surface. L'absence de contact direct avec la surface permet de diminuer les risques de contamination. Par ailleurs, les aiguilles indépendantes permettent une plus grande flexibilité pour le matriçage qu'avec un appareil d'impression contact. L'éjection de la goutte peut être contrôlée de différentes manières (del Campo *et al.*, 2005). Ainsi dans un système à jet d'encre, l'« encre » (la solution de biomolécules) est chauffée localement afin de former une bulle de vapeur qui grossit rapidement et provoque l'éjection d'une goutte de solution. Un autre système d'éjection utilise la déformation d'une membrane piézo-électrique pour créer une impulsion acoustique qui déclenche l'éjection de la goutte. Les propriétés de la solution à déposer sont cruciales : la tension de surface doit être assez élevée pour que l'encre ne s'écoule pas du système qui la dispense mais sa viscosité doit être assez faible pour que l'éjection soit aisée. Parmi les défauts récurrents de cette technique se trouvent le dépôt de gouttes satellites lors de l'éjection, ou bien la présence de bulles d'air dans le dépôt.

## 3. STRATÉGIES D'IMMOBILISATION

Les cellules interagissent avec les surfaces grâce à des interactions spécifiques et non spécifiques au travers de liaisons récepteur-ligand, de forces électrostatiques de Van Der Waals et d'interactions hydrophobes. L'adhésion cellulaire sur des supports solides dépend également de nombreux autres facteurs tels que l'hydrophobicité, la composition chimique et la charge de la surface, la rugosité et les sites de reconnaissance spécifiques pour les récepteurs de surface cellulaire.

Créer des matrices en texturant des surfaces est une technique fréquemment utilisée pour organiser spatialement des cellules isolées. La texturation est un terme large qui fait souvent référence à des points introduits sur une surface pour permettre l'adhésion directe de cellules, mais peut aussi comprendre la texturation de polymères comme le PEG, créant ainsi des structures anti-adhésives.

Le concept général de la microtexturation est de créer un contraste entre des régions cytophiles (favorables à l'adhésion cellulaire) et des régions cytophobes (repoussant les cellules) en modifiant la chimie de surface d'un support. Les exemples de matrices extracellulaires cytophiles couramment utilisées sont la fibronectine, le collagène et la laminine, alors que le PEG est souvent utilisé pour ses propriétés cytophobes.

Les cellules adhérentes peuvent donc être immobilisées par l'intermédiaire de protéines d'adhésion immobilisées sur le support par différentes techniques.

### 3.1. LIAISON COVALENTE PAR L'INTERMÉDIAIRE DE SAMs

Une des premières techniques d'immobilisation de protéines d'adhésion a été l'utilisation de monocouches auto-assemblées (SAMs) d'alcanethiols sur une surface d'or. En effet, les groupements sulfures de SAMs établissent une liaison covalente avec l'or de la surface. Les protéines d'adhésion sont ensuite immobilisées par interaction avec les groupements fonctionnels situés à l'autre extrémité des alcanethiols. La couche de SAMs peut également être déposée par l'intermédiaire d'un tampon encreur en PDMS afin de réaliser des plots fonctionnalisés sur la surface et permettre ainsi de matricer des cellules (Lopez *et al.*, 1993; Mrksich *et al.*, 1997).

### 3.2. IMMOBILISATION PAR L'INTERMÉDIAIRE D'OLIGOPEPTIDES

Zhang *et al.* ont synthétisé des oligopeptides présentant un motif d'adhésion cellulaire (RADS)<sub>n</sub> à l'extrémité N-terminale, et un oligo(alanine) suivi d'une cystéine à l'extrémité C-terminale pour fixer l'oligopeptide sur une surface d'or, à l'instar des groupements alcanethiols des SAMs (Zhang *et al.*, 1999). Les cellules sont ainsi immobilisées sur la surface d'or par la reconnaissance du motif d'adhésion (RADS)<sub>n</sub>.

### 3.3. ADSORPTION DES PROTÉINES OU PEPTIDES D'ADHÉSION

L'immobilisation par adsorption met en jeu principalement des interactions ioniques, polaires, hydrophobes, interactions de Van der Waals ou encore des liaisons hydrogènes entre la molécule à immobiliser et le support. C'est une immobilisation simple, rapide et généralement peu dénaturante qui permet une fixation non covalente des protéines. Les protéines peuvent être immobilisées de cette manière par différentes méthodes de dépôt telles que le dépôt microcontact ou le dépôt automatisé sur une surface cytophobe. Les principales protéines immobilisées afin de créer une région cytophyle sont les protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine ou le collagène et les protéines présentant un motif RGD, motif d'adhésion cellulaire. Les interactions entre les cellules eucaryotes et ces protéines sont médiées par les intégrines, qui sont des récepteurs transmembranaires qui interagissent avec des ligands spécifiques présents sur la surface du support tels que les protéines citées précédemment.

## 4. PRINCIPALES TECHNIQUES UTILISÉES POUR CONTRÔLER LA LOCALISATION DE CELLULES

### 4.1. LA MICROTÉXTURATION DE SURFACE

Idéalement la microtexturation devrait offrir des propriétés de surface dynamiques et permettre le contrôle de la disposition géométrique des cellules, avec des capacités à connecter différents types de cellules pour des études d'interaction et la création de réseaux 3D (Voldman, 2006).

Les cellules adhérentes, comparées aux non-adhérentes, ont longtemps été considérées plus simples à utiliser pour l'étude dans des formats multiplexes en raison de la possibilité de positionner aisément ces cellules, leur permettant ainsi d'adhérer à un endroit particulier et de suivre cet endroit pendant la croissance cellulaire au cours de l'analyse.

Les revêtements et texturation de surface peuvent être modifiés pour optimiser les conditions de chaque microdispositif. Avec les nouvelles technologies de dépôt automatisé, des volumes de

quelques nanolitres peuvent être déposés sur une surface d'une manière adressable. Les tentatives d'adresser et de capturer des cellules sur une surface de façon organisée ont conduit à l'immobilisation de molécules reconnues par les récepteurs cellulaires (Kane *et al.*, 1999), de nanofils magnétiques (Tanase *et al.*, 2005) ou encore d'ADN (Chandra *et al.*, 2006). Dans la plupart des essais *in vitro* les effets biologiques potentiels sur les cellules doivent être considérés lors de la modification de surface du support dans le but de maintenir la viabilité des cellules et d'aboutir à des conclusions expérimentales valides. Un des avantages d'avoir des cellules immobilisées est de pouvoir leur apporter des nutriments et/ou réactifs grâce à un système microfluidique sans modifier leur organisation spatiale.

Des supports dynamiques dont l'adhésion cellulaire change en réponse à des stimuli externes tels que la chaleur, la tension ou la lumière ont aussi été décrits. Kaji *et al.* ont présenté une méthode dynamique de matricage des cellules HeLa en utilisant une sonde électrochimique pour modifier localement la surface cytophobe en zones cytophiles par désorption de BSA, agent de blocage, du support. Grâce à cette technique, les cellules sont d'abord maintenues sur une zone puis, après désorption, elles peuvent migrer hors de cette zone. (Kaji *et al.*, 2004). Ainsi, en changeant localement les propriétés d'adhésion du support, une matrice dynamique de cellules peut être créée.

La signalisation cellulaire est une autre application possible pour les techniques de microtexturation. Par exemple, un réseau neuronal dans les cellules d'hippocampe de rat a été formé dans des canaux créés par gravure photothermique (Sugio *et al.*, 2004). La distance entre les canaux engendre un délai dans la cinétique d'interaction des cellules (Figure 3-a).

La microtexturation de surface afin de contrôler la taille des cellules, la croissance et la morphologie a été largement étudiée (They, 2010). Le sens de migration des cellules (Jiang *et al.*, 2005) et la division cellulaire (They *et al.*, 2005) en utilisant des motifs asymétriques ont montré la possibilité d'étudier les interactions matériaux-cellules et le comportement cellulaire en résultant. De plus, des cellules endothéliales humaines ont pu être transformées de l'état croissant à apoptotique en réduisant la surface où les cellules peuvent être cultivées (Figure 3-b), restreignant progressivement l'extension

cellulaire et procurant un contrôle géométrique de la croissance et de la viabilité des cellules (Chen *et al.*, 1997).

Organiser des cellules isolées dans des matrices de haute densité pour des applications de criblage est une technique couramment utilisée. Un des premiers exemples a été l'utilisation de membranes élastomères percées d'orifices ronds ou carrés créés par décollement pour former des motifs dans une boîte de Pétri classique (Ostuni *et al.*, 2000). Plus récemment, des essais pour du criblage haut-débit de cellules souches de rat ont été réalisées par Ashton *et al.* Des plots cytophiles ont été créés par impression microcontact. Par la suite, l'ensemencement de cellules progénitrices neurales d'hippocampe de rat a conduit à la formation de neurosphères sur la puce (Figure 3-c). Ces neurosphères ont ensuite été récupérées pour l'extension classique dans des volumes de culture plus importants. Puisque les neurosphères grandissent normalement en suspension et qu'il est difficile de suivre leur évolution, cette méthode de matriçage de neurosphères a un grand potentiel dans le domaine de recherche à partir de cellules souches (Ashton *et al.*, 2007).

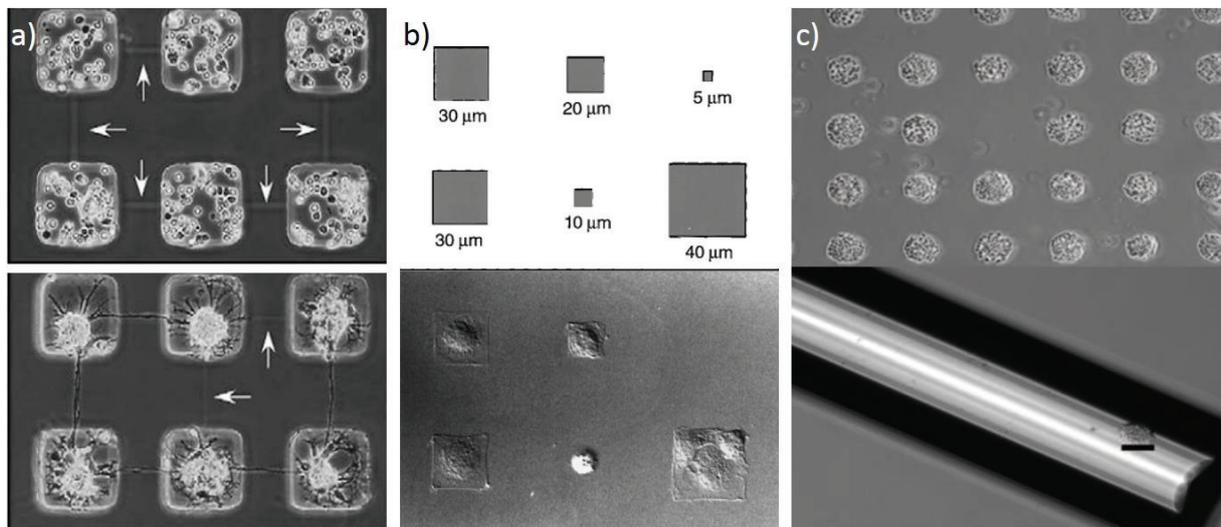


Figure 3 : Exemples d'approches de microtexturation de surface.

a) Cellules neuronales de rat cultivées dans des canaux formés par gravure photothermique (J0 et J+5) (puits de  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ ) (Sugio *et al.*, 2004), b) Effet de l'étalement sur la croissance cellulaire et l'apoptose : schéma montrant les différentes tailles des plots cytophiles et vue de Nomarski des cellules adhérentes au support (Chen *et al.*, 1997), c) Croissance et isolation de neurosphères (diamètre des spots =  $100\ \mu\text{m}$ ) (Ashton *et al.*, 2007).

La capacité à contrôler la localisation spatiale et la géométrie des cellules par l'ingénierie de surface a grandement contribué à notre compréhension de la façon dont l'adhésion cellulaire régule une grande variété de fonctions cellulaires. Les techniques classiques d'impression microcontact ne permettent pas de matricer plusieurs types cellulaires. Pour surpasser cette limitation, des techniques de mise en forme ultérieures ont permis la fabrication de substrats multi-composition telles que l'estampage séquentiel de plusieurs protéines (Rogers *et al.*, 1998), la photolithographie multi-masques (Hui *et al.*, 2007), les barrières photorésistantes et les biomolécules liées à l'aminosilane (Bhatia *et al.*, 1997) ou encore le tampon à plusieurs niveaux (Tien *et al.*, 2002). Ces substrats multi-composition sont constitués de plus d'un type de régions adhésives et ont été utilisés pour séparer spatialement différents types de cellules ou composants sous-cellulaires en exploitant la fixation préférentielle de certains types cellulaires ou de récepteurs à des ligands spécifiques. Rodriguez *et al.* ont présenté une stratégie simple basée sur l'interaction biotine-avidine pour générer des motifs multicolores qui permettent de créer trois régions spatialement et fonctionnellement distinctes : adhésive

(fibronectine), dynamiquement adhésive (neutravidine) et non-adhésive (Pluronic F127) (Figure 4). Cette technique a été utilisée pour la migration et la co-culture de cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain (HUVECs), des cellules souches mésenchymateuses humaines (MSC) et des cellules dérivées de l'ovaire de hamster de Chine (CHO) (Rodriguez *et al.*, 2014). Cette méthode simple peut permettre des études *in vitro* de l'organisation cellulaire complexe et de coordonner la migration multicellulaire.

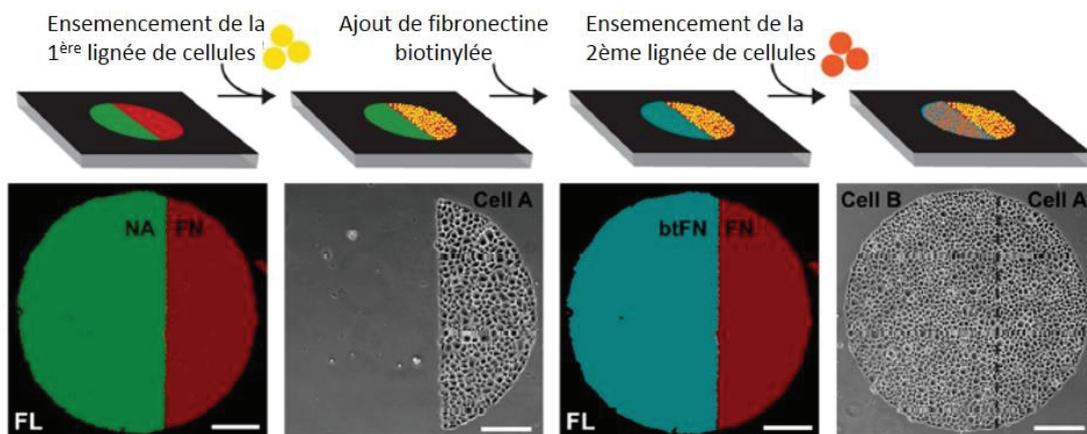


Figure 4 : Substrat multicolore présenté par Rodriguez *et al.*, 2014 pour la co-culture de cellules (la barre d'échelle représente 100  $\mu\text{m}$ ).

## 4.2. LES MICROPUIITS

Une méthode courante pour isoler des cellules est de les séparer par des frontières physiques. Les plaques multipuits classiques ont été construites sur l'idée d'analyser en parallèle de multiples échantillons. C'est pourquoi la fabrication de micropuits peut être considérée comme la miniaturisation de ces plaques. C'est une technique simple et directe aussi bien pour la manipulation que pour la fabrication. En fonction de l'application attendue (cellules isolées ou populations de cellules), un dispositif de micropuits peut être conçu de nombreuses manières différentes en sélectionnant différents paramètres tels que la forme, la taille, la matière et le nombre de puits.

En arrangeant spatialement des cellules isolées, l'hétérogénéité d'une population cellulaire peut être expérimentalement explorée. Les puits larges, retenant de nombreuses cellules, permettent communément la culture à long terme (jours et semaines) alors que des puits plus petits, à l'échelle de la cellule par exemple, sont conçus pour l'analyse à court terme (heures et jours).

Un des premiers exemples de micropuits a été présenté il y a une quinzaine d'année par Taylor and Walt. Il s'agit d'un biocapteur optique haute densité qui utilise la capacité des cellules à répondre à des composés biologiquement importants. La matrice a été fabriquée en exécutant un processus de gravure humide sur un faisceau hexagonal de fibre optique. Les puits ont un diamètre de 7  $\mu\text{m}$  (*i.e.* plus petit qu'une cellule étalée), une profondeur de 3  $\mu\text{m}$  et peuvent contenir un volume de 85 fL (Figure 5) (Taylor *et al.*, 2000).

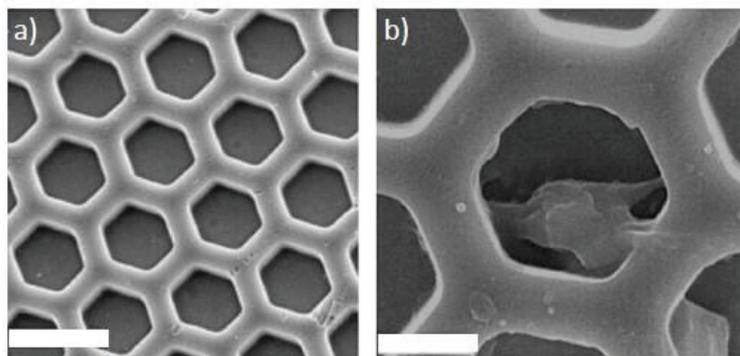


Figure 5 : Images par microscopie électronique à balayage (MEB) de (a) une matrice de micropuits (la barre d'échelle représente 10  $\mu\text{m}$ ), (b) un fibroblaste de souris à l'intérieur d'un puits (la barre d'échelle représente 5  $\mu\text{m}$ ) (Taylor *et al.*, 2000)

Le nombre de puits sur une puce est généralement fonction de la taille de chaque puits, et un grand nombre de puits est souvent requis pour avoir une interprétation statistique précise des données. Plusieurs exemples sont présentés sur la Figure 6. Différentes puces à cellules présentant des micropuits de la taille d'une cellule ont été développées afin d'étudier la réponse de cellules isolées (Deutsch *et al.*, 2006) (Kurth *et al.*, 2009) (Tokimitsu *et al.*, 2007). Par ailleurs, des micropuits permettant de contenir plus d'une cellule ont été fabriqués en modifiant une surface de verre avec du PEG créant ainsi des matrices de puits de 15 x 15  $\mu\text{m}$  (Revzin *et al.*, 2003) ou de 30 x 30  $\mu\text{m}$  (Revzin *et*

*al.*, 2005) (Figure 6-b). D'autre part, des puits plus grands (de l'ordre de la centaine de micromètres) permettent la culture des cellules et l'analyse à long terme (jours ou semaines). Par exemple, Chin *et al.* ont créé une matrice de 10 000 micropuits de dimensions modulables, allant de 20  $\mu\text{m}$  à 500  $\mu\text{m}$  de diamètre et de 10 à 500  $\mu\text{m}$  de profondeur. Le fond de ces puits peut être recouvert de protéine d'adhésion et la matrice est intégrée dans une chambre de culture ce qui permet le suivi rapide ( $\sim 1$  min) et adressable de chaque puits en utilisant un microscope standard programmable. Cette biopuce a été utilisée avec des cellules souches neurales de rat afin d'étudier l'influence des facteurs environnementaux qui gouvernent leur comportement (mitogènes, interactions cellules-cellules et interactions matrice extracellulaire-cellules). Ils ont ainsi pu suivre la prolifération ainsi que la survie de plus de 3 000 cellules isolées (Chin *et al.*, 2004).

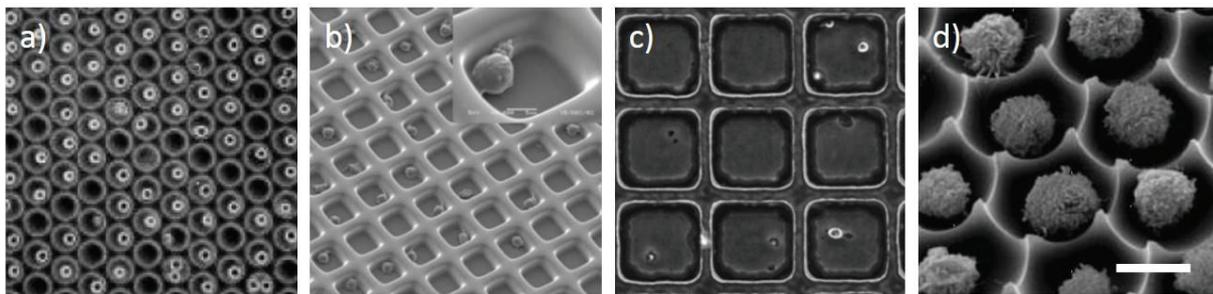


Figure 6 : Exemples de cellules isolées dans des micropuits

a) Matrice de micropuits contenant des cellules RBL-1 ( $d = 25 \mu\text{m}$ ) (Rettig *et al.*, 2005), b) Lymphocytes T retenus dans des micropuits de PEG de  $15 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$  (Revzin *et al.*, 2005), c) Cellules isolées dans des micropuits carrés de  $100 \mu\text{m}$  (Chin *et al.*, 2004), d) Puits hexagonaux en SU-8 (barre d'échelle =  $20 \mu\text{m}$ ) (Deutsch *et al.*, 2006).

Matériel	Taille des puits	Nombre de puits	Forme des puits	Référence
Verre	< 30 $\mu\text{m}$	10 000	Hexagone	(Deutsch <i>et al.</i> , 2006)
Silicium	< 30 $\mu\text{m}$	100 000	Rond	(Tokimitsu <i>et al.</i> , 2007)
PDMS	< 30 $\mu\text{m}$	10 000	Rond	(Rettig <i>et al.</i> , 2005)
Fibre optique	< 30 $\mu\text{m}$	100	Hexagone	(Taylor <i>et al.</i> , 2000)
SU-8	> 100 $\mu\text{m}$	10 000	Carré	(Chin <i>et al.</i> , 2004)
PEG	< 30 $\mu\text{m}$	10 000	Carré	(Revzin <i>et al.</i> , 2005)

Tableau 1 : Vue d'ensemble des caractéristiques des micropuits décrits précédemment.

Suh *et al.* ont présenté une méthode de lithographie douce permettant de fabriquer des microstructures en PEG. Cette surface modifiée est composée de deux régions : la surface moulée en PEG qui agit comme une couche répulsive car elle empêche l'adsorption de protéines et l'adhésion de cellules, et la surface exposée du support qui elle favorise l'adsorption de protéines et l'adhésion de cellules. Il est alors possible de contrôler le nombre de cellules dans ces zones adhérentes en faisant varier les dimensions du tampon en PDMS utilisé pour réaliser les microstructures. Les micropuits peuvent ainsi avoir un diamètre compris entre 500 nm et 500  $\mu\text{m}$  (Suh *et al.*, 2004).

### 4.3. LES PIÈGES À CELLULES

De la même façon que pour les approches de micropuits et de microtexturation, il est possible de piéger des cellules isolées à des positions fixes afin de faciliter leur maintien pour l'analyse. Le piégeage des cellules est souvent combiné avec un système microfluidique, fournissant des mesures sur de courtes échelles de temps et l'apport continu de nutriments et réactifs. Dans les approches de micropuits et microtexturation, les cellules sont essentiellement en contact avec la surface, alors qu'il

Il y a des méthodes de piégeages sans contact grâce notamment aux techniques de microfluidiques (Nilsson *et al.*, 2009).

#### 4.3.1. LES PIÈGES MÉCANIQUES

Le piégeage des cellules dans un polymère est une technique permettant à la fois d'étudier les cellules non adhérentes, mais aussi d'étudier les cellules adhérentes dans un environnement en trois dimensions. Di Carlo *et al.* ont développé une puce microfluidique présentant des pièges à cellule en PDMS formés par moulage (Figure 7). Aucune modification de surface du PDMS n'est requise. Ces pièges en forme de U mesurent 40  $\mu\text{m}$  de diamètre et ne peuvent accueillir qu'une seule cellule. Le chargement des cellules s'effectue en 30 secondes, puis une lame de verre vient recouvrir l'ensemble, laissant un espace libre de 2  $\mu\text{m}$  pour apporter aux cellules les nutriments et divers stimuli par voie microfluidique (Di Carlo *et al.*, 2006).

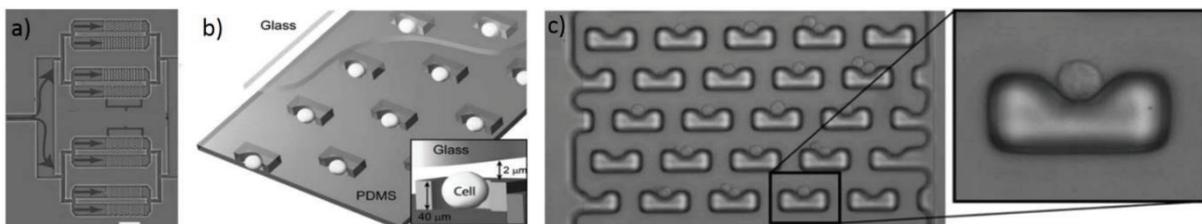


Figure 7 : Exemple de pièges mécaniques en forme de U (Di Carlo *et al.*, 2006).

a) Schéma de la puce complète, b) Schéma du système de capture, c) Image de la partie capture de la puce avec des cellules piégées.

#### 4.3.2. LES PIÈGES MAGNÉTIQUES

Beaucoup de puces à cellules isolées sont limitées à l'analyse de toutes les cellules dans une population, sans possibilité de choisir un sous ensemble de cellules particulièrement intéressantes à étudier.

Une puce à pièges magnétiques (Figure 8), générée par des pics de densité de flux magnétiques à des positions prédéfinies, a permis la capture d'une sélection de cellules par marquage immunomagnétique (Liu *et al.*, 2009). Pour faciliter l'interaction entre les cellules et le champ magnétique, les cellules sont marquées avec des anticorps couplés à du dextran recouvert de micro/nano-particules magnétiques rendant possible le tri de cellules particulières basé sur l'expression de protéines de surface des cellules. En liant les marqueurs pour l'hétérogénéité cellulaire aux propriétés magnétiques, des outils d'analyse de cellules isolées ont été créés pour l'analyse à court terme. Des particules magnétiques ont aussi été insérées dans des cellules vivantes afin de contrôler et de diriger une cellule piégée (de Vries *et al.*, 2005) et des méthodes magnétiques ont été utilisées pour piéger des objets non-magnétiques comme plusieurs types cellulaires différents en utilisant un tampon environnant particulier (Winkleman *et al.*, 2004). Cependant, les effets biologiques du couplage des cellules à des billes ou particules doivent être pris en compte dans ces types d'expériences.

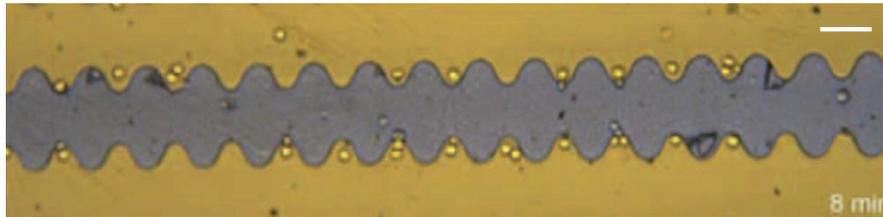


Figure 8 : Exemple de puce à pièges magnétiques : Cellules piégées dans le MSCMA (Magnetic Single Cell Micro Array) (Liu *et al.*, 2009), la barre d'échelle représente 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.3. LES PIÈGES HYDRODYNAMIQUES

La méthode la plus courante pour piéger des cellules dans des systèmes microfluidiques est de créer des canaux latéraux vers un canal principal de transport où les canaux latéraux sont assez petits pour piéger des cellules par succion quand une partie mineure du flux principal est retiré de cette façon. En utilisant une stratégie similaire, les pièges à cellules isolées hydrodynamiques ont été présentés par Valero *et al.* Des sites de piégeages pour cellules vivantes ont été créés par l'utilisation de micro-trous pour relier deux canaux dans un dispositif microfluidique en verre/silicium (Figure 9-a). Le dispositif a

été précédemment appliqué pour l'étude des dynamiques de l'apoptose dans les cellules leucémiques humaines (Valero *et al.*, 2005) et plus récemment dans des études de transfert de gènes et de dynamiques protéiques de cellules souches humaines (Valero *et al.*, 2008). Visant à améliorer le multiplexage, une puce avec 16 000 trous circulaires, chacun d'un diamètre de 10  $\mu\text{m}$ , a été présentée pour la capture de cellules non adhérentes (Figure 9-b) (Zheng *et al.*, 2007). La taille des trous a été ajustée pour piéger un ensemble particulier de cellules isolées. De plus, dans cette configuration, chaque cellule isolée est placée en contact avec des électrodes pour lyser les cellules *in situ* et amplifier l'ADN par PCR. Néanmoins, les pièges hydrodynamiques sont adaptés uniquement à l'analyse à court terme. Pour toutes ces techniques, les effets biologiques dus au piégeage et à la déformation des cellules doivent être considérés.

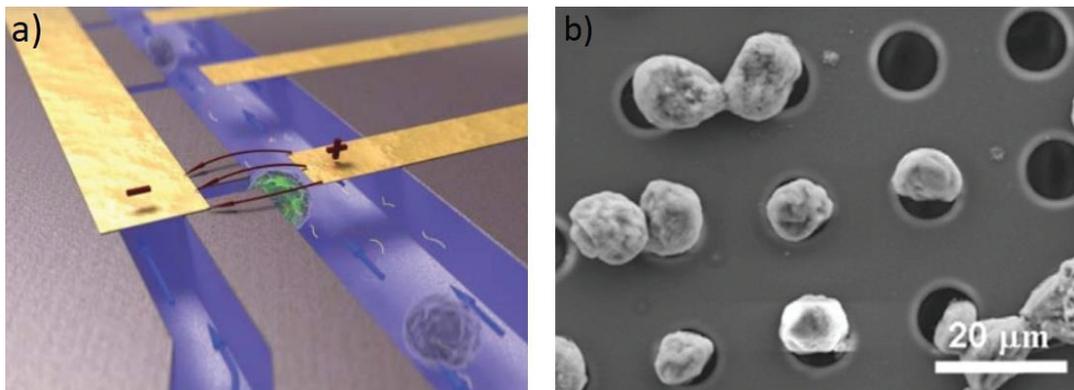


Figure 9 : Exemples de pièges hydrodynamiques. a) Dispositif microfluidique en verre/silicium pour l'électroporation de cellules isolées (20 x 15 x 1 mm) (Valero *et al.*, 2008), b) Image MEB de cellules isolées non adhérentes capturées dans des micro-trous (Zheng *et al.*, 2007).

#### 4.3.4. LES PIÈGES OPTIQUES

Des faisceaux lasers focalisés, aussi appelés pinces optiques, sont une manière de manipuler les cellules avec une très haute précision et de les arranger spatialement. Des objets microscopiques sont forcés par des forces optiques vers le point focal d'un rayon laser, où les objets piégés peuvent être repositionnés dans toutes les dimensions en bougeant le laser et en changeant la position du point focal. Un temps de manipulation prolongé dans des petits volumes peut poser problème dû au fait que

l'énergie laser absorbée dans des tampons aqueux peut conduire à un échauffement nocif pour les cellules. De nouvelles pinces optiques permettent la manipulation de plusieurs objets et peuvent être utilisées pour disposer des cellules isolées (Grier, 2003). De multiples pièges optiques peuvent ainsi être utilisés pour étudier l'hétérogénéité cellulaire de cellules isolées (Ramser *et al.*, 2010). Un exemple plus ancien, avec moins de multiplexage mais qui inclut la possibilité de tri, est le système modèle pour l'identification automatique de cellules basé sur la taille pour séparer les érythrocytes d'autres composants cellulaires de sang humain (Grover *et al.*, 2001). Les forces optiques peuvent aussi être utilisées pour déplacer des cellules (Figure 10) (Kovac *et al.*, 2007).

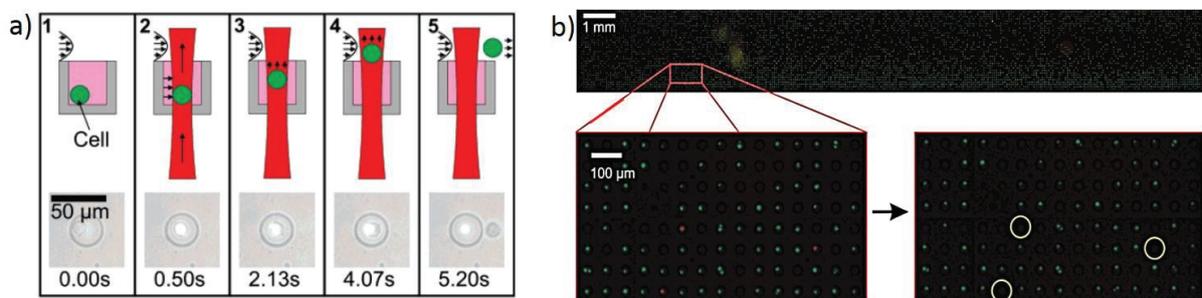


Figure 10 : Libération par forces optiques de cellules piégées. a) Séquence d'images montrant la lévitation et l'enlèvement de la cellule, b) tri basé sur la fluorescence (Kovac *et al.*, 2007).

#### 4.3.5. LES PIÈGES DIÉLECTROPHORÉTIQUES

Non conducteurs, les objets comme les cellules peuvent être déplacés par des forces générées dans un champ électrique non uniforme, comme utilisé dans le positionnement cellulaire diélectrophorétique. Un dipôle est induit dans la cellule par un champ électrique. Dépendant de propriétés comme la conductivité du milieu environnant, une force diélectrique va attirer la cellule à un champ maximum ou minimum. Concevoir des puces à pièges diélectrophorétiques avec un dispositif microfluidique en utilisant des micro-électrodes est avantageux grâce au contrôle accru de la dissipation de la chaleur (*i.e.* par le flux) depuis les sites de capture des cellules. Pour contrôler individuellement beaucoup de positions cellulaires, la connexion et le contrôle des électrodes augmentent en complexité avec le nombre de positions. Un moyen de contourner ce problème et

d'augmenter le nombre de cellules disponibles pour l'analyse a été présenté avec une puce évolutive pour piéger, imager, trier et relâcher des cellules isolées (Taff *et al.*, 2005). Les pièges diélectrophorétiques, parmi d'autres applications, ont été utilisés pour miniaturiser le tri cellulaire en marquant les cellules avec des particules qui diffèrent en fonction de la polarisation (Figure 11), permettant ainsi de trier jusqu'à 10 000 cellules par seconde (Hu *et al.*, 2005).

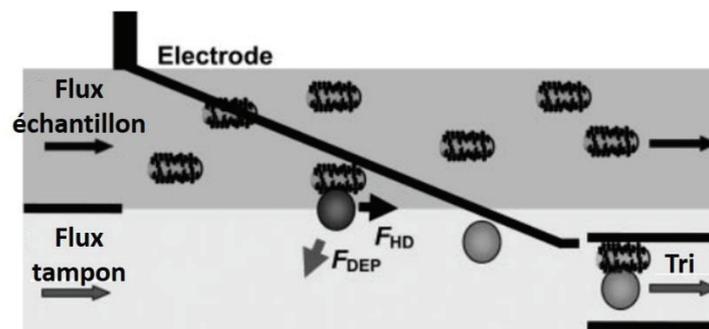


Figure 11 : Schéma de principe des pièges diélectrophorétiques (Hu *et al.*, 2005).

#### 4.3.6. LES PIÈGES ACOUSTIQUES

Les ondes ultrasoniques stationnaires peuvent être utilisées pour le piégeage non-contact d'agglomérats de cellules ou de cellules isolées, offrant un contrôle dynamique de l'environnement par microfluidique pendant un court temps d'analyse. Une onde ultrasonique stationnaire génère des gradients de pression qui, dans un milieu liquide, engendrent des forces sur les cellules. Les effets négatifs sur la viabilité des cellules piégées ont été discutés et dépendent du contrôle de la température dans le dispositif, mais jusqu'à présent aucun signe de viabilité réduite en raison de l'exposition aux ultrasons n'a été présenté. Evander *et al.* ont vérifié la viabilité à court terme (15 minutes) de cellules souches neuronales de rat (Evander *et al.*, 2007) et le groupe de Wiklund a gardé des agrégats 2D de cellules adhérentes issues de fibroblastes rénaux de singe, les cellules COS, viables pendant 30-75 min dans la puce (Hultstrom *et al.*, 2007). Une cage ultrasonique pour le piégeage de cellules isolées a été présentée plus récemment (Manneberg *et al.*, 2008). Cette approche a aussi été très utile pour l'enrichissement en cellules d'échantillons très dilués. Par ailleurs, une technique

prometteuse de pince acoustique a été développée pour matricer des globules rouges bovins (Figure 12) en utilisant des ondes acoustiques stationnaires (Shi *et al.*, 2009). Un des inconvénients des pièges acoustiques à cellules est donc le manque de recul sur la viabilité des cellules à long terme résultant en une méthode utilisable, pour le moment, seulement pour des analyses à court terme (moins d'une heure).

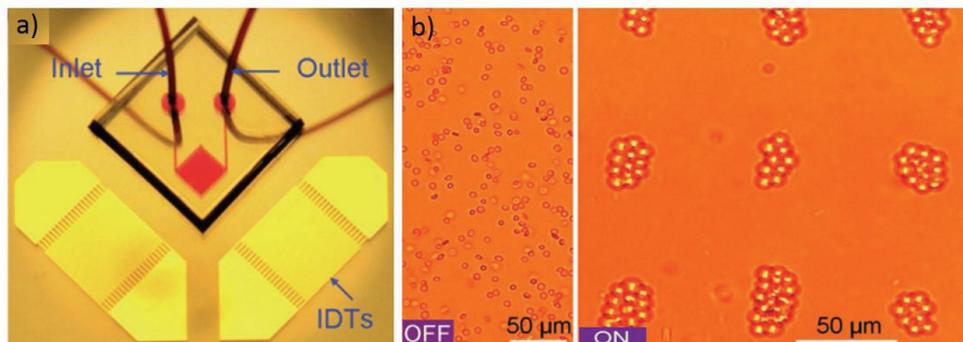


Figure 12 : Exemple de piège acoustique (Shi *et al.*, 2009).

a) Image du dispositif, b) Images des globules rouges bovins avant et après piégeage.

#### 4.4. LES GOUTTELETTES

Une autre technique pour compartimenter des cellules isolées consiste à les enfermer dans des gouttelettes de faibles volumes (de fL à nL), formant ainsi des micro-chambres. Puisque chaque cellule est piégée dans sa propre gouttelette, isolée des autres gouttelettes, le risque de contamination croisée diminue et les cellules peuvent être analysées dans un vaste domaine d'applications, principalement par détection par fluorescence. Le faible volume de chaque goutte offre un mélange homogène des réactifs à l'intérieur de la goutte. Des générateurs de gouttelettes haute fréquence (Hz-kHz) dans des dispositifs microfluidiques créent des gouttes mono disperses (Figure 13-a) d'eau dans un liquide inerte et non miscible (huile). Le contrôle du nombre de cellules injectées par goutte a été une barrière pour les analyses de cellules isolées en gouttelettes, en raison des limites stochastiques de chargement de cellules isolées résultant en 30% d'occupation des gouttelettes par des cellules

isolées. Un moyen a cependant été décrit afin de surmonter cette limitation. Il s'agit d'espacer uniformément les cellules dans des micro-canaux (Figure 13-b) pour être sûr que les cellules entrent dans le générateur de goutte avec la fréquence de formation d'une goutte (Edd *et al.*, 2008). Comme avec les méthodes de dilutions limites utilisées dans les techniques de matricage, il y a plus souvent des gouttelettes vides que des gouttelettes surchargées par un trop grand nombre de cellules. Les gouttelettes peuvent, par la suite, être fusionnées à d'autres gouttelettes (Chabert *et al.*, 2005), divisées en deux (Link *et al.*, 2004) ou triées par diélectrophorèse (Ahn *et al.*, 2006).

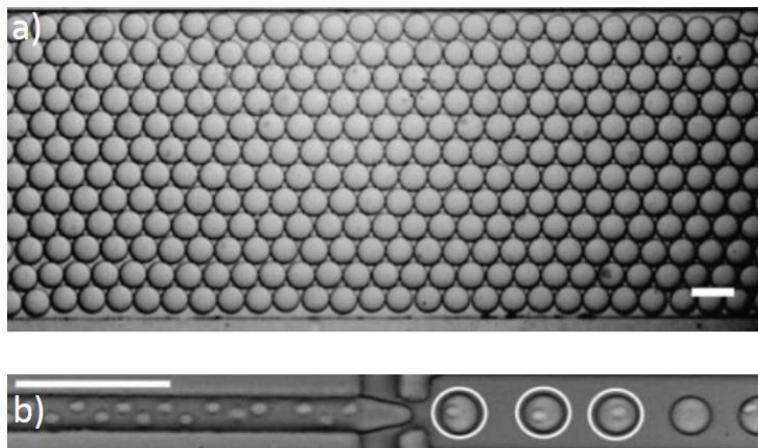


Figure 13 : Exemples de gouttelettes.

a) Gouttelettes mono disperses d'eau dans de l'huile (Holtze *et al.*, 2008), b) Cellules espacées uniformément dans un micro-canal pour former des gouttelettes emprisonnant une cellule isolée (Edd *et al.*, 2008).

Un des principaux avantages de l'analyse des cellules isolées dans des gouttelettes est la possibilité de détecter rapidement des molécules sécrétées par les cellules en raison du faible volume entourant chaque cellule encapsulée. Koster *et al.* ont montré un exemple d'une telle application en incubant un hybridome de souris isolé dans une goutte de 33 pL, provoquant la sécrétion de concentrations détectables d'anticorps après 6h (Koster *et al.*, 2008). De plus, un pourcentage acceptable de cellules (85%) a été prouvé viable pendant toute la période d'analyse (6h). Les étapes cruciales pour les puces à cellules en gouttelettes sont donc l'encapsulation de cellules isolées et le maintien en vie des cellules à l'intérieur de la goutte. Les risques de coalescence, l'épuisement des réactifs ou l'accumulation de

métabolites toxiques sont des obstacles qui doivent être considérés avant que des analyses plus poussées puissent être menées sur des périodes de temps plus longues.

Les applications de puces microfluidiques basées sur des gouttelettes sont nombreuses et ont un potentiel élevé dans le criblage à haut-débit. Un premier exemple d'encapsulation de cellules démontre la lyse cellulaire induite par laser à l'intérieur des gouttelettes suivie en contrôlant l'activité de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase d'un mastocyte de souris isolé (He *et al.*, 2005). La même enzyme a été utilisée dans un essai d'amplification de signal pour détecter les biomarqueurs de surface cellulaire CD19 et CCR5 en faible abondance sur des monocytes humains isolés, en utilisant des gouttelettes multiplexées et un système microfluidique (Joensson *et al.*, 2009). L'encapsulation permet par surconcentration la détection de niveaux très faibles de molécules biomarqueurs, démontrant le potentiel des puces à gouttelettes comme méthode sensible pour la découverte de biomarqueurs. Cependant le débit d'analyse de cellules est beaucoup plus élevé en cytométrie en flux conventionnelle. Par exemple, Baret *et al.* ont publié la description d'un appareil de tri de gouttelettes par fluorescence activée (FADS) capable de trier jusqu'à 300 cellules par seconde contrairement aux instruments conventionnels de cytométrie en flux qui trient rigoureusement jusqu'à 10 000 cellules par seconde (Baret *et al.*, 2009). Après avoir décrit plusieurs modules séparés pour différents buts, l'équipe de Samuels a décrit une puce à cellules en gouttelettes avec flux intégré pour réaliser des études de criblage à haut-débit de cytotoxicité de cellules mammifères (Brouzes *et al.*, 2009). Les cellules ont été maintenues vivantes pendant quatre jours (bien que la prolifération cellulaire n'ait été détectable que pendant les premières vingt-quatre heures) et une librairie de drogues a été criblée pour leurs effets cytotoxiques sur des cellules issues d'une lignée myéloïde humaine (Figure 14). Ainsi, ces outils basés sur des gouttelettes pour l'analyse de cellules isolées sont de plus en plus intéressants pour de nombreuses applications, principalement en raison de leur potentiel pour le criblage haut-débit et les bénéfices des micro-chambres individuelles fermées.

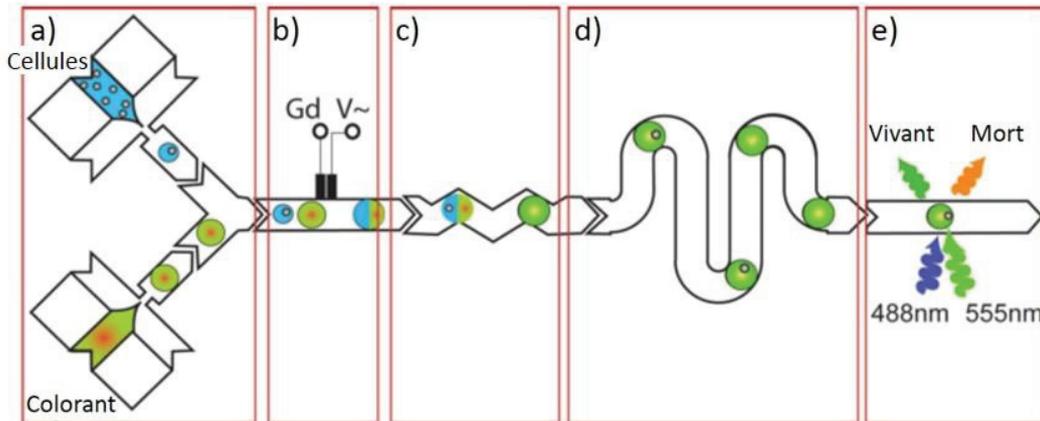


Figure 14 : Exemple de tri cellulaire en gouttelettes - Schéma de principe de la méthode.

a) Ensemble de deux canaux qui injectent les cellules et les marqueurs fluorescents mort-vivant, b) Module de fusion délivrant un courant électrique permettant de contrôler la fusion entre les gouttelettes contenant les cellules et celles contenant les marqueurs, c) Module qui permet de mixer la cellule et le marqueur, d) Ligne à retard qui permet l'incubation pendant 15 minutes des gouttelettes afin d'optimiser la coloration, e) Module de détection qui permet de séparer les cellules en fonction du signal fluorescent (Brouzes et al., 2009)

#### 4.5. AUTRES EXEMPLES DE SYSTÈMES FLUIDIQUES

Les techniques microfluidiques offrent un panel d'outils pour l'étude de cellules isolées en utilisant des canaux, des structures, des pompes et des valves selon différentes combinaisons en fonction des applications. En comparaison avec la culture cellulaire classique, les systèmes fluidiques peuvent être utilisés pour améliorer le contrôle du microenvironnement en permettant le transport de molécules depuis ou vers les cellules à étudier. Les systèmes fluidiques miniaturisés ont aussi un fort potentiel dans le domaine de l'imagerie cellulaire en particulier lorsqu'ils sont utilisés comme moyen de distribution des facteurs de stimulations ou de réactifs. Par exemple, le contrôle précis de faibles volumes de réactifs délivrés à une cellule isolée, dans un réseau microfluidique, a permis de sélectionner une cellule unique d'une culture de cellules (Wheeler et al., 2003). Les changements optiques dans la cellule piégée durant l'approvisionnement séquentiel en réactifs ont été démontrés en suivant la concentration intracellulaire en ions calcium. Des méthodes pour stimuler des parties

d'une cellule ont aussi été démontrées dans une puce microfluidique en PDMS montée sur une lamelle et imagée à haute résolution (Takayama *et al.*, 2001). De plus, la microfluidique permet de créer des gradients de concentration d'un réactif et de varier successivement le débit sur les cellules afin d'étudier leur réponse (Kim *et al.*, 2006). La capacité de paralléliser le traitement des échantillons de cellules dans des puces en organisant la délivrance de plusieurs réactifs grâce à l'utilisation de combinaisons de lignes ou de colonnes a été démontrée, par exemple pour des études multiphénotypiques (Khademhosseini *et al.*, 2005) et pour analyser l'expression de gènes dans différentes lignées cellulaires rapporteuses (King *et al.*, 2007).

L'analyse d'un grand nombre de cellules isolées afin d'assurer statistiquement une représentation précise de la distribution des réponses et/ou comportements cellulaires, est possible grâce aux micro-canaux où les micro-chambres peuvent héberger de multiples sites de culture ou d'analyse. Cheong *et al.* ont mesuré les réponses de signalisation à un ou plusieurs stimuli solubles et/ou inhibiteurs chimiques sur des milliers de cellules isolées en utilisant une détection par immunofluorescence grâce à une puce à cellules microfluidique (Figure 15) (Cheong *et al.*, 2009). Ils ont aussi évalué l'importance des réponses hétérogènes observées dans différents types cellulaires en montrant que les dynamiques d'activité de NF- $\kappa$ B (facteur nucléaire kappa de chaîne légère-activateur de cellules B activées) dans des cellules isolées ne sont pas asynchrones mais ressemblent aux dynamiques de la moyenne de la population.

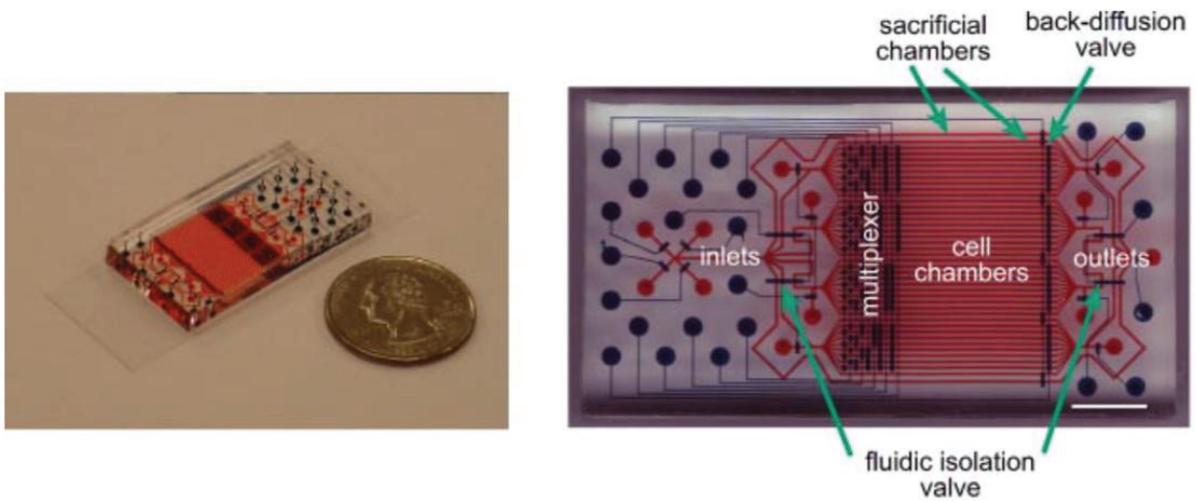


Figure 15 : Puce à cellules microfluidique pour des tests d'immunochimie à haut-débit : Photographie et schéma de fonctionnement du dispositif (Cheong et al., 2009).

#### 4.6. BILAN

Les avantages et inconvénients majeurs des techniques décrites précédemment pour contrôler la localisation de cellules, ainsi que leurs limites, sont présentés dans le Tableau 2.

Techniques	Avantages	Inconvénients	Limites
Microtexturation de surface	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Propriétés dynamiques</li> <li>- Contrôle de la disposition géométrique</li> <li>- Création de réseau 3D</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cellules adhérentes uniquement</li> <li>- Effets biologiques potentiels sur les cellules</li> </ul>	De 5 $\mu\text{m}$ (une cellule) à 500 $\mu\text{m}$ (plusieurs centaines)
Micropuits	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Étude à court terme ou à long terme en fonction de la taille des micropuits</li> <li>- Facilité et simplicité de fabrication et d'utilisation</li> </ul>	/	De 500 nm à > 500 $\mu\text{m}$
Pièges à cellules	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas de modification de surface</li> <li>- Capture d'une sélection de cellules</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Système fluide obligatoire</li> <li>- Analyse à court terme</li> <li>- Effets biologiques potentiels sur les cellules</li> </ul>	De 10 $\mu\text{m}$ à 50 $\mu\text{m}$
Gouttelettes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Risque de contamination croisée diminué</li> <li>- Mélange homogène des réactifs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Difficulté à contrôler le nombre de cellules par gouttelettes</li> </ul>	Du fl au nL
Systèmes fluidiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contrôle du microenvironnement</li> <li>- Traitement parallélisé des échantillons</li> </ul>	/	/

Tableau 2 : Récapitulatif des principales caractéristiques des techniques décrites pour contrôler la localisation des cellules sur une biopuce.

## 5. MÉTHODES DE DÉPÔT

Avec l'avènement de la technologie de dépôt automatisé et de microfabrication, il est maintenant possible de distribuer des volumes de l'ordre du nanolitre de différents produits chimiques, de biomolécules et de cellules de façon spatialement ordonnée (Falsey *et al.*, 2001; Yamazoe *et al.*, 2005). Les méthodes présentées ci-dessous ont permis d'apporter une nouvelle caractéristique aux puces à cellules : le multiplexage.

### 5.1. DÉPÔT D'ADN ET TRANSFECTION *IN SITU*

Pour accélérer l'exploration fonctionnelle du génome humain, il est nécessaire d'utiliser des technologies à haut-débit permettant la transfection de centaines d'acides nucléiques en parallèle et l'analyse simultanée des centaines de phénotypes en résultant. En 2001, Ziauddin et Sabatini ont réussi à miniaturiser l'analyse à haut-débit de la fonction des gènes à l'échelle de la biopuce. Différents plasmides d'expression d'ADNc ont été déposés sur des lames de verre en utilisant un automate de micro-dépôts. Les lames sèches ont été exposées à un agent de transfection, placées dans une boîte de Pétri et recouvertes de cellules adhérentes en suspension dans du milieu de culture. Cette opération a ainsi créé une matrice de groupes de cellules adhérentes transfectées simultanément avec différents plasmides à des positions distinctes et définies (Ziauddin *et al.*, 2001). Avec cette puce à cellules, ils ont ouvert la voie aux micro-systèmes de transfection cellulaire et à une nouvelle technique de transfection, la transfection inverse puisque l'ADN est d'abord accroché sur le support avant d'être transfecté dans les cellules.

Basé sur ce format de transfection inverse, Baghdoyan *et al.* ont développé une puce à cellules pour transfecter simultanément des centaines d'acides nucléiques différents, afin d'analyser et quantifier les phénotypes résultants du gain ou de la perte de fonction d'un gène (Baghdoyan *et al.*, 2004). De la même façon, jusqu'à 5000 clusters de cellules par lame de microscope ont pu être transfectées avec des siRNA (Kumar *et al.*, 2003) ou avec des sondes shRNA pour l'inhibition de l'expression de gènes cibles (Mousses *et al.*, 2003).

Les applications des puces existantes basées sur des techniques de transfections étaient alors limitées aux cellules qui se cultivent et se transfectent facilement telles que HEK293T et COS-7 (Wu *et al.*, 2002). Ces cellules, bien que typiquement utilisées comme modèles, ont une pertinence limitée par rapport aux systèmes biologiques dans le domaine biomédical, tandis que les cellules primaires plus pertinentes, telles que les cellules hMSCs, sont plus difficiles à manipuler et à transfecter (Michiels *et al.*, 2002). C'est pourquoi Yoshikawa *et al.* ont développé une biopuce à transfection pour les cellules hMSCs en utilisant la propriété de la fibronectine à augmenter l'efficacité de transfection des complexes ADN/polymères. La robustesse et la polyvalence de cette technologie a été démontrée grâce à son utilisation d'ARNi *gene knockdown* sur puce ainsi que la généralisation de la technique à une multitude de cellules de mammifères (HEK293, hMSC, HeLa, HepG2 et NIH3T3) (Yoshikawa *et al.*, 2004).

Cependant, bien que les méthodes existantes pour mesurer la transcription fournissent des mesures distinctes de réponses transcriptionnelles obtenues sur de larges populations de cellules, elles ont deux inconvénients majeurs. Premièrement, quantifier des dynamiques transcriptionnelles en utilisant des biopuces en fonction du temps est cher quand de longs processus sont à l'étude. Deuxièmement, malgré des améliorations de la sensibilité des essais, ces approches impliquent généralement la mise en commun d'ARNm de centaines de cellules. La réponse moyenne mesurée de cette façon est adéquate pour classifier différents types cellulaires ou tissus mais n'est pas adaptée pour l'étude de processus avec des variations de cellule à cellule, tels que la division cellulaire, la différenciation ou la réactivité aux drogues. Des développements récents dans le domaine des biopuces basées sur les cellules combinés avec des avancés dans la technologie des rapporteurs permettent de répondre à ces limitations, puisque les niveaux d'expression peuvent être analysés de manière répétée dans des cellules isolées.

Rajan *et al.* ont décrit une plateforme haut-débit pour mesurer les changements transcriptionnels en temps réel dans des cellules mammifères isolées. Ils ont utilisé des biopuces à transfection inverse afin de pouvoir transfecter un plasmide fluorescent rapporteur dans 600 groupes indépendants de cellules plaquées sur une seule lame de microscope et d'imager ces groupes toutes les 20 minutes. Ils ont utilisé le rapporteur Venus-NLS-PEST (Nagoshi *et al.*, 2004) afin de mesurer avec précision l'activité d'un promoteur dans des cellules isolées et ont ainsi pu tester différents promoteurs synthétiques. Le

suivi de plus de 11 millions d'images de cellules pendant une période de 24 heures révèle que les cellules présentent une hétérogénéité substantielle dans leurs réponses à un traitement appliqué incluant une large proportion de cellules transfectées qui ne répondent pas du tout (Rajan *et al.*, 2011). Bien que les puces à cellules ont lentement évolué pour devenir une technologie de criblage plus courante, dans beaucoup de publications les puces contiennent seulement un nombre modeste d'échantillons, et les données de plusieurs puces ont été combinées pour une couverture à grande échelle à cause des limitations technologiques de la méthode (Doil *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2010). Rantala *et al.* ont ainsi décrit l'optimisation d'une méthode de biopuce à spots de cellules (cell spot microarray : CSMA) qui fournit une plateforme de motifs cellulaires isolés spatialement et permet d'augmenter significativement le nombre d'échantillons couverts dans un format de microplaque compatible avec les instruments d'imagerie standards (Figure 16). Afin de permettre l'adaptation rapide de cette technique, ils ont optimisé le protocole d'application du CSMA pour 85 types cellulaires et appliquer la plateforme au profilage génétique fonctionnel de la protéine G couplée aux récepteurs (OPRK1, OR51E1, OR51E2, GPRS160, NPY, CHRM1 et EDG7) dans des cellules cancéreuses de prostate et de cellules épithéliales de prostate non malignes, démontrant ainsi le potentiel du CSMA pour des découvertes de cibles spécifiques (Rantala *et al.*, 2011).

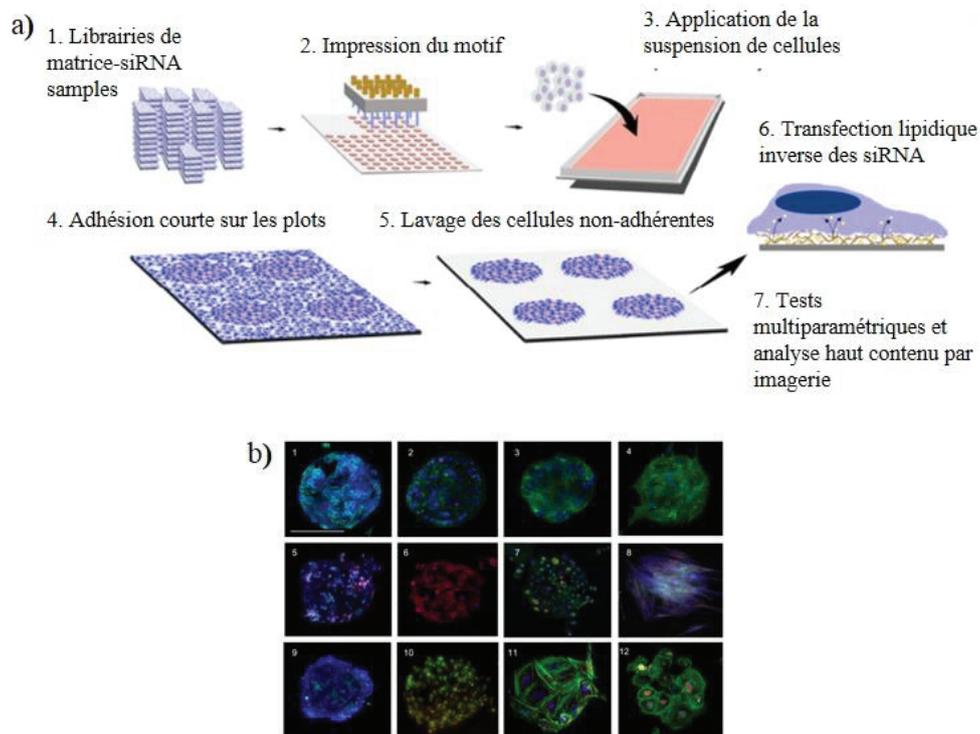


Figure 16 : a) Principe du Cell Spot Microarray (CSMA) développé par Rantala *et al.*, b) Images de microscopie de fluorescence de spots de 200  $\mu\text{m}$  de diamètre montrant la transfection parallèle de plusieurs types cellulaires en utilisant le CSMA (Rantala *et al.*, 2011)

Il est habituellement nécessaire de maintenir une distance de 500  $\mu\text{m}$  ou plus entre deux micro-spots sur une puce à cellules transfectées (Erfle *et al.*, 2007). Pour augmenter la densité de ces micro-spots, des percées technologiques sont nécessaires pour empêcher la migration des cellules et limiter la diffusion du matériel déposé entre les micro-spots sur la puce. La micro-structuration d'un support en verre par la génération de surfaces hydrophiles et hydrophobes est très efficace pour la régulation de l'adhésion cellulaire et la prévention de la migration des cellules entre les spots (Hook *et al.*, 2009). Fujita *et al.* ont développé une puce à cellules transfectées à haute densité (TCM). Pour créer cette biopuce, ils ont utilisé une imprimante jet d'encre pour déposer un mélange de plasmide, de protéines de la matrice extra-cellulaire et d'autres réactifs afin d'induire la transcription inverse sur un support

en verre qui a été précédemment greffé avec du PEG. Les micro-spots contenant la matrice extracellulaire sont séparés les uns des autres par une barrière hydrophobe générée par le PEG, qui a prouvé être très efficace pour éviter la migration des cellules et la contamination croisée des réactifs entre spots adjacents (Figure 17). La puce à cellules transfectées la plus dense qu'ils aient réalisée comporte des spots de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre espacés de 150  $\mu\text{m}$  (Fujita *et al.*, 2013).

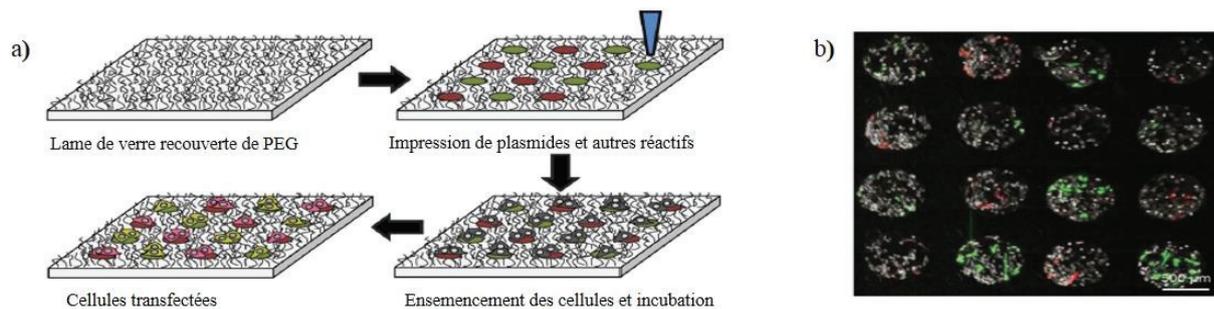


Figure 17 : a) Illustration schématique de la puce à cellules transfectées « super dense » (TCM) développée par Fujita *et al.*, b) Images en contraste de phase et fluorescence des constructions obtenues avec le TCM (Fujita *et al.*, 2013).

Pour améliorer l'efficacité de transcription inverse et prévenir la diffusion de spot à spot, la distance entre les différents groupes de transfection a été ajustée et différents matériaux de revêtement du verre ont été utilisés (Hodges *et al.*, 2005; Peterbauer *et al.*, 2006). Cependant ces méthodes ont toujours comme limitations un coût élevé en matériel de revêtement et des étapes expérimentales complexes. Dans leur étude, Oh *et al.* ont utilisé des micropuits en polyéthylène glycol diacrylate (PEGA) pour générer des régions d'adhésion de cellules spatialement séparées et ont appliqué cette technique à la culture cellulaire et aux plateformes de transfection inverse pour du criblage cellulaire à haut-débit. Pour la première fois, des récepteurs olfactifs ont été exprimés simultanément en utilisant cette méthode. La réponse à des molécules odorantes a été détectée par des analyses de fluorescence dans les micropuits en utilisant le rapporteur élément de réponse cAMP (CRE) (Oh *et al.*, 2014).

D'autre part, il est possible d'utiliser des techniques de microstructuration topographique du substrat afin de diminuer les risques de diffusion inter-plots lors de la transfection *in situ*. Une de ces techniques

a été présentée par Denoual *et al.* et consiste à manufacturer un substrat en plastique par moulage sous vide afin de créer une matrice de 2025 micropuits pyramidaux avec une périodicité de 300  $\mu\text{m}$  pouvant contenir 30-50 cellules. La biopuce ainsi créée a permis la transfection parallèle de cellules HEK293T par deux plasmides codant pour des protéines fluorescentes (eGFP et DsRed2) sans contamination croisée (Denoual *et al.*, 2006).

Récemment, Yamaguchi *et al.* ont développé une nouvelle technique pour construire des biopuces de cellules de mammifères transfectées sur ou dans des hydrogels de matrice extra-cellulaire par impression par transfert de surfaces de motifs PEG-oléyl. Une solution mixte de petits ARN interférents (siRNA) et de réactif de transfection a été déposée sur une lame de verre recouverte de PEG-oléyl en utilisant une imprimante jet d'encre et les cellules ont ensuite été transitoirement immobilisées sur les matrices de mélanges de transfection. Après avoir superposé une feuille d'hydrogel de matrice extra-cellulaire sur les cellules immobilisées, les cellules serrées entre la lame de verre et la feuille d'hydrogel sont incubées à 37°C pour 1) la transfection de siRNA dans les cellules et 2) l'adhésion des cellules à la feuille d'hydrogel (Figure 18) (Yamaguchi *et al.*, 2013).

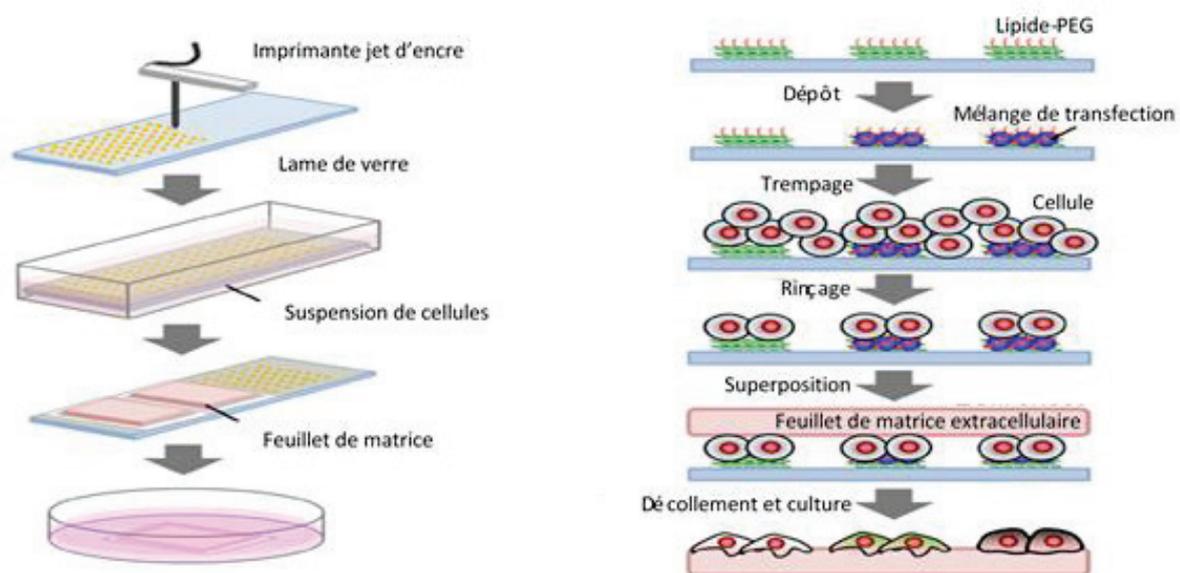


Figure 18 : Transfection inverse par la technique d'impression par transfert décrite par Yamaguchi *et al.*, 2013.

Ces résultats indiquent que la transfection sur une puce à cellules ou dans une matrice biologique est une technique prometteuse pour le criblage à haut-débit de gènes associés à des maladies par l'observation directe des phénomènes cellulaires dans un environnement physiologiquement pertinent.

## 5.2. DÉPOSITION ÉLECTRIQUE DES CELLULES

Les propriétés électrocinétiques des cellules vivantes peuvent être utilisées pour les matricer sur un support précis par déposition électrophorétique (DEP), technique qui manipule et dépose des particules dans un champ électrique. Cette méthode est un des procédés colloïdaux utilisés dans la production de céramique (Besra *et al.*, 2007). Le mouvement des particules peut être induit soit par un courant alternatif soit par un courant continu, résultant respectivement en champs électriques alternatifs ou constants. Les avantages principaux de la déposition électrophorétique sont : un court temps de formation, une restriction minimale sur la forme du support, la capacité de régler précisément les forces influençant les particules, un contrôle aisé de la morphologie du film déposé et la simplicité de l'équipement (Velev *et al.*, 2006). Cependant cette technique est pour l'instant utilisée uniquement pour des cellules bactériennes (Seuss *et al.*, 2013).

## 5.3. ENCAPSULATION ET IMMOBILISATION DE CELLULES

Une des méthodes les plus couramment utilisées pour immobiliser des cellules vivantes sur un support solide est l'encapsulation dans un hydrogel (Hernandez *et al.*, 2010). Les hydrogels peuvent être définis comme des polymères biocompatibles contenant beaucoup d'eau. La viabilité et l'activité des cellules peuvent être affectées par la préparation de l'hydrogel et le piégeage des cellules. C'est pourquoi les conditions nécessaires à la formation du gel doivent être suffisamment douces afin de préserver la viabilité et l'activité des cellules.

### 5.3.1. LES HYDROGELS

Les matériaux adaptés pour l'encapsulation de cellules doivent mimer la matrice extracellulaire et doivent être traités sous des conditions compatibles avec la présence de cellules. Une grande partie de ces matériaux sont dérivés de polymères naturels qui forment des hydrogels. Les hydrogels sont des matériaux très hydratés composés de polymères hydrophiles qui sont réticulés pour former un réseau tridimensionnel. Ce sont des structures souples, très poreuses, qui une fois implantées, induisent une faible adsorption de protéines à cause de la faible tension inter faciale avec les fluides environnants (Uludag *et al.*, 2000). Les hydrogels dérivés des matériaux naturels ont une structure similaire à la matrice extracellulaire de nombreux tissus humains. Certains d'entre eux sont abondants (*e.g.* les sources marines (Silva *et al.*, 2012)) et peuvent souvent être traités dans des conditions douces compatibles avec la survie des cellules (Malafaya *et al.*, 2007). Une fois formé, l'hydrogel pourra présenter différentes porosités en fonction de sa structure, sa composition chimique et de son degré de réticulation. Cet aspect est crucial dans la détermination de la capacité des cellules à obtenir des nutriments et à éliminer les déchets qui influencent directement la survie ou la mort cellulaire. En effet, la matrice d'hydrogel peut agir comme barrière mécanique et/ou chimique pour l'entrée et la sortie de molécules. L'oxygène, les molécules de signalisation, les nutriments cellulaires et les métabolites doivent pouvoir diffuser à travers la matrice sans être bloqués. De plus, la survie cellulaire à l'intérieur de la matrice dépend de sa capacité à fournir des nutriments et éliminer les métabolites, générant différents gradients de concentration à partir du bord. Les cellules qui sont loin du bord de la matrice recevront une quantité plus faible de nutriments en un temps donné. Cela veut dire qu'un faible taux de transfert de nutriments peut être suffisant pour les cellules proches du bord externe mais pas pour celles au milieu de la matrice. Aussi, si une forte densité de cellules piégées est requise, un taux de transfert de nutriments élevé est aussi nécessaire pour les sustenter. Ces observations suggèrent que les microbilles avec une surface élevée par rapport au volume peuvent apporter de meilleures conditions pour permettre la survie cellulaire (Schrezenmeir *et al.*, 1994). Typiquement, la taille limite pour ces billes est de l'ordre de 400  $\mu\text{m}$  de diamètre, deux fois la distance maximale de diffusion de l'oxygène et des nutriments des vaisseaux sanguins aux cellules (de Vos *et al.*, 2006).

#### 5.3.1.1. LE POLYACRYLAMIDE

Un des premiers hydrogels utilisés pour l'encapsulation de cellules sur une puce était le polyacrylamide (Fesenko *et al.*, 2001). Des souches de *E. coli* ont été suspendues dans de l'acrylamide puis appliquées en tant que nano gouttes, chacune contenant de  $10^4$  à  $10^5$  cellules sur un support en verre, puis polymérisées sous nitrogène en présence de vapeurs de TEMED. La majorité des cellules immobilisées est restée viable pendant 15-18 jours dans un milieu stérile à 4°C. Bien que démontrant la capacité à contenir des cellules confinées sur une surface, cette approche est entravée par la toxicité de l'acrylamide.

#### 5.3.1.2. LES CARBOHYDRATES

##### 5.3.1.2.1. L'ALGINATE

Une autre matrice utilisée pour encapsuler des cellules est l'alginate de sodium. Il est non toxique et ses conditions de polymérisation assez douces permettent l'encapsulation de divers types cellulaires et en font le biomatériau le plus utilisé pour l'encapsulation de cellules vivantes. L'alginate est un polysaccharide formé de blocs d'acides D-mannuroniques et d'acides L-guluroniques liés en  $\beta$ -(1-4). Les propriétés physico-chimiques des solutions et des gels d'alginate en milieux aqueux dépendent de leur structure, c'est-à-dire de la proportion de résidus mannuroniques par rapport aux résidus guluroniques (rapport noté M/G) ainsi que du nombre et de la longueur des blocs MM, GG et MG. L'alginate ne fournit pas de motifs d'adhésion cellulaires mais il peut être conjugué au peptide RGD pour améliorer l'adhésion cellulaire (Yu *et al.*, 2009).

L'alginate est caractérisé par une vaste distribution de la taille des pores qui peuvent aller de 5 nm à 200 nm (Smidsrod *et al.*, 1990). La perméabilité de l'alginate est fortement influencée par la concentration et la nature des ions réticulants, de fortes concentrations en ions créent des structures serrées (spécialement dans la partie externe du gel en contact direct avec le bain durcisseur) et par conséquent diminue le taux de diffusion des grosses molécules à l'extérieur du gel (Tanaka *et al.*, 1984; Aslani *et al.*, 1996). Au contraire, lorsque le bain durcisseur est constitué de sels ayant une faible

solubilité dans l'eau (*e.g.* CaCO<sub>3</sub>), la structure qui est formée est plus uniforme et l'hydrogel a une meilleure stabilité mécanique (Kuo *et al.*, 2001).

La cinétique de dissolution des gels d'alginate *in vivo* dépend de la composition G / M et est conduite par l'échange d'ions réticulants avec des cations monovalents des fluides environnants. Une fois déliée, la chaîne de polymère ne peut pas être dégradée par l'activité biologique de son hôte. La dissolution des gels d'alginate *in vitro* peut être obtenue par l'échange d'ions avec le tampon (*e.g.* PBS sans calcium ni magnésium) ou en utilisant des agents chélatants tels que l'EDTA ou le citrate de sodium.

Grâce à leurs propriétés non adhésives et de dissolution, les hydrogels d'alginate ont récemment été utilisés pour fabriquer des hydrogels commutables dans lesquels l'alginate est mélangé à des matrices d'adhésion cellulaire comme le collagène. Dans ces constructions, l'alginate agit comme auto-renouvellement de substrat permissive pour des cellules souches humaines pluripotentes et, quand nécessaire, il peut être enlevé de la matrice permettant ainsi la différenciation des cellules sur le substrat de collagène (Gillette *et al.*, 2010; Dixon *et al.*, 2014).

L'alginate est ainsi de loin le matériel le plus utilisé pour l'encapsulation de cellules et a été adopté pour de nombreuses applications biomédicales (Murua *et al.*, 2008).

#### 5.3.1.2.2. L'AGAROSE

L'agarose est un polysaccharide dérivé de la paroi cellulaire d'un groupe d'algues rouges (Rhodophyceae). La structure principale de l'agarose est constituée d'unités alternées de β-D-galactopyranose et de 3,6-anhydro-α-L-galactopyranose. L'agarose est un polymère sensible et ses solutions aqueuses peuvent subir une transition sol-gel par refroidissement. L'agarose peut être utilisé pour l'encapsulation de cellules puisque cette transition a lieu à environ 37°C. La transition thermique sol-gel de l'agarose est réversible (Indovina *et al.*, 1979). La taille moyenne des pores des hydrogels d'agarose, et par conséquent les propriétés de transport de masse, sont influencées par la concentration du polymère en solution et par la température.

Par ailleurs, l'agarose ne fournit pas de motifs d'adhésion aux cellules et ne permet pas l'interaction entre des cellules adhérentes et la matrice (Tang *et al.*, 2007). Cependant il est possible de

supplémenter l'agarose avec des molécules d'adhésion de la matrice extracellulaire comme la fibronectine (Karoubi *et al.*, 2009) ou le peptide soluble RGD (Guaccio *et al.*, 2008).

Les hydrogels d'agarose ont particulièrement été étudiés pour la réparation du cartilage *in vitro* (Benya *et al.*, 1982). Ils supportent les chondrocytes en culture jusqu'à six semaines (Hung *et al.*, 2003). Cependant, la faible biodégradabilité de l'agarose par les cellules de mammifères inhibe le processus spontané de réparation *in vivo* (Hunziker, 2002).

#### 5.3.1.2.3. LE CARRAGHÉNANE

Le carraghénane est un polysaccharide anionique dérivé de l'algue rouge Rhodophyceae par extraction alcaline. C'est un galactane, comme l'agarose, et il est composé d'une séquence répétée de  $\beta$ -D-galactose et  $\alpha$ -D-galactose avec des proportions variables de groupes sulfate. Les carraghénanes disponibles commercialement peuvent être divisés en trois familles basées sur la position et le nombre de groupe sulfate :  $\kappa$ -carraghénane,  $\iota$ -carraghénane et  $\lambda$ -carraghénane, portant respectivement 1, 2 et 3 groupes sulfate (Campo *et al.*, 2009). Les solutions aqueuses de  $\kappa$ -carraghénane et de  $\iota$ -carraghénane peuvent former réversiblement des hydrogels en présence de cations, alors que le  $\kappa$ -carraghénane et le  $\iota$ -carraghénane ne subissent pas de transition sol-gel. Les hydrogels préparés en utilisant le  $\iota$ -carraghénane sont plus mous et plus déformables que ceux préparés à partir de  $\kappa$ -carraghénane (Michel *et al.*, 1997).

Malgré l'utilisation vaste et documentée de ce polymère comme inducteur de l'inflammation chronique et aigue (Dirosa, 1972; Loram *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2009), il n'y a pas de consensus sur son effet dans la réponse inflammatoire de l'hôte quand le carraghénane utilisé a été nouvellement purifié (Popa *et al.*, 2014). Les hydrogels de  $\kappa$ -carraghénane et de  $\iota$ -carraghénane ont aussi été utilisés pour l'encapsulation de cellules par réticulation ionique (Rocha *et al.*, 2011) et par la formation de complexes avec des polycations comme le chitosane (Luna *et al.*, 2010).

Tout comme l'alginate, la dégradation des hydrogels de carraghénane est conduite par l'échange d'ions avec les fluides environnants, alors que seulement quelques bactéries peuvent produire l'enzyme qui clive les chaînes du polymère (Guibet *et al.*, 2007).

#### 5.3.1.2.4. LE CHITOSANE

Le chitosane est un polysaccharide dérivé de la chitine, polymère naturel synthétisé par de nombreuses espèces comme composant de leur exosquelette (Rinaudo, 2006). La chitine est composée de chaînes de N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine arrangées en structures semi-cristallines.

En tant que polycation, le chitosane a été largement utilisé dans la technique de couche par couche qui permet l'assemblage de multiples couches fines de films faits de polymères de charge opposée (Martins *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2011). En fait, le chitosane peut facilement former des complexes poly-électrolytes avec d'autres poly-anions comme l'alginate (Costa *et al.*, 2011a), la pectine (Puga *et al.*, 2013), l'élastine (Costa *et al.*, 2013b) et l'ADN (Liu *et al.*, 2005). Par exemple, des multicouches de chitosane/alginate ont été utilisées comme alternative à la poly-L-lysine pour enrober des billes d'alginate, produisant un noyau qui peut être liquide (Correia *et al.*, 2013a; Correia *et al.*, 2013b). La capacité du chitosane à former des complexes avec des poly-anions est influencée par le degré de désacétylation car, en enlevant les groupes acétyl, plus de groupes amine libres peuvent participer à la formation du complexe (Lee *et al.*, 1997). Le degré de désacétylation influence donc les propriétés physique, mécanique et biologique du chitosane. Cependant, Chatelet *et al.* ont rapporté que le degré de désacétylation n'a pas d'influence significative sur la cytocompatibilité *in vitro* de films de chitosane sur les kératinocytes et les fibroblastes mais joue un rôle important dans l'adhésion et la prolifération de ces deux lignées cellulaires (Chatelet *et al.*, 2001).

Avec l'addition de sels de phosphate en solution, le chitosane devient soluble à un pH physiologique et devient thermosensible, formant un gel à des températures physiologiques (Chenite *et al.*, 2000; Couto *et al.*, 2009).

#### 5.3.1.2.5. L'ACIDE HYALURONIQUE

L'acide hyaluronique est présent dans tous les organismes vivants et dans la plupart des tissus conjonctifs (Laurent *et al.*, 1992). C'est un polysaccharide linéaire anionique comprenant l'acide 1,3- $\beta$ -D-glucuronique et la 1,4- $\beta$ -N-acetyl-D-glucosamine, une structure conservée chez tous les mammifères (Chen *et al.*, 1999).

Le polymère doit être modifié chimiquement pour former un hydrogel. La procédure peut impliquer la modification du groupe carboxyle ou du groupe hydroxyle par estérification et réticulation avec, par exemple, le glutaraldéhyde, le carbodiimide ou le divinyle sulfone (Collins *et al.*, 2007). Pour l'encapsulation de cellules, le polymère peut être traité avec du méthacrylate anhydre pour obtenir de l'acide hyaluronique méthacrylaté, un polymère photo-réticulable (Smeds *et al.*, 2001).

L'acide hyaluronique ne favorise pas l'adhésion cellulaire mais il peut être modifié afin d'incorporer des motifs d'adhésion comme le RGD (Park *et al.*, 2003). L'acide hyaluronique est utilisé pour l'encapsulation de toutes les lignées cellulaires dont la matrice extracellulaire est riche en glycosaminoglycanes ou en acide hyaluronique lui-même. Par exemple, l'acide hyaluronique a été très étudié pour l'ingénierie tissulaire du cartilage, démontrant sa capacité à supporter la différenciation des chondrocytes de cellules souches mésenchymateuses (Chung *et al.*, 2009) et la formation de matrice cartilagineuse (Kim *et al.*, 2011). Un autre champ important d'application de ce polymère est l'ingénierie de tissu neural car l'acide hyaluronique joue un rôle important dans le développement du système nerveux central, dans la régénération nerveuse, l'activation des astrocytes et la prolifération après une blessure de la moelle épinière (Struve *et al.*, 2005).

### 5.3.1.3. LES PROTÉINES

#### 5.3.1.3.1. LE COLLAGÈNE ET LA GÉLATINE

Le collagène est la protéine la plus abondante chez les humains et le composant principal de la matrice extracellulaire de nombreux tissus (Pachence, 1996). Parmi tous les types de collagène existants, le collagène de type I est le plus abondant et est extrait des tissus (ligaments, peau) par traitements enzymatiques et acides (Ber *et al.*, 2005). Le collagène s'auto-assemble pour former un hydrogel lorsque le pH de la solution est neutralisé (*e.g.* avec du NaOH) et chauffée à une température physiologique (Xu *et al.*, 2009).

Pour l'encapsulation de cellules, les cellules peuvent être mélangées avec une solution de collagène neutralisée et la suspension peut être placée dans un incubateur. Le collagène contient plusieurs motifs d'adhésion tels que RGD.

Le collagène peut être rapidement biodégradé chez les mammifères par des collagénases et des métalloprotéinases pour produire les acides aminés correspondants. Le taux de dégradation peut être contrôlé par traitement enzymatique ou réticulation chimique (Weadock *et al.*, 1996).

Du fait que le collagène soit le composant principal de la matrice extracellulaire de nombreux tissus, il a trouvé de nombreuses applications potentielles en ingénierie tissulaire (Lee *et al.*, 2001) comme la réparation du cartilage (Sams *et al.*, 1995), les thérapies basées sur les cellules souches mésenchymateuses (Chan *et al.*, 2007) et la régénération osseuse (Sittinger *et al.*, 2004) par exemple. La triple hélice de collagène peut être séparée en trois molécules pour obtenir de la gélatine (Kuijpers *et al.*, 1999). Deux types différents de gélatine peuvent être obtenus par traitement du collagène : un premier qui est le résultat de l'hydrolyse des groupes amides de l'asparagine et de la glutamine en acides carboxyliques, alors que le second est le résultat d'un traitement acide. Les acides carboxyliques rendent la gélatine chargée négativement (Young *et al.*, 2005).

La gélatine est thermosensible, subissant une transition sol-gel réversible par refroidissement d'une solution aqueuse du polymère à une température inférieure à 35°C. L'hydrogel peut être liquéfié par chauffage à une température physiologique. Cette propriété a été exploitée pour fabriquer des hydrogels (structure cœur/enveloppe) avec un cœur en gélatine qui « fond » une fois placé dans des conditions physiologiques (Sakai *et al.*, 2011) ou pour fabriquer des assemblages poreux incorporant des cellules avec des billes de gélatine agissant comme porogènes (Hwang *et al.*, 2010). La gélatine peut être modifiée chimiquement pour encapsuler des cellules de façon à ne pas se liquéfier à une température physiologique. Par exemple, des groupes méthacrylates peuvent être ajoutés à la chaîne latérale de la gélatine, résultant en une gélatine-méthacrylamide photo-réticulable (Van den Bulcke *et al.*, 2000).

#### 5.3.1.3.2. LA FIBRINE

La fibrine est un composant majeur de la coagulation sanguine et un régulateur majeur de la cicatrisation des plaies. C'est un polymère similaire au collagène, formé par la polymérisation enzymatique de la protéine fibrinogène en présence de thrombine (Mosesson, 2005). Le fibrinogène est une glycoprotéine de 340 kDa soluble dans l'eau, comprenant deux sous-unités de trois chaînes

polypeptidiques liées ensemble par des ponts disulfures. La thrombine catalyse le clivage des fibrinopeptides formant ainsi des monomères de fibrine (Weisel, 2005). Ce clivage a lieu dans la partie centrale N-terminale du fibrinogène exposant les sites de fixation « A-knobs » et « B-knobs » (Litvinov *et al.*, 2005). Ces sites interagissent avec les « A-holes » et « B-holes » présents à la fin des molécules de fibrinogène formant ainsi des fibres de fibrine insolubles. La ramification de ces fibres résulte en un réseau tridimensionnel de fibrine. La formation du gel et ses propriétés mécaniques sont influencées par la concentration du fibrinogène et de la thrombine (Rowe *et al.*, 2007). Des concentrations plus faibles de thrombine et de fibrinogène conduisent à la formation de gels plus compacts, avec des fibres plus fines et de meilleures propriétés mécaniques. De plus, quand la fibrine est utilisée comme matrice pour encapsuler des cellules souches, les concentrations de thrombine et de fibrinogène peuvent influencer leur taux de prolifération et leur différenciation.

Catelas *et al.* ont montré que les formulations contenant une faible concentration en fibrinogène (5 mg/mL) peuvent supporter la croissance des cellules souches mésenchymateuses humaines alors qu'une concentration plus élevée (50 mg/mL) augmente le potentiel de leur différenciation en ostéoblastes (Catelas *et al.*, 2006).

Chez les mammifères, la fibrine peut être dégradée rapidement dû à la présence d'enzymes protéolytiques (fibrinolyse). En fait, pendant la cicatrisation, la fibrine est graduellement dégradée et remplacée par de la matrice extracellulaire mature. La cinétique de dégradation de la fibrine peut être contrôlée par des inhibiteurs de protéases tels que l'aprotinine (Ye *et al.*, 2000; Lorentz *et al.*, 2011). Une suspension de cellules dans un mélange de fibrinogène et de thrombine peut être injectée directement pour former un hydrogel de fibrine *in situ*. Cette approche particulière a trouvé de nombreuses applications en ingénierie tissulaire, spécialement en thérapie cellulaire pour empêcher la rétention cellulaire après une transplantation (Christman *et al.*, 2004).

#### 5.3.1.3.3. L'ÉLASTINE

Les fibres élastiques sont présentes dans tous les types de tissus qui requièrent la récupération de leur forme initiale après déformation, tels que la peau, les ligaments et les vaisseaux sanguins. Les composants principaux de ces fibres sont l'élastine et les microfibrilles. L'élastine est une protéine

formée par la polymérisation de la tropoélastine dans un processus appelé l'élastogenèse (Wise *et al.*, 2009). L'élastine peut être extraite des tissus par traitements alcalins poussés mais le rendement est souvent faible. Typiquement, des polypeptides *elastin-like* synthétiques (ELR) sont utilisés. Les membres les plus étudiés de la famille des ELR sont basés sur le pentapeptide VPGVG, la séquence la plus abondante dans l'élastine humaine naturelle (Betre *et al.*, 2002). Les ELRs sont thermosensibles et subissent une transition sol-gel réversible par chauffage. Sous la température de transition, ils ont une conformation *random coil* et en chauffant, la chaîne se replie formant une structure ordonnée régulière en  $\beta$ -spirale stabilisée par les interactions hydrophobes. La température de transition est influencée par le poids moléculaire, la concentration dans la solution et la composition en acides aminés mais peut être facilement contrôlée pour se trouver entre la température ambiante et la température physiologique. De plus, des séquences de biodégradation (séquences peptidiques reconnues par les protéases de la matrice) (Garcia *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2012) ou des motifs d'adhésion cellulaire peuvent être ajoutés sur la chaîne polypeptidique (Costa *et al.*, 2009). Par exemple, un ELR chargé négativement contenant le motif RGD a été produit par Costa *et al.* pour fabriquer des microcapsules avec une technique couche par couche en utilisant le chitosane comme polycation (Costa *et al.*, 2011b; Costa *et al.*, 2013a).

Nom	Source	Type	Gélation	Biodégradable par les cellules de mammifères
Alginate	algue	polysaccharide	ionotropique	non
Agarose	algue	polysaccharide	thermosensible	non
Carraghénane	algue	polysaccharide	thermosensible/ ionotropique	non
Chitosane	crustacés	polysaccharide	ionotropique	oui
Acide hyaluronique	MEC	polysaccharide	thermosensible / Photosensible (après modifications chimiques)	oui
Collagène	MEC	protéine	thermosensible/ variation de pH	oui
Gélatine	MEC/collagène	protéine	thermosensible	oui
Fibrine	sang	protéine	enzymatique	oui
Elastine	MEC/synthétique	protéine	thermosensible	oui

Tableau 3 : Résumé des propriétés de certains hydrogels présentés ci-dessus.

### 5.3.2. LES techniques d'encapsulation

#### 5.3.2.1. L'EXTRUSION

La méthode la plus simple pour encapsuler des cellules dans des billes d'hydrogel est par égouttement gravitationnel. Une suspension de précurseur d'hydrogel et de cellules est extrudée à travers un tube (*i.e.* une aiguille), la goutte se développe et, lorsqu'elle atteint une masse critique, tombe librement dans un bain de durcissement adapté. Selon Poncelet *et al.* (Poncelet *et al.*, 1999), le diamètre final de la capsule est influencé par la densité de la solution, la tension de surface de la goutte et le diamètre de la goutte pendante (approximativement le diamètre externe de l'aiguille). Cette méthode permet généralement la formation de capsules d'un diamètre supérieur à 1 mm et, à cause de l'impact dans le bain, elles ne sont pas toujours sphériques. Lorsque l'extrusion est faite directement dans un bain de durcissement sans aucune entrée d'air, les forces de cisaillement inter-faciales sur la goutte au

bout de l'aiguille inhibent sa croissance. Cette technique produit des fibres et est appelée filage humide.

Popa *et al.* ont comparé les deux techniques et ont montré que les billes fabriquées par égouttement sont au moins deux fois plus grosses que les fibres humides (Popa *et al.*, 2011).

Des billes plus petites peuvent être obtenues par différentes méthodes ayant pour but de casser le jet. Une de ces méthodes est par flux d'air coaxial, où un gaz comprimé est forcé autour de la goutte extrudée et les contraintes de cisaillement appliquées par le gaz entraînent le détachement de la goutte avant qu'elle n'ait pu tomber par gravité. Un flux plus fort de gaz produit des billes plus petites alors qu'une plus forte viscosité de la solution a un effet stabilisant résultant en des billes plus grosses (Lasheras *et al.*, 2000). En utilisant ce type d'encapsulateur, Zhou and Xu ont encapsulé avec succès des cellules souches mésenchymateuses de moelle épinière dans un mélange d'alginate oxydé et de fibrine (Zhou *et al.*, 2011).

Un encapsulateur co-axial peut aussi être utilisé avec un liquide à la place du gaz pour casser la goutte. Sakai *et al.* ont utilisé ce type de d'appareil pour piéger des cellules dans une capsule multi-couches composée de dérivé phénolique d'alginate et de cellulose. Le liquide d'extrusion était une suspension de ces polymères, de peroxydase de Raifort et de cellules. Dans ce cas, le fluide externe était de la paraffine liquide qui contenait du peroxyde d'hydrogène pour permettre la réticulation enzymatique de la suspension de cellules (Figure 19) (Sakai *et al.*, 2009).

Des microbilles peuvent aussi être obtenues en appliquant un potentiel électrique à une extrudeuse métallique. Cette technique, communément appelée bio-électropulvérisation, consiste à pulvériser une solution de polymère pompée à travers une aiguille connectée à un générateur haute tension (Xie *et al.*, 2007). La solution à la pointe de l'aiguille réagit en présence de la charge électrique par accumulation de charges de signes opposés à sa surface. Gasperini *et al.* ont utilisé cette technique à partir d'une suspension de cellules murines B50 et d'alginate. Les gouttelettes chargées de cellules du jet ont été collectées dans un bain de calcium agissant comme agent durcisseur. Ils ont montré que, par augmentation de la concentration de cellules dans la suspension, des tensions appliquées plus fortes sont nécessaires pour initier l'éjection (Gasperini *et al.*, 2013).

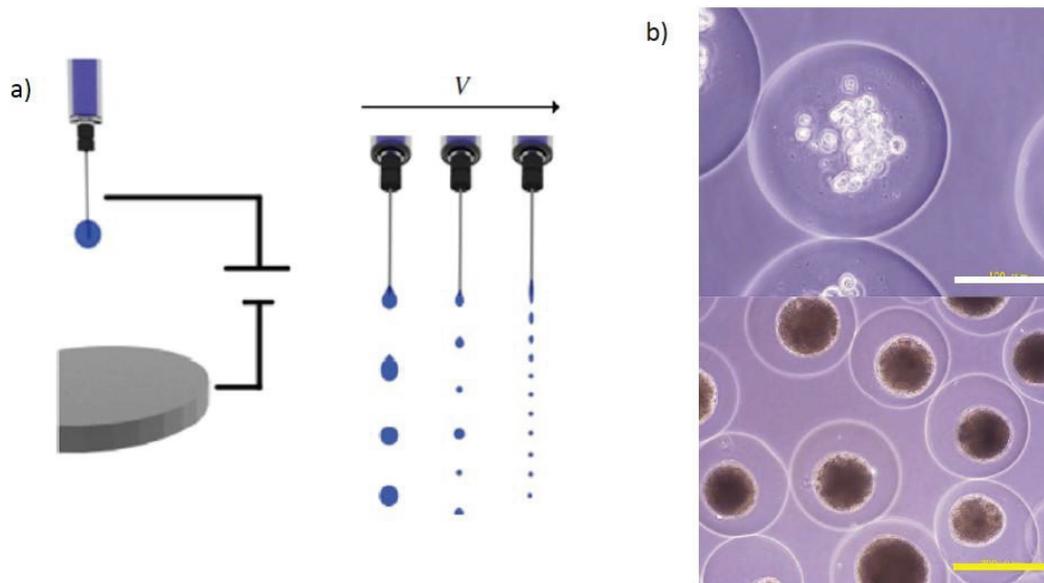


Figure 19 : a) Schéma de l'encapsulation par bio-électropulvérisation. En augmentant la tension, la taille des gouttelettes éjectées diminue, b) Cellules HepG2 encapsulées dans des billes d'alginate juste après l'encapsulation (en haut) et après 27 jours (en bas) (la barre d'échelle blanche représente 100  $\mu\text{m}$ , la barre d'échelle jaune représente 200  $\mu\text{m}$ ) (d'après Sakai *et al.*, 2009).

### 5.3.2.2. LA LITHOGRAPHIE

Deux techniques de lithographie sont utilisées pour l'encapsulation de cellules : la lithographie douce et la photolithographie (Selimovic *et al.*, 2012).

La lithographie douce a été adoptée par Khademhosseini *et al.* pour encapsuler des cellules NIH-3T3 dans de l'acide hyaluronique photo-réticulable en utilisant une réplique de PDMS. Ils ont rempli les vides de la réplique en la pressant sur une suspension de cellules, puis la réplique est déplacée sur un support de verre acrylé et exposé aux UV. Après 6h, environ 85% des cellules étaient viables et après 5 jours, les cellules ont commencé à émerger de l'hydrogel (Figure 20-a) (Khademhosseini *et al.*, 2006). La photolithographie a aussi été utilisée pour encapsuler des cellules NIH-3T3 par Shin *et al.* dans des hydrogels hybrides de gélatine photo-réticulable et d'oxyde de graphène sur des lames de verre recouvertes par du polyéthylène glycol diacrylate (Figure 20-b). Ils ont optimisé le processus de photo-réticulation en augmentant le temps d'exposition quand une forte concentration d'oxyde de graphène

est présente dans le gel. Les hydrogels hybrides ont démontré la force mécanique modulable et ont inhibé les propriétés électriques. Les gels ont supporté la diffusion des cellules en augmentant leur viabilité et leur prolifération (Shin *et al.*, 2013).

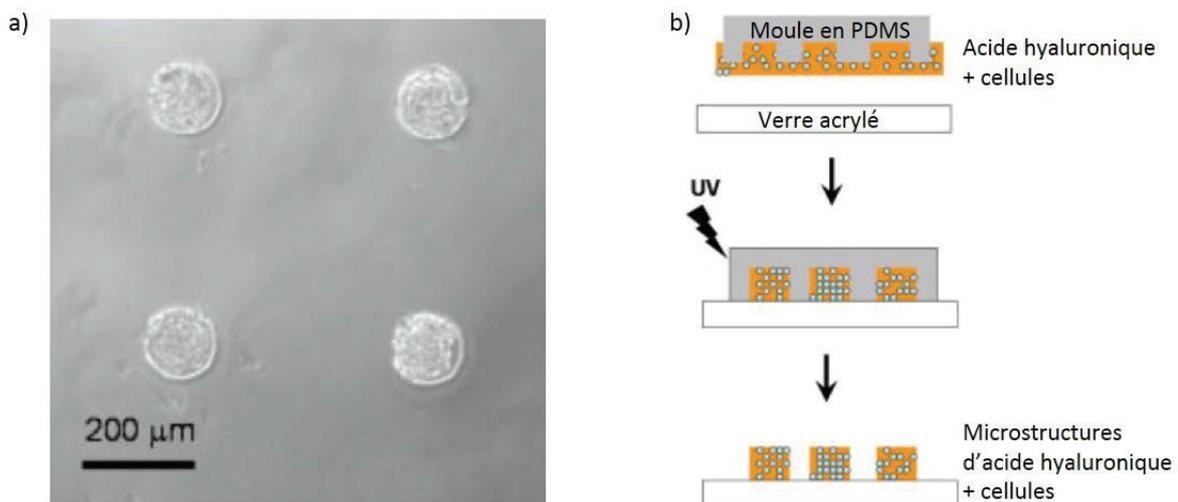


Figure 20 : a) Schéma représentant la technique de lithographie douce utilisée pour encapsuler des cellules dans de l'acide hyaluronique, b) Image en microscopie optique des microstructures d'acide hyaluronique contenant des cellules obtenues par photolithographie (Khademhosseini *et al.*, 2006).

### 5.3.2.3. L'ÉMULSION

La préparation d'objets sphériques par des techniques basées sur l'émulsion a été très utilisée dans l'industrie pharmaceutique (Lima *et al.*, 2012). L'encapsulation par émulsion est habituellement obtenue par dispersion d'un précurseur d'hydrogel dans une phase non-miscible. Des surfactants peuvent être utilisés pour stabiliser l'émulsion et obtenir des gouttes plus petites (micro-émulsions) (Elbert, 2011).

Batorsky *et al.* ont utilisé un hydrogel de collagène-agarose pour encapsuler des cellules mésenchymateuses adultes en utilisant le PDMS comme phase non-miscible. Le mélange de polymères est difficile car les deux polymères présentent une transition sol-gel à une température physiologique mais avec un comportement opposé : un est un hydrogel lorsque l'autre est un liquide. Le collagène a

été neutralisé à 4°C avec du NaOH à 37°C puis a été mélangé à l'agarose à 60°C. Le mélange a ensuite été ajouté dans un premier temps à un bain d'émulsification à 37°C, agité ensuite pendant 6 minutes puis refroidit dans un bain de glace pendant 30 minutes. Ils ont obtenu des billes d'un diamètre de 30 à 150 µm, contenant des cellules viables jusqu'à 8 jours (Batorsky *et al.*, 2005).

#### 5.3.2.4. LES SURFACES SUPERHYDROPHOBES

Une goutte d'eau placée sur une surface superhydrophobe va maintenir une forme sphérique. Les cellules peuvent être encapsulées en faisant tomber une suspension de cellules dans un précurseur d'hydrogel en solution aqueuse sur une surface superhydrophobe. Les gouttes sont durcies au contact de la surface hydrophobe tout en gardant une géométrie sphérique. De plus, il y a un bon contrôle de la taille des particules puisqu'elle est dictée par le volume de suspension distribuée (Song *et al.*, 2010). Lima *et al.* ont adopté cette technique en utilisant une suspension de chitosane thermo-sensible (solution de chitosane et de glycérophosphate) et de cellules. Les gouttes ont été placées sur une surface super hydrophobe de polystyrène et un complexe d'hydrogel a été formé par l'addition de sodium tri-polyphosphate. Lors du chauffage, à 37°C, une seconde transition sol-gel peut être observée, prédisant un effet durcisseur lorsqu'on l'expose à des conditions physiologiques. Les cellules peuvent rester viables jusqu'à 7 jours (Lima *et al.*, 2014). En utilisant cette méthode, des cellules souches mésenchymateuses ont été encapsulées dans des billes d'alginate contenant de la fibronectine (Lima *et al.*, 2013).

Nom	Contrôle de la taille	Diamètre minimum	Dispersion du diamètre des billes
Extrusion	+++	80 µm	++
Lithographie	++	50 µm	+
Emulsion	++++	10 µm	++++
Surfaces superhydrophobes	+	1000 µm	+

Tableau 4 : Comparaison de certaines caractéristiques des techniques d'encapsulation présentées ci-dessus.

#### 5.4. DÉPÔT DE CELLULES SUR UN SUPPORT FONCTIONNALISÉ

Les cellules peuvent aussi être déposées sur des surfaces de verre fonctionnalisées en utilisant des dispositifs de distribution de fluides robotisés. Avec cette stratégie il est possible de générer des matrices de cellules encapsulées dans des matrices d'hydrogel 3D (e.g. collagène ou alginate) qui supportent la croissance cellulaire à l'échelle micrométrique. Une démonstration de cette méthode a été rapportée par Lee *et al.* qui ont utilisé une lame de verre sur laquelle a été déposée par enduction centrifuge un polymère, le poly[styrene-co-maleic anhydride] (PS-MA) pour augmenter l'hydrophobicité de la surface tout en apportant des groupes fonctionnels réactifs pour attacher la matrice d'hydrogel. Pour cela, un mélange de poly-L-lysine (PLL) et de chlorure de baryum (BaCl<sub>2</sub>) est d'abord déposé de façon automatisée sur la lame de verre recouverte de PS-MA. Les charges positives de PLL servent de substrat pour attacher les ions Ba<sup>2+</sup> et assistent l'attachement de l'alginate négativement chargé. Les ions Ba<sup>2+</sup> causent aussi la gélification immédiate de l'alginate pour donner lieu à des plots 3D de matrice contenant des cellules de volume d'environ 20 nL (Lee *et al.*, 2008).

## 5.5. IMPRESSION DE CELLULES VIVANTES

La bio-impression est une technologie émergente qui souligne la tendance croissante de la fusion entre la biologie et l'ingénierie. La capacité de concevoir et de fabriquer des structures complexes en imprimant des cellules vivantes, des biomatériaux et d'autres molécules biologiques est cruciale pour la réussite de l'ingénierie tissulaire (Calvert, 2007; Guillotin *et al.*, 2011) et permet de nouvelles possibilités dans le criblage de drogues et la toxicologie (Castel *et al.*, 2006).

Une nouvelle technique pour manipuler des cellules isolées encapsulées dans des gouttelettes à l'échelle du picolitre déposées par impression jet d'encre à des positions définies a été présentée par Yusof *et al.* La manipulation de cellules isolées développée dans ce but consiste en une buse utilisée pour imprimer des cellules contenues dans des gouttelettes « à vol libre ». Un système de visualisation par ordinateur est utilisé pour détecter la cellule unique à l'intérieur du distributeur avant l'impression et des équipements automatisés permettent l'impression de gouttelettes contenant les cellules de façon organisée sur un support. Cette technique est spatialement dynamique permettant ainsi l'impression de cellules sur une large gamme de supports différents communément utilisés tels que les lames de microscopes, des membranes et des micro-plaques (Figure 21) (Yusof *et al.*, 2011).

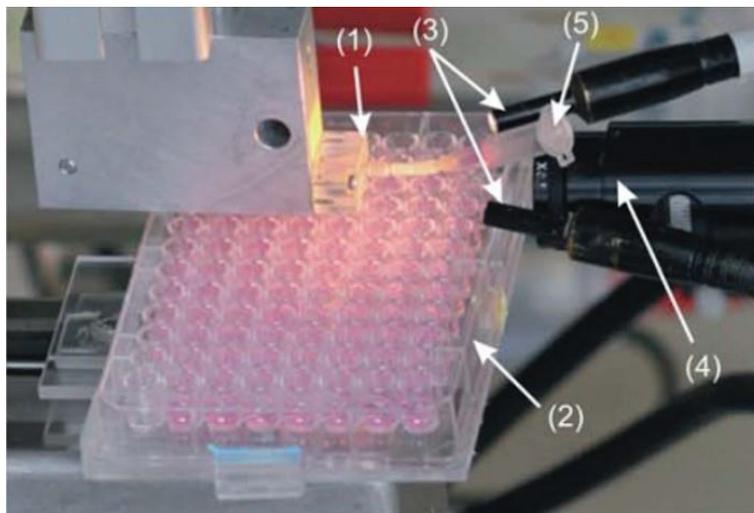


Figure 21 : Manipulateur de cellules isolées développé par Yusof *et al.* pour imprimer des cellules uniques.

*Il est constitué de (1) une tête distributrice montée sur le boîtier en aluminium contenant le système piézo-électrique, (2) le support pour l'impression des cellules (e.g. plaque 96 puits) monté sur un bras motorisé, (3) éclairage extérieur, (4) objectif d'une caméra CCD et (5) un réservoir (Yusof et al., 2011).*

#### 5.5.1. IMPRESSION JET D'ENCRE THERMIQUE

Dans les imprimantes thermiques, une impulsion d'énergie fait bouillir un liquide à la surface d'un petit appareil de chauffage, et la bulle en expansion entraîne l'éjection d'une goutte d'encre à travers la buse. La taille des gouttes varie de 10 à 150 pL en raison du gradient de température appliqué, de la fréquence de l'impulsion de courant et de la viscosité de l'encre. Les bio-encres préparées pour ce type d'impression sont généralement des solutions aqueuses afin de minimiser l'obstruction de la tête d'impression. Il est ainsi possible d'imprimer d'une à plusieurs dizaines de cellules en ajustant simplement la concentration de la bio-encre et le motif imprimé. Cette technologie a pu être utilisée pour imprimer des cellules mais aussi des tissus en médecine régénérative (Cui et al., 2012).

#### 5.5.2. IMPRESSION JET D'ENCRE PIÉZO-ÉLECTRIQUES

Dans les imprimantes jet d'encre piézo-électriques, la pulsation mécanique qui éjecte les gouttes de liquide est apportée par le mouvement d'un élément piézo-électrique en céramique.

Les têtes d'impression piézo-électriques avec plusieurs canaux sont utilisées pour des applications d'impressions complexes telles que l'impression d'hippocampes embryonnaires primaires et de neurones corticaux (Xu et al., 2005) et peuvent permettre la fabrication de constructions cellulaires à haut-débit (Roth et al., 2004). Plutôt que de développer des bio-encres qui sont appropriées pour ces systèmes, la conception de bio-encres a été focalisée sur des réactions de gélification à deux composants. Les cellules ont été mélangées à de l'alginate et imprimées avec des solutions de  $\text{Ca}^{2+}$  (Arai et al., 2011) ou mélangées avec du  $\text{Ca}^{2+}$  et imprimées soit dans une solution d'alginate soit dans une solution d'alginate/collagène (Xu et al., 2008). Cependant, ces environnements imprimés ne sont pas toujours appropriés pour tous les types de cellules et d'applications. Ferris et al. ont mis au point une bio-encre basée sur une suspension d'un nouveau microgel dans un surnageant contenant dans du milieu de

culture de tissus qui peut être utilisée pour imprimer de façon reproductible plusieurs types cellulaires différents à partir de deux systèmes d'impression à la demande différents commercialisés (système de déposition par microvalve (Deerac™, Labcyte Inc.) et tête d'impression piézo-électrique multi-canaux (Xaar-126, Xaar®)), pendant une longue période d'impression (Figure 22) (Ferris *et al.*, 2013).

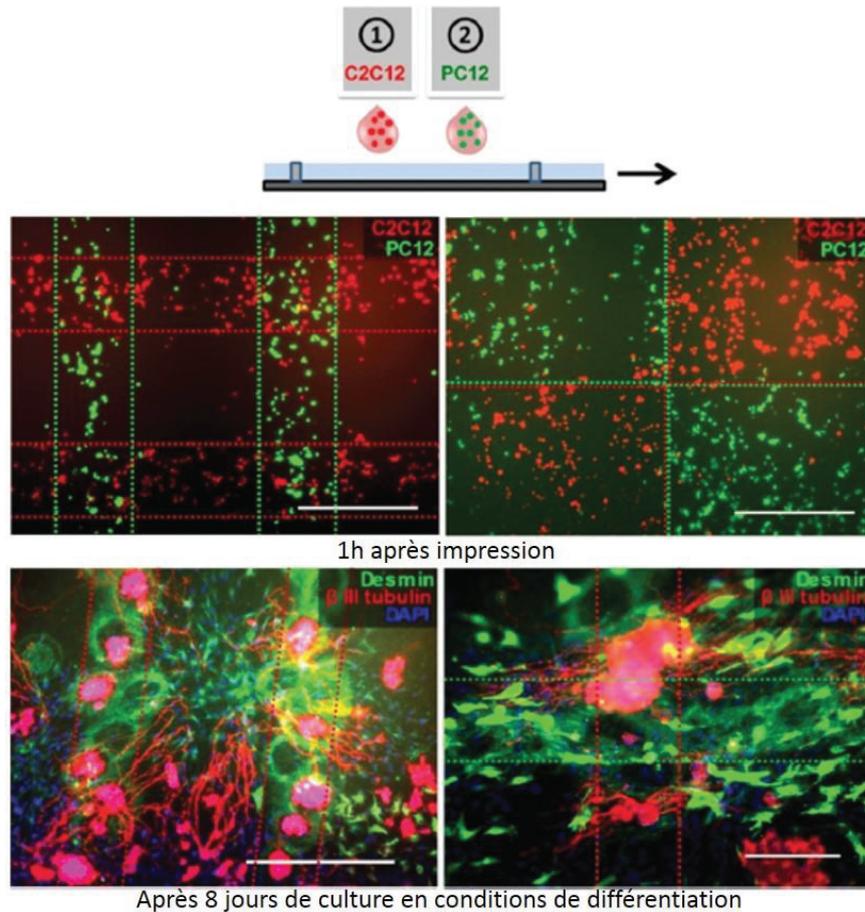


Figure 22 : Motifs de deux types cellulaires différents imprimés simultanément sur un substrat de collagène par deux têtes d'impression séparées. C2C12 (rouge) et PC12 (vert) ont été pré-marquées avec des colorants CellTracker™ et imprimées selon différents motifs (la barre d'échelle représente 500  $\mu$ m) (Ferris *et al.*, 2013).

## 5.5.3. AUTRES TYPES D'IMPRESSION JET D'ENCRE

Une nouvelle approche pour préparer des matrices de gouttelettes sessiles de culture de cellules vivantes isolées en utilisant une barrière liquide hydrophobe a été proposée pour prévenir la déshydratation des échantillons et permettre leur organisation spatiale pour des études quantitatives statistiques de cellules isolées. En déplaçant délicatement une fine couche d'huile minérale sur le support par-dessus les gouttelettes pendant l'impression, la déshydratation des gouttelettes peut ainsi être évitée et la vitalité des cellules maintenue (Figure 23). Le résultat net de cette confluence de culture cellulaire submergée et d'impression à jet d'encre est l'accès facile à des matrices de cellules isolées spatialement adressables sur des surfaces (Liberski *et al.*, 2011).

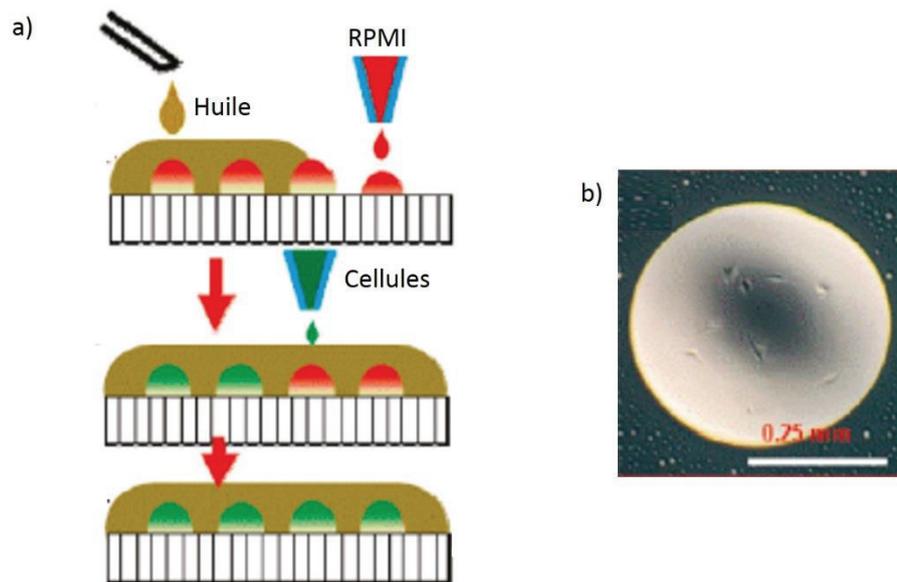


Figure 23 : Technique d'impression jet d'encre développée par Liberski *et al.* utilisant une barrière hydrophobe.

a) Schéma du principe utilisé, b) Observation en microscopie optique d'une gouttelette formée contenant des cellules L929 (Liberski *et al.*, 2011).

L'impression sur demande de cellules vivantes en utilisant des technologies à jet d'encre a récemment été démontrée et permet le dépôt contrôlé de cellules en matrices sur une biopuce. Ellis *et al.* ont montré que de telles puces à cellules peuvent être interrogées directement par micro-extraction liquide contrôlée par robot couplée par spectrométrie de masse nano-électrospray. De telles analyses automatisées génèrent des profils de lipides membranaires abondants qui sont caractéristiques du type cellulaire. Significativement, le contrôle spatial à la fois des étapes de dépôt et d'extraction combiné avec la sensibilité de la détection par spectrométrie de masse permet un profilage moléculaire rigoureux de cellules isolées (Ellis *et al.*, 2012).

#### 5.5.4. LES BIO-ENCRES

Le développement de l'encre peut être considéré comme un des aspects les plus difficiles dans le processus de bio-impression. Une encre « idéale » doit satisfaire des besoins biologiques pour la compatibilité cellulaire mais aussi des besoins physiques et mécaniques pour le processus d'impression. Physiquement, l'encre doit présenter des caractéristiques de gel ou être assez visqueuse pour être imprimée comme un filament. Cependant, si le gel est trop visqueux, de grandes forces de cisaillement seront requises pour éjecter l'encre ce qui provoquera la mort cellulaire et la fracture du gel (Kong *et al.*, 2003). De plus, la formulation ne doit pas être cytotoxique, elle doit permettre l'adhésion et la prolifération des cellules. Dans certains cas, la dégradation du gel de manière contrôlée au fil du temps peut être nécessaire.

Les hydrogels ont des propriétés structurales et fonctionnelles qui font d'eux des candidats particulièrement intéressants pour le développement de bio-encres (Chung *et al.*, 2013).

#### 5.6. APPROCHE MICROFLUIDIQUE

La microfluidique est une technique traitant de la manipulation des fluides dans des microenvironnements tels que des micro-canaux où le flux des fluides est généralement laminaire. La

microfluidique permet d'avoir des gradients de concentration spatio-temporels précis et de contrôler le microenvironnement cellulaire.

La microfluidique peut aussi contrôler le processus d'encapsulation en ajustant les paramètres du flux et/ou en utilisant une géométrie particulière des micro-canaux. Il a été montré que les cellules peuvent être encapsulées dans des microgouttes avec une haute efficacité d'encapsulation en ajustant le rapport de débit entre deux phases continues et dispersées. Kumachev *et al.* ont rapporté une approche microfluidique où des cellules souches embryonnaires murines peuvent être encapsulées dans des gouttelettes d'agarose de 110  $\mu\text{m}$  de diamètre moyen (Kumachev *et al.*, 2011).

Jun *et al.* ont rapporté une technique d'encapsulation qui produit des microfibrilles en utilisant un agent réticulent, le chlorure de calcium, dans la phase continue et une suspension d'ilots pancréatiques dans une solution d'alginate/collagène dans le canal interne (Jun *et al.*, 2013).

Récemment, Zhou *et al.* ont rapporté une méthode simple et versatile pour positionner différentes cellules sur un même substrat en utilisant une approche microfluidique qui permet non seulement le contrôle spatial et temporel de multiple microenvironnements mais aussi la récupération de cellules spécifiques traitées afin d'analyser leur information génétique exprimée à une résolution d'environ 10 cellules. En tirant avantage d'une plus grande surface de nanoparticules d'or sur un support recouvert de PDMS, la protéine promouvant l'adhésion cellulaire, la fibronectine humaine (hFN), peut être significativement accumulée sur des régions spécifiques où les cellules peuvent la reconnaître et s'étaler. Pour synthétiser le nano-film d'or sur le PDMS sous la forme de bandes isolées, une solution de chlorure d'or(III) a été délivrée dans la puce et incubée pour conduire la réduction de la réaction, suivie par l'incubation avec la fibronectine humaine et séchage. Les cellules ont été introduites dans les canaux qui ont été alignés orthogonalement avec les bandes d'or après que la première couche de la puce ait été décollée. Les cellules attachent et forment des motifs sur les ilots d'or modifiés avec la fibronectine dans les canaux après une nuit d'incubation. Sur la base de l'analyse par imagerie, la population de cellules désirée peut encore être récupérée avec une pipette afin d'effectuer les réactions d'analyses biochimiques telles qu'une qPCR (Figure 24) (Zhou *et al.*, 2015).

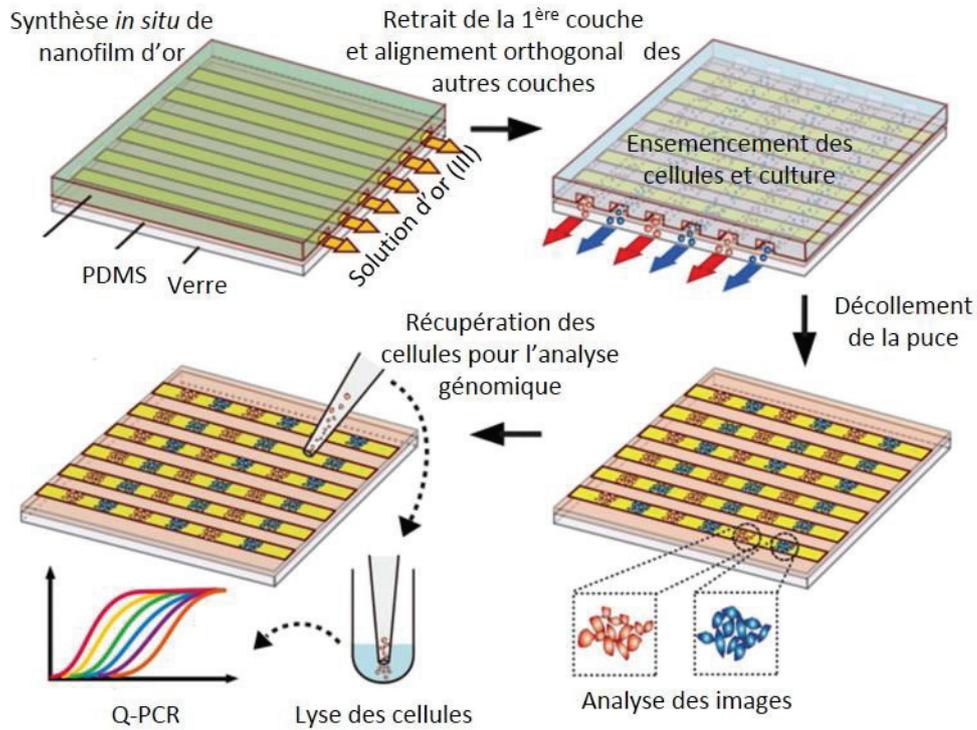


Figure 24 : Représentation schématique de la méthode développée par Zhou et al. pour positionner différentes cellules sur un substrat grâce à une approche microfluidique (d'après (Zhou et al., 2015)).

## 6. TECHNIQUES D'ANALYSE

Les réponses cellulaires face aux stimuli environnementaux étudiés peuvent être de natures diverses. Le changement de phénotype peut être observé au microscope, en utilisant des sondes de fluorescences spécifiques, ou bien en étudiant l'intégrité d'un tapis cellulaire placé sur un réseau d'électrodes par mesure d'impédance. Les protéines sécrétées quant à elles peuvent être détectées par les méthodes classiques de détection que sont la fluorescence, la luminescence, ou encore l'ampérométrie.

## 6.1. LA FLUORESCENCE

Certains groupements appelés fluorophores ont la particularité d'absorber l'énergie lumineuse à une certaine longueur d'onde et de la réémettre à une longueur d'onde plus grande. C'est le phénomène de fluorescence. Chaque fluorophore possède des longueurs d'onde d'excitation et d'émission caractéristiques. Certaines protéines possèdent des propriétés de fluorescence, c'est le cas par exemple de la GFP. Celle-ci est fréquemment utilisée comme marqueur. Par exemple en 2001, Ziauddin et Sabatini mettent au point une puce à cellule constituée d'une lame de verre sur laquelle sont déposés des plasmides contenant les ADN de gènes d'intérêt, mélangés à de la gélatine. Ces derniers sont recouverts par une monocouche de cellules. Avec l'aide d'un agent de transfection, les cellules sont transfectées et les protéines d'intérêt surexprimées. Un essai de transfection est effectué avec le gène codant la GFP afin de contrôler l'efficacité de la méthode (Ziauddin *et al.*, 2001). La fluorescence intrinsèque de la GFP permet alors de visualiser les résultats sans réaliser de marquage (Figure 25-a). Afin d'étudier la fonction d'un gène, il convient de le faire surexprimer par la cellule en introduisant une copie supplémentaire de ce gène dans la cellule, ou bien de stopper son expression par l'introduction dans la cellule d'ARN interférents (ARNi). Les ARNi créent en effet des complexes ARN-ARN qui sont reconnus et détruits par la cellule, inhibant l'expression du gène correspondant. Ce processus est d'autant plus efficace si les ARN introduits sont doubles brins, cela a pour effet d'amplifier la réponse (Baghdoyan *et al.*, 2004).

Cette technologie des puces à ARNi utilisée à haut-débit permet d'avancer dans l'attribution de fonctions aux gènes (Wheeler *et al.*, 2005). Les phénotypes résultants sont analysés suivant différents paramètres illustrés sur la Figure 25-b.

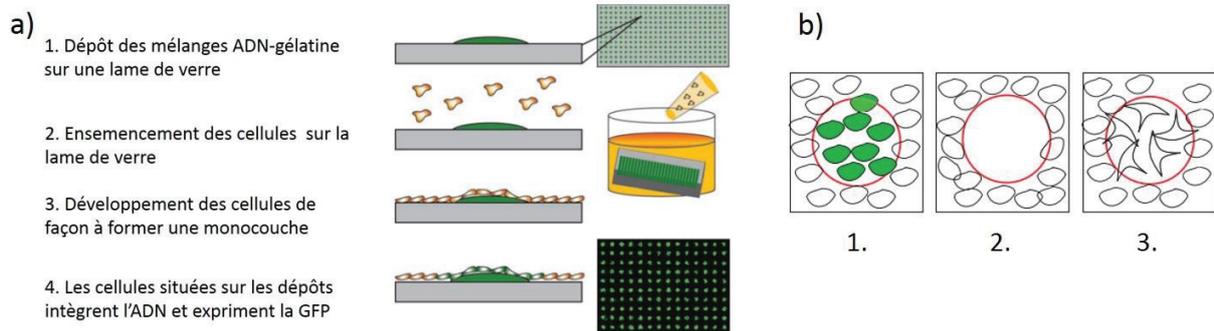


Figure 25 : a) Schéma illustrant les différentes étapes du concept développé par Ziauddin et Sabatini. Figure adaptée de (Yarmush et al., 2009), b) Schéma illustrant les différentes façons de visualiser le résultat d'une perte de fonction induite par ARNi dans l'expérience de Wheeler et al. 1. Expression d'un gène rapporteur, 2. Viabilité et comptage de cellules, 3. Morphologie cellulaire.

La fluorescence peut également être utilisée pour détecter des molécules sécrétées, par l'intermédiaire d'anticorps spécifiques couplés à un fluorophore. Love *et al.* ont mis au point une méthode afin d'immobiliser les molécules sécrétées par des cellules elles-mêmes immobilisées de manière individuelle au fond de micropuits en PDMS (Figure 26). La présence des molécules d'intérêt est ensuite détectée grâce à un immuno-essai et un marquage fluorescent des anticorps (Love *et al.*, 2006). Cette technique permet d'identifier, d'isoler et de multiplier les cellules produisant des anticorps monoclonaux.

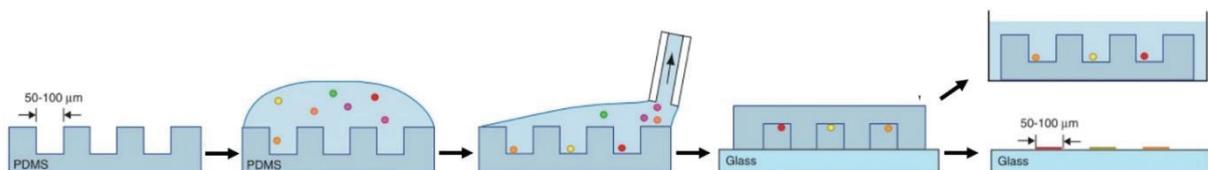


Figure 26 : Immobilisation des molécules sécrétées par les cellules elles-mêmes immobilisées (Love et al., 2006)

## 6.2. L'ÉLECTROCHIMILUMINESCENCE (ECL)

L'ECL combine les avantages analytiques des analyses en chimiluminescence avec l'électrochimie dont l'instrumentation est simple et à faible coût. Le système le plus couramment utilisé pour des analyses est constitué du luminophore  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  et de la tri-n-propylamine (TPRA) comme cor-réactant. Le  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  a des rendements quantiques élevés et une longue durée de vie à l'état excité ainsi qu'une forte luminescence (Miao *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2008; Deiss *et al.*, 2009; Sardesai *et al.*, 2011). Wu *et al.* ont développé une biopuce basée sur une stratégie de transfert d'énergie d'électrochimiluminescence (ECL-RET) pour la détection rapide de biomarqueurs de surface de cellules cancéreuses. Cette plate-forme consiste en 64 nanotiges de sulfure de cadmium (CdS) d'un diamètre de 1  $\mu\text{m}$  enrichies en antigènes uniformément distribuées sur 16 bandes d'oxyde indium-étain qui sont recouvertes par un multicanal en PDMS afin de réaliser la détermination multiplexée des antigènes. Pour raccourcir le temps de la réaction immunitaire dans les micro-canaux et simplifier le dispositif, une agitation magnétique et quatre ports USB ont été utilisés. Lorsque des anticorps marqués par le  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  ont capturé sélectivement les antigènes correspondants sur la nanotige de CdS (donneur), un transfert d'énergie d'électrochimiluminescence a lieu par émission cathodique en présence de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (Figure 27) (Wu *et al.*, 2012).

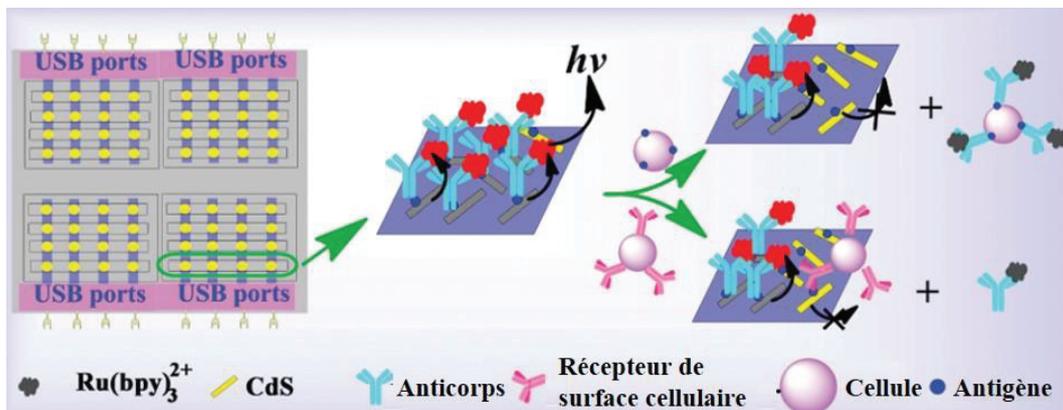


Figure 27 : Schéma du principe de la biopuce développée par Wu *et al.* (Wu *et al.*, 2012)

### 6.3. L'IMAGERIE PAR RÉSONANCE DES PLASMONS DE SURFACE

L'imagerie par résonance des plasmons de surface (SPRi) est une technique optique permettant l'analyse en temps réel et sans marquage des interactions entre biomolécules. Un faisceau de lumière polarisée monochromatique est dirigé sur un prisme recouvert d'une surface d'or selon un angle tel que le faisceau soit entièrement réfléchi afin de voir apparaître une onde évanescente qui se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde. Cette onde évanescente engendre une oscillation des électrons libres de l'or, c'est la résonance des plasmons de surface. Cette résonance induit une chute de l'intensité du faisceau réfléchi pour un angle incident donné, l'angle de résonance. Ce dernier varie selon l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent. Ainsi, toute molécule se situant dans le champ évanescent et interagissant avec la surface modifiera l'indice de réfraction du milieu, entraînant une modification de l'angle de résonance. Toute augmentation de masse sur la surface entraîne alors une augmentation d'indice. Les variations de réflectivité engendrées par les variations d'angle de résonance sont mesurées à angle fixe en fonction du temps et en fonction d'une position sur la surface.

Les biocapteurs basés sur cette technique ont été utilisés, auparavant, pour détecter les interactions entre plusieurs types de molécules comme de l'ADN (Guedon *et al.*, 2000), les peptides ou des protéines (Grosjean *et al.*, 2005). Plus récemment, cette méthode a été utilisée pour détecter des cellules vivantes (Hide *et al.*, 2002), (Suraniti *et al.*, 2007). Bien que présentant un intérêt croissant dans une grande variété d'applications, il n'y a que peu d'exemples de biopuces à détection par SPR permettant de suivre les sécrétions extracellulaires. Milgram *et al.* ont présenté une puce à protéines permettant à la fois la culture de cellules sur la puce et simultanément, l'analyse des protéines sécrétées par les hybridomes (Figure 28-a) (Milgram *et al.*, 2011). Liu *et al.* ont développé un biocapteur SPR permettant d'étudier en temps réel la sécrétion de VEGF. Des cellules de cancer ovarien SKOV-3 ont été cultivées sur la face supérieure d'une chambre de culture et des anticorps anti-VEGF ont été immobilisés sur la couche sensible de SPR. Après 48h de culture, l'inducteur ( $\text{Ca}^{2+}$  500  $\mu\text{M}$ ) a été injecté dans le flux afin d'induire une exocytose rapide du VEGF (Figure 28-b) (Liu *et al.*, 2012). Endo *et al.* ont proposé une puce à cellules basée sur la résonance localisée des plasmons de

surface (LSPR) pour détecter les interleukines-2 sécrétées par des cellules T de souris (Figure 28-c) (Endo *et al.*, 2008).

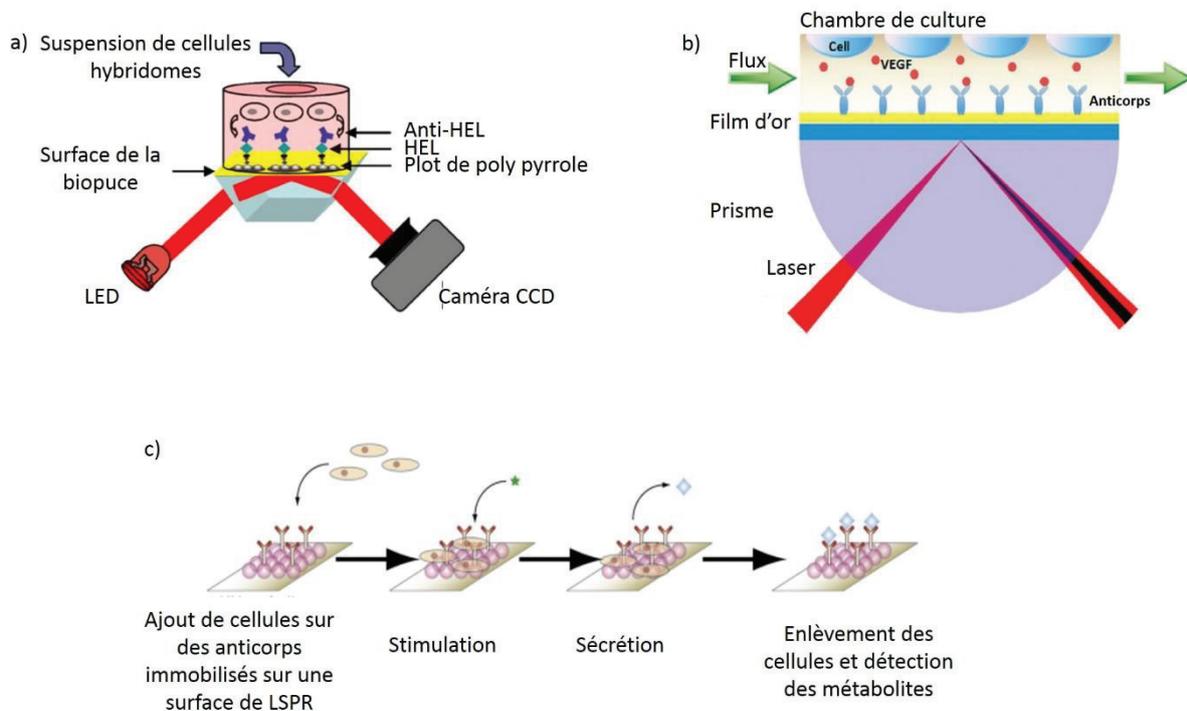


Figure 28 : Exemples de biopuces à détection par SPR.

a) Schéma du principe de la biopuce développée par Milgram *et al.* (Milgram *et al.*, 2011), b) Schéma du biocapteur développé par Liu *et al.* afin d'étudier la sécrétion de VEGF (Liu *et al.*, 2012), c) Détection de métabolites par LSPR (Endo *et al.*, 2008).

Les capteurs SPR classiques détectent seulement une variation moyenne de l'indice de réfraction avec des milliers de cellules par zone détectable sur une puce. Yanase *et al.* ont développé une puce pour la SPRi avec une caméra CMOS et un objectif afin d'analyser l'indice de réfraction de cellules vivantes et de son changement selon différents stimuli. Ce biocapteur pourrait détecter les réactions des cellules individualisées responsables de la leucémie à basophiles de rat (RBL-2H3), des cellules kératinocytes de souris (PAM212), et des cellules de carcinome épidermique humain (A431) à des

stimuli spécifiques ou non, tels qu'un antigène, un ester de phorbol ou le facteur de croissance épidermique, avec ou sans leurs inhibiteurs. La technique développée dans cette étude pourrait permettre de visualiser l'effet de divers stimuli, inhibiteurs sur les réactions cellulaires ainsi que les changements de la distribution d'indice de réfraction intracellulaire au niveau de cellules individualisées. Cet outil pourrait être utilisé pour révéler de nouveaux phénomènes dans le champ évanescent près de la membrane plasmique et pour développer un système de criblage à haut-débit pour le diagnostic clinique (Yanase *et al.*, 2010).

Une autre approche de SPRi, la microscopie par résonance des plasmons de surface (SPRM), développée plus récemment, utilise un objectif de haute ouverture numérique pour atteindre une résolution spatiale à la limite de diffraction optique de la lumière incidente (Huang *et al.*, 2007; Jamil *et al.*, 2008; Sefat *et al.*, 2011). En utilisant cette technique, Wang *et al.* ont étudié la force locale d'adhésion cellule-support. Cette tâche a pu être effectuée en contrôlant la pression osmotique extracellulaire et en analysant le mouvement local de la membrane cellulaire associée au support par SPRM. Tout le processus dynamique de la réponse cellulaire à la pression osmotique extracellulaire a été suivi et étudié pour fournir une image détaillée de la réponse cellulaire en conditions hypertoniques et hypotoniques (Figure 29) (Wang *et al.*, 2012). Cette approche pourra servir de nouvel outil pour le suivi continu des interactions dynamiques cellule-support dans différents mouvements cellulaires tels que l'adhésion, la migration et le détachement.

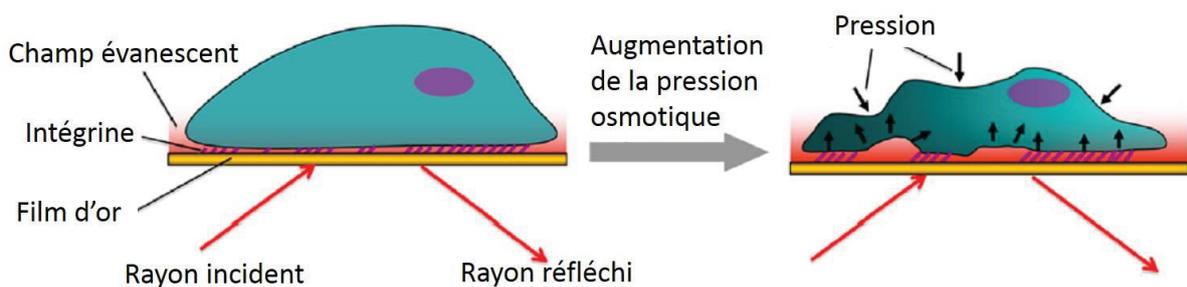


Figure 29 : Illustration schématique des interactions cellules-substrat par cartographie SPRM (Wang *et al.*, 2012).

#### 6.4. LA MESURE DE FORCE PAR LA DÉFORMATION DE MICROCOLONNES EN ÉLASTOMÈRE

La réponse des cellules peut également être étudiée en analysant leurs propriétés physiques comme par exemple la force de traction. Celle-ci peut varier en fonction de l'environnement mais aussi de l'état physiologique de la cellule. D'autre part, ce concept permet d'étudier la migration des cellules. Du Roure *et al.* décrivent un outil capable de mesurer la force de traction des cellules par la déformation de micro colonnes en élastomère (du Roure *et al.*, 2005). Ils étudient ainsi la migration de différentes cellules sous l'influence d'un facteur de croissance (Figure 30).

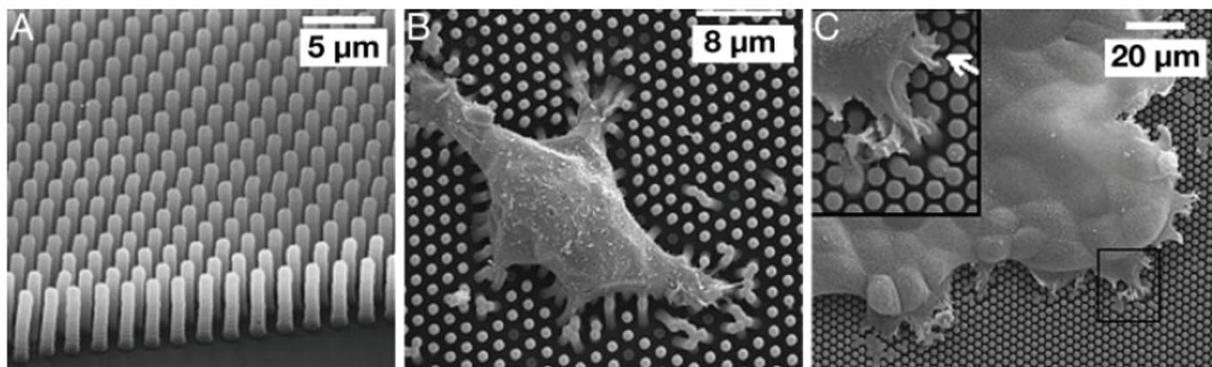


Figure 30 : Étude de la migration cellulaire par déformation de micro-colonnes en élastomère. a) Micro-colonnes en PDMS juste après moulage, b) Cellule isolée étalée sur le réseau de micro-capteurs de forces ( $\mu$ FSA), c) La cellule se propage uniquement sur le haut des micro-colonnes (du Roure *et al.*, 2005).

#### 6.5. L'AMPÉROMÉTRIE

L'ampérométrie mesure les transferts d'électrons à l'aide d'une électrode. Elle permet de détecter des espèces électro-actives relarguées ou sécrétées par les cellules. C'est le cas de certains neurotransmetteurs comme la dopamine qui peuvent être oxydés et donc mesurés par ampérométrie. La difficulté est de détecter des quantités très faibles de molécules avec le meilleur rapport signal/bruit

possible. Amatore *et al.* décrivent un système permettant de détecter une femto mole de messagers biochimiques (hormones,  $\text{Ca}^{2+}$ , ...) c'est-à-dire  $10^{-15}$  mole : ils utilisent pour se faire des cuves de  $1000 \mu\text{m}^3$ , ce qui revient à mesurer des concentrations de l'ordre du millimolaire (Amatore *et al.*, 2008). Au sein d'une biopuce à cellule, cette technique est cependant très peu utilisée du fait de la difficulté de mettre en place un réseau d'électrode, ainsi que des systèmes permettant de limiter les interférences avec d'autres molécules électro-attractives.

## 6.6. L'IMPÉDANCE

L'impédance mesure l'opposition d'un circuit électrique au passage d'un courant alternatif sinusoïdal. Elle se mesure en  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . L'intégration d'électrodes dans un système utilisant la microfluidique permet de mesurer l'impédance d'un tapis de cellules ou de cellules individualisées (Figure 31) (Jang *et al.*, 2007). Ceci permet notamment de suivre les changements morphologiques des cellules. Cependant cette méthode reste peu utilisée du fait du manque de spécificité.

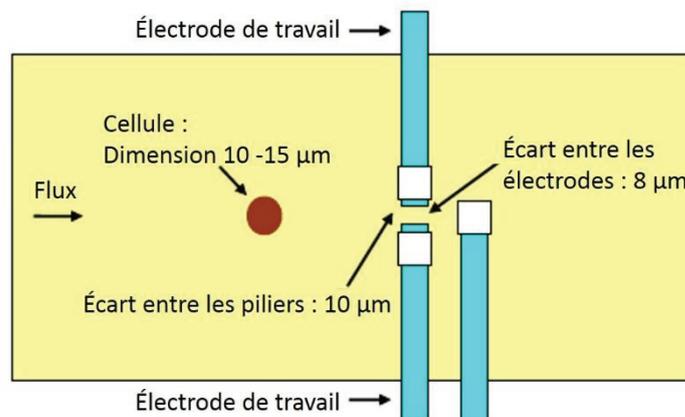


Figure 31 : Représentation schématique de la biopuce développée par Jang *et al.* afin de mesurer l'impédance de cellules individualisées (d'après (Jang *et al.*, 2007)).

## 7. APPLICATIONS

### 7.1. LES TESTS DE CYTOTOXICITÉ ET CRIBLAGE DE MÉDICAMENTS

Les tests de viabilité et de cytotoxicité sont importants pour évaluer les effets secondaires possibles de potentiels nouveaux médicaments. Un des défis dans le criblage de médicaments et de toxines est de recréer les interactions cellules-cellules représentatives des organismes vivants. De plus les effets toxiques de beaucoup de médicaments dans un tissu ciblé dépendent de l'activité métabolique d'un autre tissu, en particulier le foie.

En 2004, Akagi *et al.* ont présenté pour la première fois une plateforme pour le criblage haut-débit qui combine une matrice de micro-chambres miniaturisées et des systèmes automatisés de distribution d'échantillons de quelques nanolitres. Un lecteur de fluorescence a été utilisé pour mesurer la prolifération cellulaire en exploitant le marquage calcéine-AM afin d'étudier l'effet anti-cancer de la mitomycine C sur des cellules HeLa (Akagi *et al.*, 2004).

### 7.2. LES TESTS DE MIGRATION CELLULAIRE

Un autre champ important d'application concerne l'étude de la migration cellulaire qui est impliquée dans divers processus biologiques du développement embryonnaire et la formation de métastases tumorales. Les techniques standards sont basées sur des gradients mimant le chimiotactisme mais fonctionnent dans des conditions statiques sans contrôle du gradient de concentration en chimiokines. Les puces à cellules peuvent surmonter la plupart de ces limitations et différents prototypes ont été rapportés. Saadi *et al.* ont ainsi fabriqué une puce composée de deux canaux principaux, contenant respectivement le chimio-attractant et les cellules, et réalisé un gradient grâce à la diffusion de chimiokines à travers des séries de micro-canaux horizontaux remplis avec des protéines de la matrice extracellulaire (Figure 32) (Saadi *et al.*, 2007). Shin *et al.* ont proposé une puce à cellules qui combine des tests d'intra- et d'extravasation (passage anormal d'un liquide hors de son canal dans les tissus qui l'entourent) pour l'étude complète des métastases. Le dispositif consiste en deux micro-chambres,

l'une pour l'intravasation (basée sur la culture de cellules cancéreuses en 3D dans une matrice de Matrigel) et l'autre pour l'extravasation (pour détecter l'adhésion entre les cellules cancéreuses métastasées et les cellules épithéliales). Ce nouveau système est un outil prometteur pour l'analyse simultanée de deux phénomènes (Shin *et al.*, 2011).

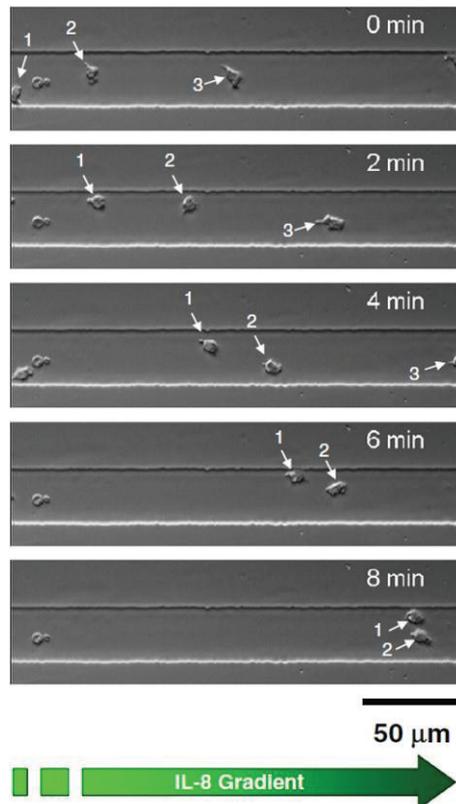


Figure 32 : Images à intervalle régulier de neutrophiles migrant dans un microsillon avec un gradient d'IL-8 de 0 à 50 ng/mL (Saadi *et al.*, 2007).

### 7.3. L'ÉLECTROPORATION DE CELLULES

Les effets de l'application de champs électriques courts et intenses sur des cellules sont étudiés depuis une vingtaine d'années puisqu'il a été démontré que ces champs électriques induisent une perturbation de la membrane plasmique qui devient perméable à diverses molécules (Tsong, 1991).

Cette perméabilisation temporaire de la membrane permet l'entrée de gènes ou de médicaments dans le cytosol. Cette technique est donc attractive dans diverses applications et notamment dans l'électrochimiothérapie (Mir *et al.*, 2006). Les développements récents en micro-technologies ont permis de réaliser des électrodes miniaturisées qui permettent d'exposer des cellules sur une puce à des pulsations électriques courtes et intenses (de l'ordre de 100  $\mu$ s avec un champ électrique de 1 kV/cm) (Le Pioufle *et al.*, 2000). Plus récemment, une puce microfluidique a été développée pour la nanoporation de cellules grâce à l'application de champs électriques pulsés très courts (entre 3 et 10 ns). Ce dispositif a été optimisé afin de visualiser en temps réel la nanoporation d'iodure de propidium dans des fibroblastes de hamster chinois (Dalmay *et al.*, 2011).

#### 7.4. LA DIFFÉRENCIATION DE CELLULES SOUCHES

L'environnement des cellules souches consiste en différents facteurs (d'origine chimique, physique ou mécanique) qui affecte le comportement cellulaire, incluant la différenciation, la prolifération, la migration et l'apoptose. Les puces à cellules permettent un contrôle précis du microenvironnement extracellulaire *in vitro* contrairement aux méthodes classiques. Chung *et al.* ont développé une puce microfluidique générant un gradient pour la prolifération et la différenciation de cellules souches neuronales humaines. Ces cellules ont été cultivées dans un gradient continu de concentration de facteurs de croissance et se sont différenciées en astrocytes (Figure 33) (Chung *et al.*, 2005).

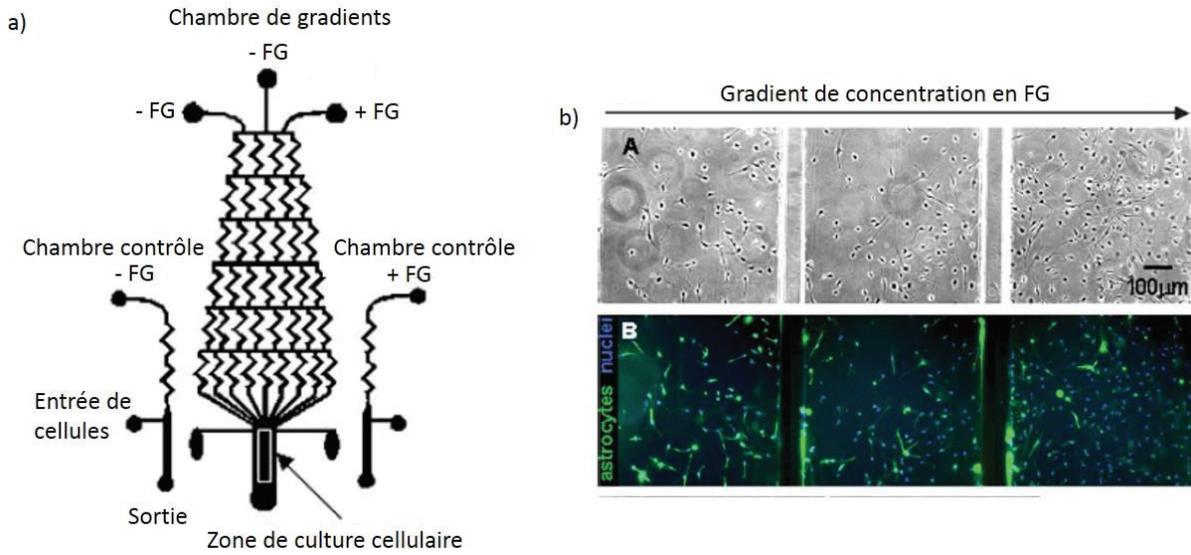


Figure 33 : Puce microfluidique développée par Chung et al.

a) Représentation schématique de la biopuce. b) Différentiation des cellules hNSCs en astrocytes dans la chambre de gradients pendant 7 jours de culture. (Chung et al., 2005)

## 7.5. LA SÉPARATION DES CELLULES

Liu *et al.* ont développé une puce microfluidique contenant des matrices d'anticorps immobilisés pour la séparation des cellules en testant simultanément des drogues. Un tampon en PDMS a été utilisé pour déposer les anticorps dans un canal microfluidique, formant des régions définies pour la capture des cellules sur la surface. Des mélanges de cellules ont été introduits afin de tester la séparation des cellules grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques. Des régions modifiées avec les anticorps anti-CD19 ont permis la capture de cellules Ramos CD19+ (94% de pureté). Un anticorps qui capture de multiples types cellulaires, par exemple l'anti-CD71, peut aussi être utilisé pour capturer plusieurs types de cellules simultanément. Les cellules peuvent aussi être introduites dans la puce avec un contrôle spatial en utilisant des flux laminaires. Des cellules Ramos B et HuT 78 T ont été isolées dans la puce et exposées à la staurosporine dans le même canal (Figure 34). Ces deux types cellulaires ont une réponse similaire à cette drogue, avec 2 à 10% de cellules viables après 20h de traitement, dépendant

du type de cellules. Cette puce peut être utilisée pour une grande variété d'études de séparation des cellules et/ou d'essais de drogues, permettant aux chercheurs d'isoler des cellules, de les tester contre différents agents anti-cancéreux et de suivre leur réponse par fluorescence (Liu *et al.*, 2014).

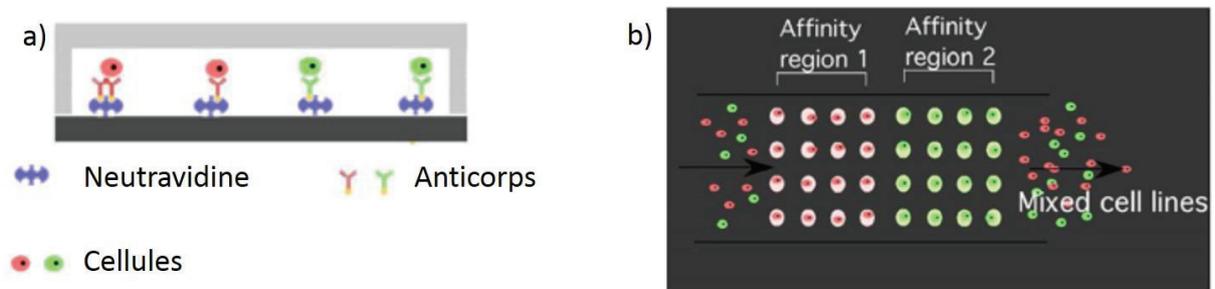


Figure 34 : Puce microfluidique pour séparer des cellules et tester simultanément des drogues.  
 a) Schéma de la biopuce, b) Séparation de deux types cellulaires grâce à la reconnaissance spécifique par des anticorps de capture immobilisés (Liu *et al.*, 2014).

## 7.6. LA DÉTECTION DE PROTÉINES SÉCRÉTÉES

Il y a, pour l'instant, deux approches distinctes pour capturer et quantifier des protéines sécrétées par des cellules isolées sur une puce à micropuits. La micro gravure qui nécessite une configuration dans laquelle les puits sont fermés (pour un intervalle court, ~1- 3h) par une lame en verre portant les anticorps de capture immobilisés (Han *et al.*, 2010). D'autres approches ont été rapportées utilisant une puce de micropuits ouverts où les anticorps de capture sont immobilisés au fond des puits (Figure 35) (Zhu *et al.*, 2009) ou sur la surface plane entre les puits (Jin *et al.*, 2009) pour capturer les protéines sécrétées par les cellules pendant plusieurs heures ou jours d'incubation. La capture d'analytes sur ou à proximité de la surface des micropuits repose sur des principes similaires à l'ELISpot, avec en plus l'avantage d'avoir des cellules isolées dans des puits permettant l'analyse des protéines sécrétées et l'analyse des cellules par cytométrie en flux.

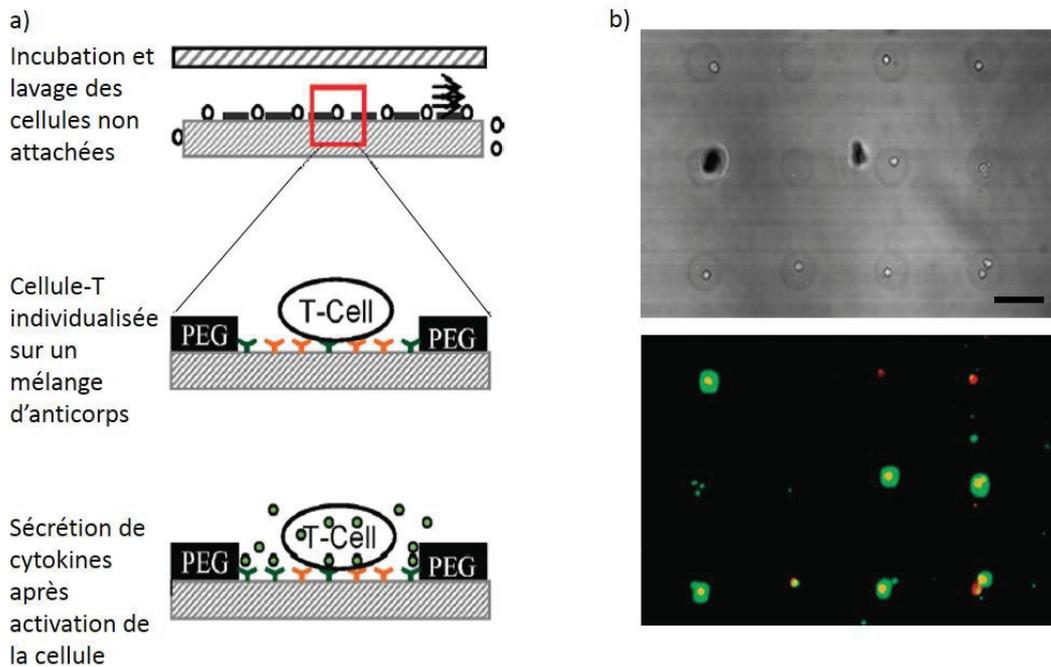


Figure 35 : Détection de cytokines sécrétées par des cellules-T individualisées.

a) Schéma de principe de la biopuce, b) Image en microscopie optique de cellules-T individualisées dans les puits de PEG (en haut) et image en microscopie de fluorescence en présence d'un anticorps anti-CD4 (rouge) et d'un anticorps anti-IFN- $\gamma$  (vert) (en bas) (la barre d'échelle représente 20  $\mu\text{m}$ ) (d'après (Zhu et al., 2009)).

## 8. CONCLUSION

Les puces à cellules sont de puissants outils expérimentaux pour le criblage à haut débit d'un grand nombre d'échantillons. La miniaturisation augmente le débit de dosage, tout en réduisant la consommation de réactif et le nombre de cellules requises, ce qui rend ces systèmes attrayants pour une large gamme de tests.

Différentes technologies intervenant dans la conception de puces à cellules ont été présentées. Elles peuvent être associées en diverses combinaisons pour créer ces microsystèmes. En effet, les cellules

peuvent être analysées grâce à diverses méthodes. En fonction des contraintes de ces méthodes de détection et des propriétés des cellules (adhérentes ou non), le support, la méthode de dépôt ainsi que la stratégie d'immobilisation peut varier.

Nous avons pu voir que les nouvelles technologies de dépôt ainsi que la technique de transfection *in situ* permettent d'étudier des cellules ayant des phénotypes différents sur une même biopuce cependant les exemples de puces à cellules sur lesquelles sont cultivées des lignées différentes de cellules en parallèles sont rares. Dans ce contexte de multiplexage, nous avons voulu concevoir une puce à cellules permettant l'étude en temps réel de molécules sécrétées par plusieurs lignées de cellules.



---

## **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

---



## 1. MATÉRIELS

### 1.1. RÉACTIFS

#### 1.1.1. CULTURE CELLULAIRE

Alexafluor 546®-labelled phalloidin.....	Invitrogen
Anti-vinculine - FITC .....	Sigma-Aldrich
DAPI.....	Invitrogen
DMEM .....	Invitrogen
Fungizone .....	Invitrogen
Lipofectamine .....	Invitrogen
LNCaP .....	ATCC
PBS stérile .....	Invitrogen
Pénicilline/streptomycine .....	Invitrogen
RPMI 1640.....	Sigma-Aldrich
SVF .....	Invitrogen
Trypsine-EDTA 5% .....	Invitrogen

#### 1.1.2. PROTEINES

Anticorps anti-B2M (IgG monoclonaux développés chez la souris 1 mg/mL).....	Raybiotech Inc.
Anticorps anti-CRP (IgG monoclonaux développés chez la souris 6 mg/mL) ...	Meridian Life Science Inc.
Anticorps anti-PSA (IgG monoclonaux développés chez la souris 1 mg/mL) .....	Abcam
Anticorps anti-PSA biotinylé (IgG monoclonaux développés chez la souris 0,6 mg/mL) .....	Hyttest
B2M.....	Raybiotech Inc.
Fibronectine .....	Sigma Aldrich
PSA .....	Abcam

### 1.1.3. AUTRES RÉACTIFS

#### 1.1.3.1. PRODUITS CHIMIQUES ET SOLVANTS

Acide chlorhydrique (HCl) .....	Prolabo
Alginate de sodium.....	Alfa Aesar
Bis (2-methoxyethyl)ether.....	ReagentPlus®
Chlorure de calcium dihydrate .....	Sigma-Aldrich
Diéthylmalonyurée sodée (Véronal).....	Prolabo
Low-Cross Buffer .....	Candor Bioscience
Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) .....	Sigma-Aldrich
Peroxyde d'hydrogène 30% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	Prolabo
Polystyrène .....	Sigma-Aldrich
Toluène .....	Laurylab

#### 1.1.3.2. TAMPONS

##### **PBS (Phosphate Buffer Saline)**

Tampon phosphate 100 mM ; NaCl 100 mM ; pH =7,4

##### **Tampon d'immobilisation des anticorps**

Tampon Carbonate 100 mM ; pH = 9

##### **Tampon de saturation « LowCross »**

Tampon phosphate 100 mM ; NaCl 100 mM ; pH = 7,4 ; LowCross-Buffer 20% (v/v)

##### **Tampon de révélation par chimiluminescence**

VBS ; Luminol 220 µM ; p-iodophénol 220 µM ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM

**VBS (Veronal Buffer Saline)**

Tampon véronal 100 mM ; NaCl 100 mM ; pH = 7,4

**1.2. SUPPORTS**

Adhésif double face 468MP .....	3M
Feuille de polycarbonate, Lexan 80330 .....	ThyssenKrupp Cadillac Plastic
Plaque 96 puits ELISA, MaxiSorp à fond plat, noires .....	Nunc MaxiSorp
Prisme SPRi.....	Horiba Jobin Yvon

**1.3. INSTRUMENTS**

Appareil de dépôt centrifuge Spin coater WS-650MZ-23NPP .....	Laurell Technologies
Appareil de dépôt non contact SciFlex Arrayer S1 .....	Scienion
Appareil de dépôt non contact SciFlex Arrayer S3 .....	Scienion
Enceinte thermostatée ThermoMixer .....	Eppendorf
Incubateur .....	Eppendorf
Luminomètre lecteur de plaque Luminoscope.....	Labsystems
Microscope optique .....	Olympus
Profilomètre NJ Optimal.....	NanoJura
Silhouette <sup>TM</sup> SD craft cutter .....	Quickutz
SPRi Lab+ .....	Horiba Jobin Yvon

## 1.4. LOGICIELS

Luminoscope Acent 2.4 .....	Labsystems
Mountain Maps.....	Digital Surf

## 2. MÉTHODES

### 2.1. MICROFABRICATION

#### 2.1.1. PRÉPARATION DES SUPPORTS

##### 2.1.1.1. SUPPORTS UTILISÉS

Différents supports ont été utilisés pour la fabrication de la puce. Le premier support utilisé est une feuille de polycarbonate de 25 x 12 x 1 mm. Ce support a été recouvert d'une couche d'or d'environ 40 nm d'épaisseur par pulvérisation cathodique pour la mise au point de la biopuce. Le deuxième support utilisé est un prisme *Horiba SPRi biochip*.

##### 2.1.1.2. SPIN-COATING

Il s'agit d'une technique de dépôt de couche mince sur une surface plane. Le support est maintenu par aspiration sur un plateau tournant à haute vitesse afin d'étaler de façon uniforme par force centrifuge le liquide déposé (Figure 36). L'épaisseur de la couche formée dépend de plusieurs facteurs :

- Facteurs liés au spin-coater : vitesse angulaire, accélération, temps de l'opération.
- Facteurs liés au composé déposé : quantité déposée, concentration, masse molaire, viscosité.

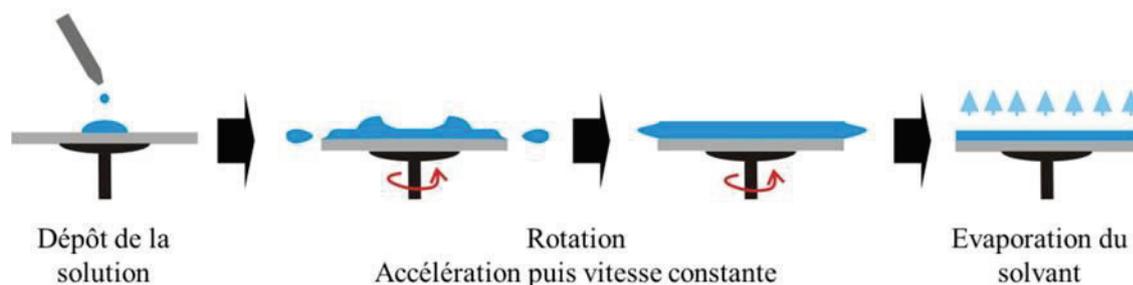


Figure 36 : Schéma de principe du spin-coating.

Le support en polycarbonate recouvert d'or est placé dans le spin-coater. 250  $\mu\text{L}$  d'une solution de polystyrène à une concentration de 50 mg/mL dans du toluène sont ensuite déposés. L'échantillon est soumis à une accélération de 400 tours/minute/seconde jusqu'à atteindre 2000 tours/minute, vitesse maintenue constante pendant 1 minute. Différentes valeurs d'accélération, de vitesse et de concentrations de la solution ont été testées afin d'optimiser cette méthode. Les paramètres retenus (ci-dessus) sont ceux permettant d'obtenir une couche mince de polystyrène la plus homogène.

### 2.1.1.3. DÉPÔT AUTOMATISÉ DE TOLUÈNE

Le polystyrène étant soluble dans le toluène, il est possible, afin de réaliser des puits dans la couche de polystyrène, de déposer de très faibles volumes de toluène de manière organisée sur le support à l'aide d'un robot de pipetage (*spotter* SciFlex Arrayer S3). Cet appareil utilise une technique de dépôt non contact basée sur des impulsions électriques administrées à un cristal piézo-électrique qui se déforme alors expulsant une goutte de très faible volume (quelques centaines de picolitres) à des coordonnées x, y et z prédéfinies et avec une précision de 5  $\mu\text{m}$ . 3 gouttes de toluène sont ici nécessaires pour traverser entièrement la couche de polystyrène et atteindre la surface d'or. Deux capillaires de dépôt de diamètre différent ont été utilisés. Le premier, un PDC40, permet de déposer des gouttes de 100 pL. Le second, un PDC80, permet, quant à lui, de déposer des gouttes de 300 pL.

#### 2.1.1.4. DÉPÔT PLASMA D'UN FILM DE PEO

Un film d'environ 30 nm d'épaisseur d'oxyde de polyéthylène (PEO) a été déposé sur une lame de polycarbonate par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma dans un réacteur à couplage capacitif en utilisant du bis (2-méthoxyéthyl) éther comme précurseur. Ces dépôts ont été réalisés à l'institut pour la protection des consommateurs et de la santé (Institute for Health and Consumer Protection, IHCP) du Centre Commun de Recherche (Joint Research Center, JRC) de la Commission européenne à Ispra (Italie).

### 2.1.2. CARACTÉRISATION DES SURFACES

#### 2.1.2.1. PROFILOMÉTRIE NON-CONTACT À CAPTEUR CONFOCAL

Les dimensions des micropuits formés ont été mesurées en utilisant un profilomètre NJ-Optimal à capteur confocal à haute résolution. Cet appareil permet la mesure du profil d'une surface jusqu'à 100 x 100 mm et la création d'une image en trois dimensions de la surface analysée. Le principe de fonctionnement de l'appareil est présenté sur la figure ... . Un objectif chromatique projette l'image d'un point source de lumière blanche sur l'échantillon. Les images monochromatiques du point source sont situées à des positions z différentes pour chaque longueur d'onde. La surface de l'objet va diffuser la lumière incidente et la lumière rétrodiffusée va traverser l'objectif en sens inverse, être séparée et arriver sur un orifice de filtrage qui ne laisse passer que la longueur d'onde focalisée. La lumière collectée, analysée par spectrométrie, permet d'obtenir une courbe d'intensité du signal en fonction de la longueur d'onde : l'intensité maximale est obtenue pour la longueur d'onde focalisée, en relation directe avec la position de l'échantillon. La surface est balayée selon les axes x et y motorisés de l'appareil et l'ensemble des profils obtenus permet la visualisation d'une image en 3 dimensions de la surface avec une résolution x/y proche de 1  $\mu\text{m}$ . Les images obtenues sont ensuite analysées grâce au logiciel Mountain Maps (Figure 37).

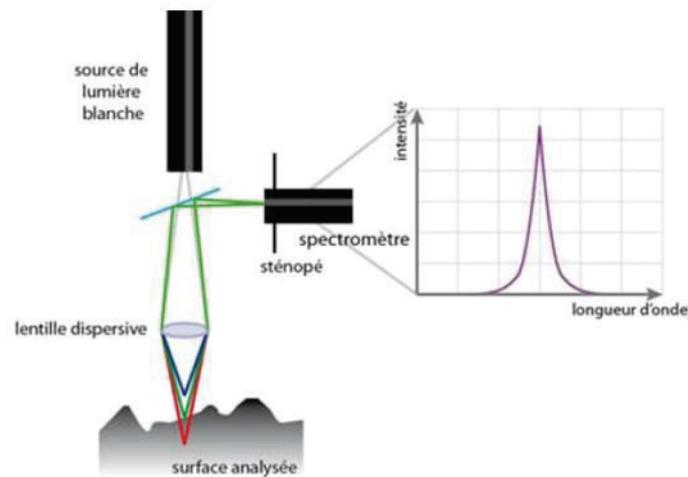


Figure 37 : Principe de fonctionnement du profilomètre NJ-Optimal.

#### 2.1.2.2. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE À BALAYAGE

Les images de microscopie électronique à balayage ont été obtenues en utilisant un microscope Hitachi S800 FEG (Centre Technologique des Microstructures - Lyon 1, Villeurbanne, France) avec une tension d'accélération de 10-15 kV, fournissant une résolution de 2 nm à 30 kV pour une distance de travail de 5 mm et des tensions d'accélération possibles allant de 1 à 30 kV.

La microscopie électronique à balayage MEB (ou « Scanning Electron Microscopy » SEM) est une technique puissante d'observation de la topographie des surfaces. Elle est fondée principalement sur la détection des électrons secondaires émergents de la surface sous l'impact d'un très fin faisceau d'électrons primaires qui balaye la surface observée et permet d'obtenir des images avec un pouvoir séparateur souvent inférieur à 5 nm et une grande profondeur de champ. La MEB utilise, en complément, les autres interactions des électrons primaires avec l'échantillon : émergence des électrons rétrodiffusés, absorption des électrons primaires, ainsi que l'émission de photons X et parfois celle de photons proches du visible. Chacune de ces interactions est souvent significative de la topographie et/ou de la composition de la surface.

L'instrument permet de former un faisceau quasi parallèle, très fin (jusqu'à quelques nanomètres), d'électrons fortement accélérés par des tensions réglables, de le focaliser sur la zone à examiner et de

la balayer progressivement. Des détecteurs appropriés, détecteurs d'électrons spécifiques (secondaires, rétrodiffusés, parfois absorbés...), complétés par des détecteurs de photons, permettent de recueillir des signaux significatifs lors du balayage de la surface et d'en former diverses images significatives.

### 2.1.2.3. SPECTROMÉTRIE DE MASSE D'IONS SECONDAIRES À TEMPS DE VOL

La Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires à Temps de Vol (ToF-SIMS) est une méthode d'analyse élémentaire et moléculaire à très haute sensibilité de traces en extrême surface (< 0.5 nm) de tous types de matériaux compatibles avec l'ultravide. Basé sur le mode statique d'émission ionique secondaire, le ToF SIMS met en oeuvre une dose totale d'ions primaires inférieure à  $10^{12}$  ions par  $\text{cm}^2$  soit moins d'un ion primaire pour 1000 atomes de la surface. Le ToF SIMS est en conséquence une méthode d'ionisation douce qui permet l'analyse moléculaire de surface.

Une source pulsée d'ions primaires mono ou multi-atomiques ( $\text{Ga}^+$ ,  $\text{Bi}^{n+}$ ,  $\text{Au}^+$ ,  $\text{C}_{60}^+$ , ...) possédant une énergie de quelques keV bombarde la surface de l'échantillon et produit des ions secondaires émis à partir de la première monocouche en surface de l'échantillon. Ces derniers sont focalisés et accélérés avec une même énergie cinétique dans le tube d'analyse. Le temps de parcours des ions secondaires dans l'analyseur est proportionnel à la racine carrée de leurs masses. C'est le principe physique de l'analyseur à temps de vol qui analyse « en parallèle » tous les ions secondaires émis. Les spectres de masse obtenus représentent l'intensité des ions secondaires en fonction de leurs masses. L'utilisation d'un analyseur à temps de vol permet d'obtenir une très bonne résolution en masse ( $\Delta M/M > 10\,000$  à la masse 28).

Grâce à un dispositif de balayage du faisceau d'ions primaires, on peut obtenir une cartographie des différents éléments et espèces moléculaires présents à la surface, avec une résolution submicronique. On peut également, en alternant des séquences d'acquisition et d'abrasion, tracer un profil de composition avec une résolution en profondeur nanométrique.

Les analyses ToF-SIMS ont été réalisées à l'institut pour la protection des consommateurs et de la santé (*Institute for Health and Consumer Protection, IHCP*) du Centre Commun de Recherche (*Joint Research Center, JRC*) de la Commission européenne à Ispra (Italie).

#### 2.1.2.4. SPECTROMÉTRIE DE PHOTOÉLECTRONS INDUITS PAR RAYONS X

La spectroscopie de photoélectrons X (XPS) permet d'obtenir la composition chimique de la surface d'un matériau sur une profondeur variant de 1 nm à 10 nm. Tous les éléments sauf l'hydrogène et l'hélium sont détectables. La nature des liaisons chimiques et les pourcentages atomiques sont obtenus par traitement des données. Cette technique d'analyse est non destructive. L'interaction de photons d'une source X avec la matière rend instables les atomes qui la composent. Cet apport d'énergie, pour peu qu'il soit suffisant, permet aux électrons qui gravitent autour du noyau de rompre l'attraction qui les maintient sur leurs orbitales. Ils quittent alors l'atome avec une énergie cinétique  $E_c$ . Propulsés dans la matière, ils parcourent une distance qui est fonction de cette énergie et du matériau dans lequel ils évoluent. Si leur énergie est suffisante, certains électrons atteignent la surface, sont extraits du matériau et passent dans le vide. Les électrons émis sont collectés et comptés en fonction de leurs énergies cinétiques. La relation  $E_l = h\nu - E_c - W_{\text{travail de sortie}}$  permet de déterminer l'énergie de liaison  $E_l$  des électrons et d'identifier les atomes dont ils proviennent.

Les analyses XPS ont été réalisées à l'institut pour la protection des consommateurs et de la santé (*Institute for Health and Consumer Protection, IHCP*) du Centre Commun de Recherche (*Joint Research Center, JRC*) de la Commission européenne à Ispra (Italie).

## 2.2. DÉPÔT AUTOMATISÉ DES PROTÉINES

Afin de générer des matrices de plots sur le support, un automate de dépôt non contact a été utilisé (*spotter SciFlex Arrayer S1*). Cet appareil utilise la même technique de dépôt que le robot de pipetage *spotter SciFlex Arrayer S3* décrit pour le dépôt automatisé du toluène (2.1.1.3). Il est ainsi possible d'obtenir des plots uniformes et réguliers, correspondant à un volume précis. L'ensemble du processus est contrôlé informatiquement grâce à un logiciel qui permet de fixer les positions, les volumes prélevés et déposés ainsi que la forme de la matrice désirée. Dans un premier temps la solution de dépôt est prélevée par un capillaire en verre (pdc80). Le bras articulé de l'automate permet ensuite le déplacement du capillaire jusqu'à le positionner devant une caméra afin de contrôler la forme et la direction des gouttes éjectées. Si les gouttes sont valides, le capillaire est déplacé jusqu'à la position

du premier plot. Le dépôt est effectué et le capillaire est déplacé à la position du plot suivant, et ainsi de suite pour toutes les positions désirées pour cette solution. Après plusieurs cycles de lavage du capillaire, une nouvelle solution est prélevée et l'automate opère un nouveau cycle de dépôts. Cet automate est équipé d'un système de contrôle de la température et l'humidité.

Les paramètres fixés (nombre de gouttes ou volume déposé, écartement entre les plots, taille et disposition de la matrice de plots) ont été optimisés pour les différentes solutions utilisées et seront détaillés dans chacune des parties correspondantes.

### 2.3. DÉPÔT DE FIBRONECTINE

Afin de créer un contraste d'adhésion cellulaire, 2,5 nL d'une solution de fibronectine à une concentration de 200 µg/mL ont été déposés de façon organisée sur le support recouvert de PEO de la biopuce. Chaque plot est espacé de 1 µm afin d'éviter la migration des cellules d'un plot à l'autre. La matrice de plots est l'image miroir de la matrice des plots d'anticorps déposés sur le prisme de SPRi.

### 2.4. DÉPÔT DES ANTICORPS

L'automate de pipetage a permis d'immobiliser différents anticorps sur le même prisme. 2 nL d'anticorps anti-PSA, anti-B2M et anti-CRP ont été déposés à une concentration de 200 µg/mL. Chaque plot d'anticorps est espacé de 1 mm.

### 3. CULTURE CELLULAIRE

#### 3.1. CELLULES HELA

Les tests de mise au point de la biopuce ont été réalisés à l'aide de cellules de la lignée HeLa (fibroblastes humains). Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté par 10% (v/v) de SVF ainsi que 10 mg/mL de pénicilline/streptomycine et 250 µg/mL de fungizone. Elles sont maintenues à 37°C, sous atmosphère humide enrichie en CO<sub>2</sub> (5%). Ces cellules adhérentes sont ensuite décrochées de la boîte par hydrolyse des protéines d'adhésion et chélation des ions divalents grâce à 5 minutes d'incubation à 37°C dans une solution de trypsine-EDTA 5%. Les cellules sont ensuite re-suspendues dans du milieu de culture afin d'inhiber l'action de la trypsine puis centrifugées à 135 g pendant 5 minutes. Elles sont finalement reprises dans 1 mL de milieu de culture puis comptées à l'aide d'une cellule de comptage de type Malassez et réensemencées à la concentration souhaitée.

#### 3.2. CELLULES ISSUES DE CARCINOME DE LA PROSTATE

Afin de détecter des molécules sécrétées par les cellules, la biopuce a ensuite été utilisée avec une lignée cellulaire issues de carcinome de la prostate : les cellules LNCaP (ATCC-CRL-1740) (Horoszewicz *et al.*, 1983). Ces cellules ont la particularité de sécréter un antigène prostate-spécifique (PSA) de façon androgéno-dépendante (Kollara *et al.*, 2003). Ces cellules sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% (v/v) de SVF ainsi que 10 mg/mL de pénicilline/streptomycine et 250 µg/mL de fungizone. Elles sont maintenues à 37°C, sous atmosphère humide enrichie en CO<sub>2</sub> (5%). Ces cellules sont ensuite décrochées de la boîte grâce à une incubation pendant 5 minutes à 37°C dans de la trypsine-EDTA 5%. Les cellules sont ensuite re-suspendues dans du milieu de culture puis centrifugées à 135 g pendant 5 minutes. Elles sont reprises dans 1 mL de milieu de culture puis comptées à l'aide d'une cellule de type Malassez et réensemencées à la concentration souhaitée.

### 3.3. OBTENTION DE TRANSFORMANTS STABLES DES CELLULES HELA ET LNCAP

Deux plasmides codant pour des protéines fluorescentes, l'EGFP et la mCherry, ont été utilisés (Figure 38).

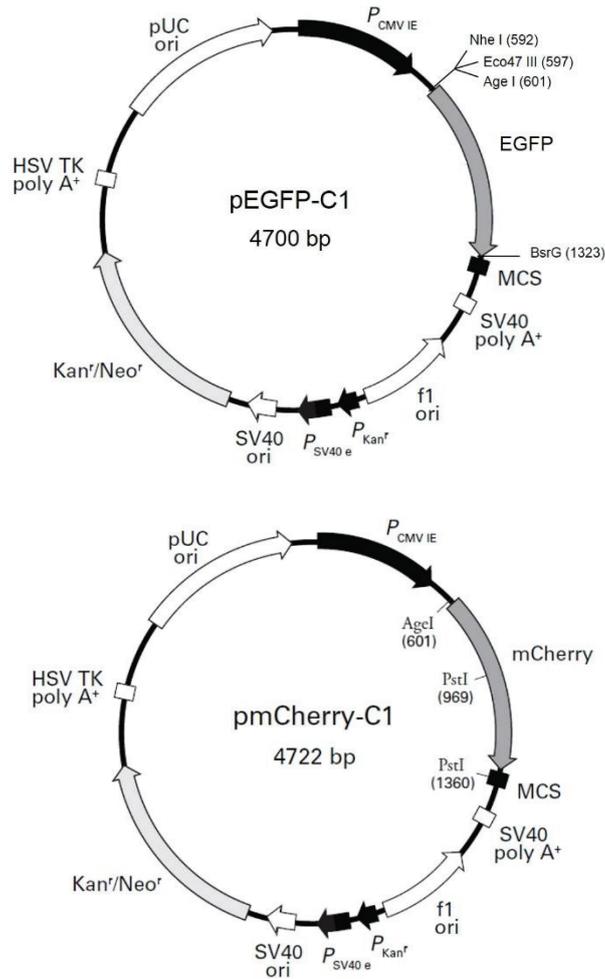


Figure 38 : Carte des plasmides utilisés pour les transfactions.

Les cellules,ensemencées la veille de la transfection à raison de  $1,5 \cdot 10^6$  cellules par boîte de 100 mm de diamètre, sont transfectées par lipofection en présence d'un lipide cationique, la lipofectamine®, permettant la formation de liposomes de fusion. Chaque transfection est réalisée pendant 3 heures à

37°C en présence de 6,7 µg de plasmides et de 40 µL de lipofectamine®. Les plasmides utilisés, pEGFP et pmCherry, portent le gène *néo*, un gène de résistance à la néomycine. La sélection des clones stables est ainsi réalisée en additionnant de la généticine (G418) à une concentration de 300 µg/mL au milieu de culture cellulaire 24 heures après la transfection pour les cellules LNCaP et à une concentration de 500 µg/mL pour les cellules HeLa.

Après 15 à 20 jours de sélection, des clones isolés sont récupérés puis amplifiés. Les clones sont ensuite sélectionnés selon leur capacité à produire la protéine rapportrice.

### 3.4. TRANSFECTION *IN SITU* DES CELLULES HELA

1,6 nL de solutions de transfection (17 µL DMEM, 5 µL fibronectine 0,1%, 1 µL plasmide 0,8 µg/mL + 2 µL lipofectamine) sont déposées de façon localisée dans les micropuits de la puce à l'aide du robot de pipetage. Deux plasmides sont utilisés : le plasmide pEGFP et le plasmide pmCherry. La puce est ensuite placée pendant 1 heure à + 4 °C.  $5 \cdot 10^3$  cellules sont alors déposées sur la surface de la puce. Après 1 heure à 37°C, du milieu de culture (DMEM) est ajouté afin de recouvrir la biopuce.

## 4. MISE EN CONTACT DES CELLULES SUR LE SUPPORT

### 4.1. MISE EN CULTURE SUR LE SUPPORT

Après stérilisation du support pendant 30 minutes sous UV, ce dernier est immergé dans 8 mL d'une solution de cellules à une concentration de  $2 \cdot 10^6$  cellules/mL et mis en culture à 37°C, sous atmosphère humide enrichie en CO<sub>2</sub> (5%).

## 4.2. DÉPÔT AUTOMATISÉ DES CELLULES DANS L'ALGINATE

Les cellules sont mises en solution dans une solution d'alginate/milieu de culture 1% (m/v). 20 nL de cette solution (diamètre du microcapillaire : 80  $\mu\text{m}$ ), puis 20 nL d'une solution de dichlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) 100 mM sont déposées par le robot de pipetage (*spotter* SciFlex Arrayer S1). Afin de maintenir au maximum l'hydratation des plots d'alginate avant le dépôt du calcium et la formation de l'hydrogel, la température de l'enceinte de l'automate est réglée à 12°C et l'humidité est fixée à 50%. Le support est ensuite placé dans l'incubateur à 37°C et sous atmosphère humide enrichie en  $\text{CO}_2$  (5%) pendant 5 minutes. Du milieu de culture supplémenté en  $\text{CaCl}_2$  (2mM) est ensuite ajouté puis le support est mis en culture pendant 24h (Figure 39).

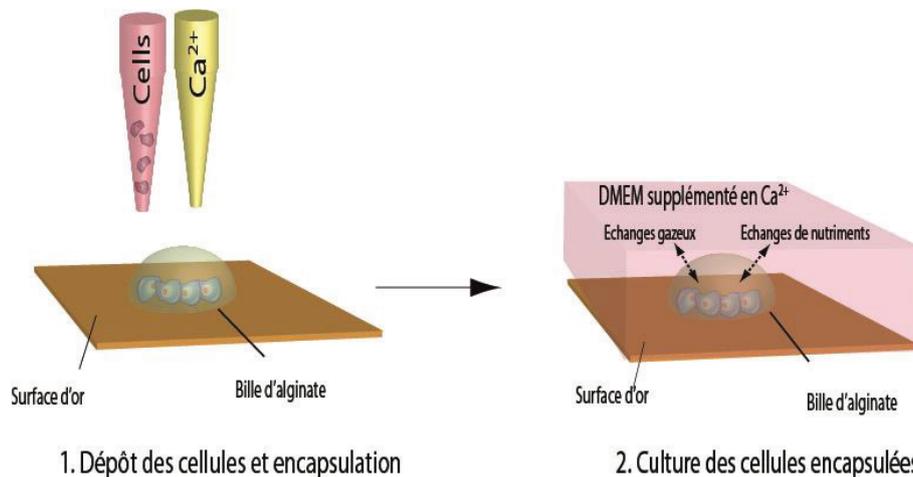


Figure 39 : Schéma du principe de dépôt automatisé des cellules en solution dans l'alginate.

## 5. MARQUAGE DES CELLULES ET OBSERVATION DE LA FLUORESCENCE EN MICROSCOPIE

Les cellules peuvent être observées par fluorescence. Il est pour cela nécessaire de réaliser des marquages par des fluorophores. Après fixation des cellules pendant 30 minutes dans du formaldéhyde (Sigma Aldrich) à une concentration de 3,7% (v/v), perméabilisation des membranes

pendant 10 minutes dans du triton X100-PBS à une concentration de 0,1% (v/v), et passivation pendant 30 minutes dans du PBS-SVF à une concentration de 5% (v/v), différents marquages sont réalisés.

### 5.1. MARQUAGE DES CELLULES

Les cellules sont incubées 40 minutes à température ambiante avec de l'*Alexafluor 546®-labelled phalloïdine*. La phalloïdine se lie spécifiquement à l'interface entre les sous-unités d'actine F, bloquant les sous-unités adjacentes ensemble. Couplée à un analogue fluorescent, elle permet la visualisation du cytosquelette d'actine.

Les cellules sont ensuite incubées 40 minutes à température ambiante avec un anticorps anti-vinculine couplé à un fluorophore, le *FITC* (Sigma). Ce marquage permet la coloration de la vinculine, protéine membranaire du cytosquelette présente au niveau des plaques d'adhésion focale.

Les cellules sont enfin incubées pendant 20 minutes à température ambiante avec du DAPI (Invitrogen) à une concentration de 300 nM. Le DAPI est un agent intercalant de l'ADN, il permet la coloration des noyaux.

### 5.2. MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE

Les cellules marquées sont ensuite observées à l'aide d'un microscope équipé d'une source et d'un filtre fluorescents (Tableau 4).

	$\lambda$ excitation	$\lambda$ émission	Couleur observée
Phalloïdine	556 nm	573 nm	rouge
Anti-vinculine FITC	495 nm	521 nm	verte
DAPI	358 nm	461 nm	bleue

Tableau 5 : Longueurs d'onde caractéristiques des fluorophores utilisés.

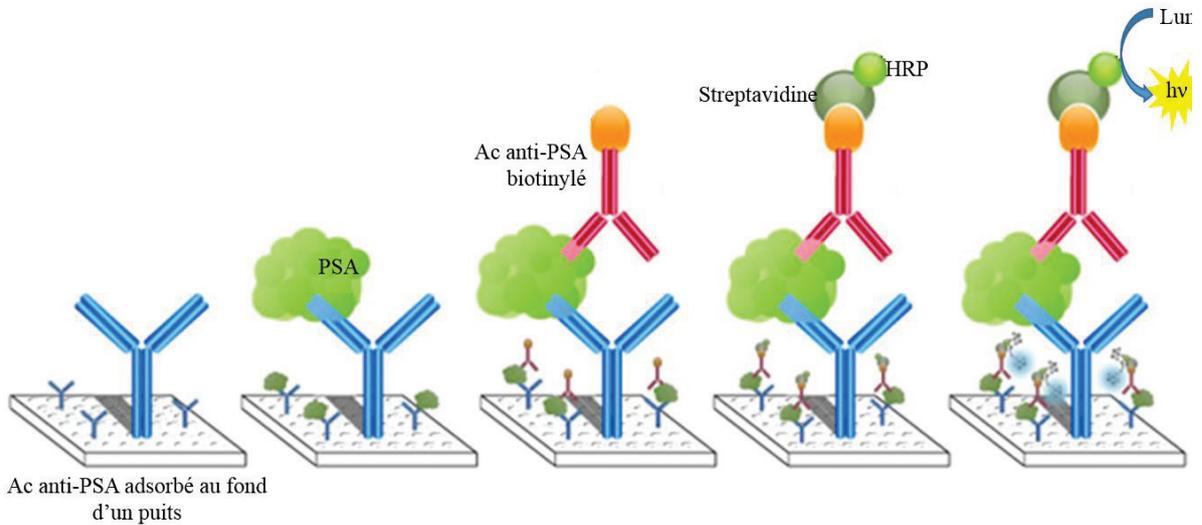
## 6. QUANTIFICATION DU PSA SÉCRÉTÉ

### 6.1. ELISA

Afin de quantifier le PSA sécrété par les cellules LNCaP après induction par ajout de 10 nM de dihydrotestostérone (DHT, Sigma Aldrich) à J0, des prélèvements de surnageant de culture cellulaire ont été réalisés à J+1, J+2, J+3, J+4, J+8, J+9 et J+10. Un test ELISA de type sandwich (Figure 40-a) a été réalisé selon le protocole suivant :

1. *Coating* : 50  $\mu$ L anticorps anti-PSA à une concentration de 15  $\mu$ g/mL sur la nuit à 4°C
2. Lavage 3 x 150  $\mu$ L PBS
3. Saturation 1h à 37°C avec 100  $\mu$ L Low Cross Buffer dilué au 1/5<sup>e</sup> dans du PBS
4. Lavage 3 x 150  $\mu$ L PBS
5. Incubation de 50  $\mu$ L échantillons à analyser ou PSA commercial pour la gamme étalon 1h à 37°C
6. Lavage 3 x 150  $\mu$ L PBS
7. Incubation de 50  $\mu$ L anticorps anti-PSA biotinylés à une concentration de 0,6  $\mu$ g/mL 1h à 37°C
8. Lavage 3 x 150  $\mu$ L PBS
9. Incubation de 50  $\mu$ L streptavidine/HRP à une concentration de 1  $\mu$ g/mL 1h à 37°C
10. Lavage 3 x 150  $\mu$ L PBS
11. Détection par chimiluminescence (Figure 40-b)

a)



b)

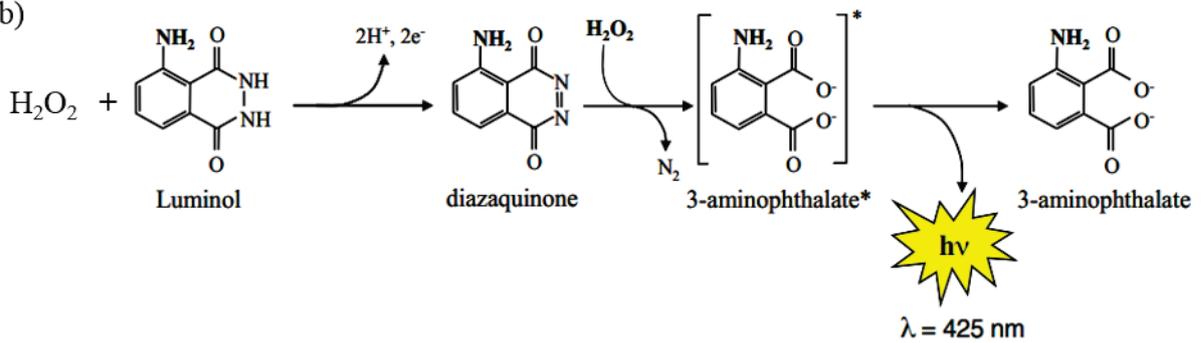


Figure 40 : a) Principe du test ELISA réalisé, b) Réaction de chimiluminescence mise en jeu.

## 6.2. SPRi

Un faisceau de lumière polarisée monochromatique est dirigé sur un prisme recouvert d'une surface d'or selon un angle tel que le faisceau soit entièrement réfléchi afin de voir apparaître une onde évanescente qui se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde. Cette onde évanescente engendre une oscillation des électrons libres de l'or, c'est la

résonance des plasmons de surface. Cette résonance induit une chute de l'intensité du faisceau réfléchi pour un angle incident donné, l'angle de résonance. Ce dernier varie selon l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent. Ainsi, toute molécule se situant dans le champ évanescent et interagissant avec la surface modifiera l'indice de réfraction du milieu, entraînant une modification de l'angle de résonance. Toute augmentation de masse sur la surface entraîne alors une augmentation d'indice. Les variations de réflectivité engendrées par les variations d'angle de résonance sont mesurées à angle fixe en fonction du temps et en fonction d'une position sur la surface (Figure 41). Cet angle de mesure est le maximum de la pente de réflectivité qui procure la meilleure sensibilité.

Les mesures sont réalisées avec le SPRI-Lab+ (Horiba Jobin Yvon).

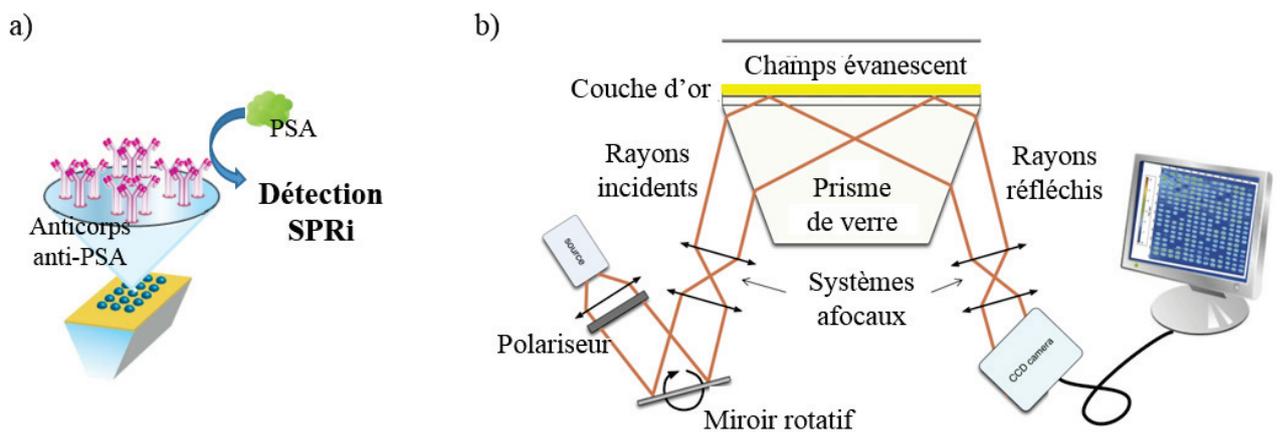


Figure 41 : Imagerie par résonance des plasmons de surface.

a) Principe de la réaction antigène/anticorps détectée par SPRI, b) Schéma représentant le principe de la SPRI.





---

## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

---



L'état de l'art présenté précédemment a montré un manque au niveau du multiplexage des cellules. En effet, la plupart des puces à cellules consiste en plusieurs centaines voire milliers de cellules individualisées généralement issues de la même lignée cellulaire. Il est également possible d'avoir plusieurs phénotypes de cellules issues d'une même lignée grâce notamment à la transfection *in situ*. Cependant, peu d'exemples de biopuces permettent la co-culture de différentes lignées de cellules en parallèle sur la même puce. C'est pourquoi nous avons voulu concevoir une puce à cellules où plusieurs lignées de cellules adhérentes pourront être co-cultivées.

Afin de pouvoir suivre la réponse en temps réel et sans marquage de ces cellules à différents inducteurs, la SPRi a été choisie comme méthode de détection.

À partir de ces deux exigences, nous avons conçu une biopuce simple et peu coûteuse à fabriquer, où des techniques de modifications de surfaces et d'encapsulation ont été combinées.

La puce à cellules ainsi réalisée devra permettre le suivi en temps réel de la sécrétion de molécules par une centaine de petites populations différentes de cellules adhérentes dans l'objectif final d'un projet d'étude multiplexe de promoteurs impliqués notamment dans les processus de tumorigenèse et la réponse aux agents anticancéreux (récepteurs nucléaires et voie de signalisation wnt/ $\beta$ -caténine)

## 1. PREMIÈRE APPROCHE : CELLULES IMMOBILISÉES DANS DES MICROPUIITS

Dans le but de détecter les molécules sécrétées par des cellules grâce à une biopuce, nous avons choisi la SPRi comme méthode de détection. En effet, cette technique présente deux avantages majeurs : suivi en temps réel et ne nécessite pas de marquage. Cependant, il est indispensable d'avoir une surface d'or. Les cellules étant adhérentes sur l'or, il est indispensable de microtexturer cette surface afin de réaliser un contraste d'adhésion pour pouvoir étudier des petites populations de cellules (de 1 à 100). Nous avons donc choisi de recouvrir la surface d'or d'une fine couche de polystyrène par dépôt centrifuge ou *spin coating*. Le polystyrène a des propriétés non adhérentes et est facilement soluble dans du toluène. Cette couche de polystyrène pourra donc être dissoute localement par du toluène afin de créer des micropuits dont le fond révélera la couche d'or (Figure 42). Ces micropuits serviront alors de micro-chambres pour la culture et l'analyse de petits groupes de cellules.

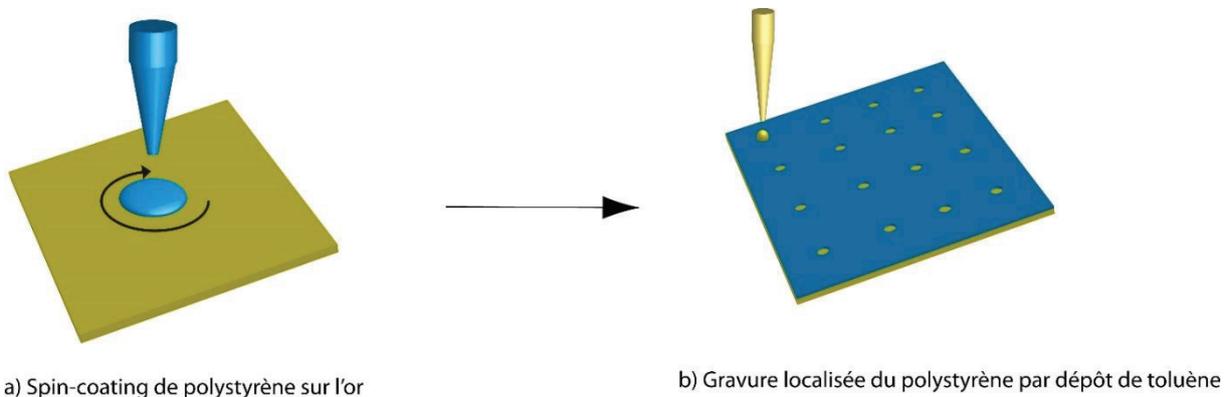


Figure 42 : Préparation des supports par dépôt centrifuge d'une solution de polystyrène et formation de trous par dépôt de faibles volumes de toluène.

## 1.1. MICROFABRICATION

### 1.1.1. OPTIMISATION DES PARAMÈTRES

Différents facteurs tels que le volume de la solution de polystyrène déposé, la concentration de cette solution et les paramètres du *spin-coater* ont été optimisés afin d'avoir une couche homogène de polystyrène suffisamment fine pour pouvoir être entièrement trouée par 3 gouttes de toluène au maximum car plus on augmente le nombre de gouttes plus on augmente le risque que toutes les gouttes ne soient pas totalement superposées du fait de la volatilité du toluène. Nous avons choisi des paramètres initiaux que nous avons ensuite fait varier un par un. La première condition testée était de déposer 250  $\mu\text{L}$  d'une solution de polystyrène à une concentration de 100 mg/mL dans le *spin coater* à une vitesse de 2000 tours/min après une accélération à 200 tours/min/s. Cette première couche de polystyrène formée a été trouée localement par dépôt de trois gouttes de toluène pour créer des micropuits sur la surface puis analyser par profilométrie.

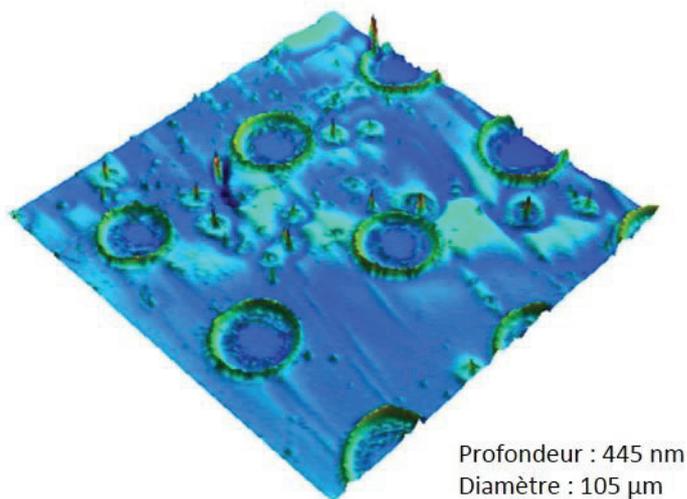


Figure 43 : Représentation 3D des micropuits obtenus sur la couche de polystyrène avec les paramètres initiaux testés par analyse en profilométrie.

Nous avons tout d'abord fait varier l'accélération du *spin coater* entre 200 tours/min/s et 400 tours/min/s. Les dimensions des micropuits obtenus sont présentées dans le Tableau 5.

Accélération du <i>spin coater</i> (tours/min/s)	Profondeur des puits (nm)	Diamètre des puits ( $\mu\text{m}$ )
200	680	50
300	600	90
400	210	105

*Tableau 6 : Dimensions des micropuits obtenues par analyse en profilométrie en fonction de l'accélération du spin coater pour atteindre une vitesse de 3000 tours/min.*

Après 5 secondes d'accélération à 400 tours/min/sec pour atteindre 2000 tours/min la couche de polystyrène est sèche. La formation du film se fait donc très rapidement. Le temps et la vitesse d'accélération sont donc les seuls paramètres de l'appareil qui influencent les propriétés de la couche de polystyrène formée.

Le dernier paramètre à tester est donc la concentration de la solution de polystyrène. Des solutions de concentrations différentes ont donc été préparées et déposées sur des supports différents en utilisant les paramètres retenus précédemment. Après dépôt de 3 gouttes de toluène, la profondeur des micropuits formés a été déterminée par analyse en profilométrie et les résultats obtenus sont présentés ci-dessous (Tableau 7).

Concentration de la solution de polystyrène (mg/mL)	Profondeur des micropuits (nm)
50	225
75	280
100	350
125	400

*Tableau 7 : Profondeur des micropuits en fonction de la concentration de la solution de polystyrène déterminée grâce à une analyse en profilométrie.*

La concentration de la solution de polystyrène est donc un autre paramètre influençant l'épaisseur de la couche formée. En effet, plus la concentration de la solution augmente, plus l'épaisseur de la couche augmente. C'est donc la plus petite concentration de la solution qui sera conservée pour la suite.

### 1.1.2. PRÉPARATION DES SUPPORTS

La surface d'or a donc été recouverte par une couche de polystyrène de  $300 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$  grâce à un dépôt centrifuge de  $250 \text{ } \mu\text{L}$  d'une solution de polystyrène/toluène  $50 \text{ mg/mL}$ . Il a ensuite été possible de structurer localement la couche de polystyrène par dépôt de faibles volumes de toluène afin de créer des micropuits dont le fond révèle la surface d'or. Ceci permettra de cultiver les cellules de manière locale grâce à la préférence d'adhésion des cellules sur l'or. Deux types de capillaires de dépôt de diamètre différent ont été utilisés. Le premier, un PDC40, permet de déposer des gouttes d'environ  $100 \text{ pL}$ . Le second, un PDC80, permet, quant à lui, de déposer des gouttes d'environ  $300 \text{ pL}$ . Le nombre de gouttes ainsi que le volume de toluène déposé ont été optimisés afin de trouer complètement la couche de polystyrène et d'avoir des micropuits les plus petits possibles.

### 1.1.3. CARACTÉRISATION DES SURFACES

Les dimensions de ces puits ont été déterminées par analyse profilométrique à balayage optique. La variation de la taille des gouttes déposées ou du nombre de gouttes a permis d'optimiser la taille des micropuits. Par exemple, le dépôt de  $3 \times 100 \text{ pL}$  (Figure 44-a et b) de toluène conduit à la formation de micropuits d'un diamètre moyen de  $285 \text{ } \mu\text{m}$  ( $\pm 15 \text{ } \mu\text{m}$ , avec 94,75% de reproductibilité). Le dépôt de  $3 \times 300 \text{ pL}$  (Figure 44-c et d) de toluène génère des micropuits plus larges avec un diamètre moyen de  $400 \text{ } \mu\text{m}$  ( $\pm 15 \text{ } \mu\text{m}$ , avec 96,25% de reproductibilité). L'augmentation du nombre de gouttes de toluène conduit à une augmentation du diamètre des micropuits mais cette valeur ne peut être réduite à moins de trois gouttes qui est le minimum pour complètement trouer la couche de polystyrène de  $300 \text{ nm}$ . Pour la suite des expériences, le PDC 80 a été utilisé (volume d'une goutte d'environ  $300 \text{ pL}$ ).

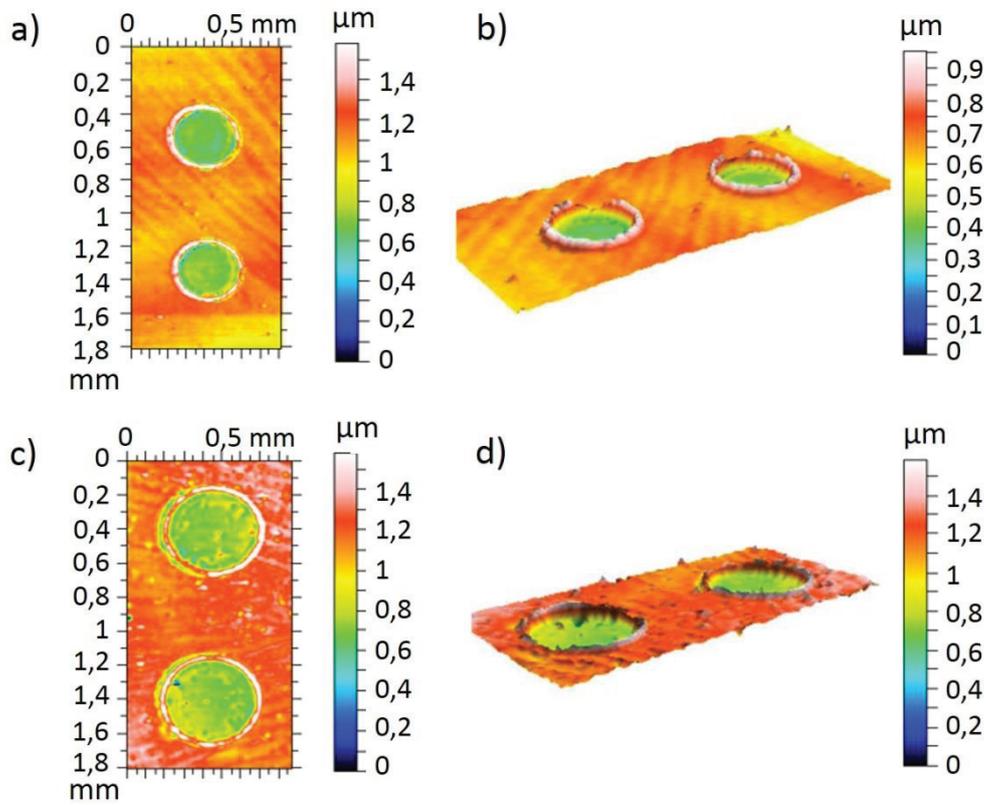


Figure 44 : Images obtenues par profilométrie à balayage optique.

a) vue du dessus de deux micropuits obtenus par dépôt de 3 gouttes de 100 pL, b) Représentation 3D de deux micropuits obtenus par dépôt de 3 gouttes de 100 pL, c) vue du dessus de deux micropuits obtenus par dépôt de 3 gouttes de 300 pL, d) Représentation 3D de deux micropuits obtenus par dépôt de 3 gouttes de 300 pL.

Des images de la surface ont ensuite été obtenues grâce à un microscope électronique à balayage. Cette technique a permis de confirmer les dimensions des puits et d'observer la surface de l'or qui en constitue le fond. La différence de densité électronique semble bien confirmer le fait que le fond des puits soit composé d'or et dépourvu de polystyrène (Figure 45).

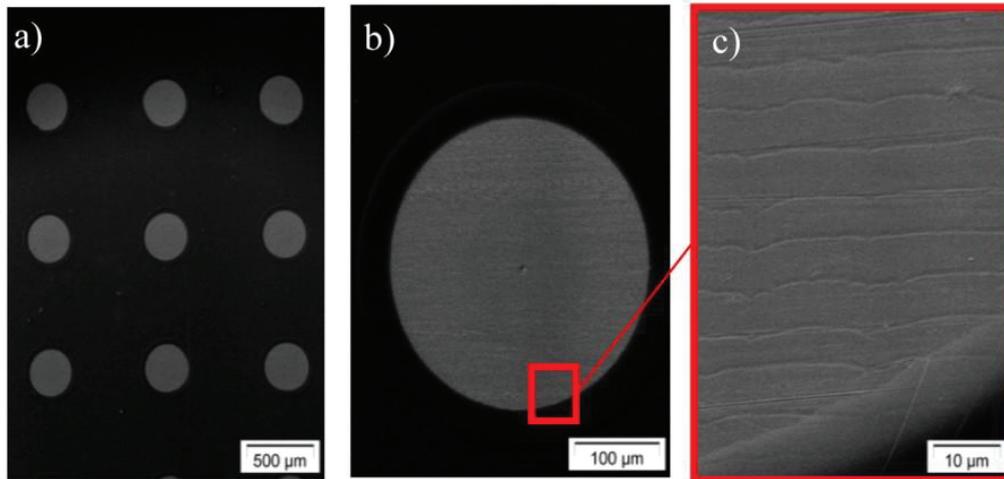


Figure 45 : Observation par microscopie électronique à balayage.  
a) vue de dessus d'une partie de la matrice, b) zoom sur un puits, c) fond d'un puits.

Par ailleurs, des analyses XPS et ToF-SIMS ont été réalisées à l'institut pour la protection des consommateurs et de la santé (*Institute for Health and Consumer Protection, IHCP*) du Centre Commun de Recherche (*Joint Research Center, JRC*) de la Commission européenne à Ispra (Italie). Les résultats suivants nous ont été fournis.

Les cartes de photoélectrons XPS du pic d'or  $4f_{7/2}$  (84,00eV) montrent que l'or n'est détecté que dans les micropuits indiquant que la couche de polystyrène a été suffisamment dissoute pour donner accès à la couche d'or (Figure 46-a). La carte C1s présentée sur la Figure 46-b indique la présence de carbone sur toute la surface. En fait, l'analyse micro spectroscopique de l'intérieur du micropuits a révélé la présence de carbone qui peut être liée à des traces de contamination du polystyrène gravé (Figure 46-c et d).

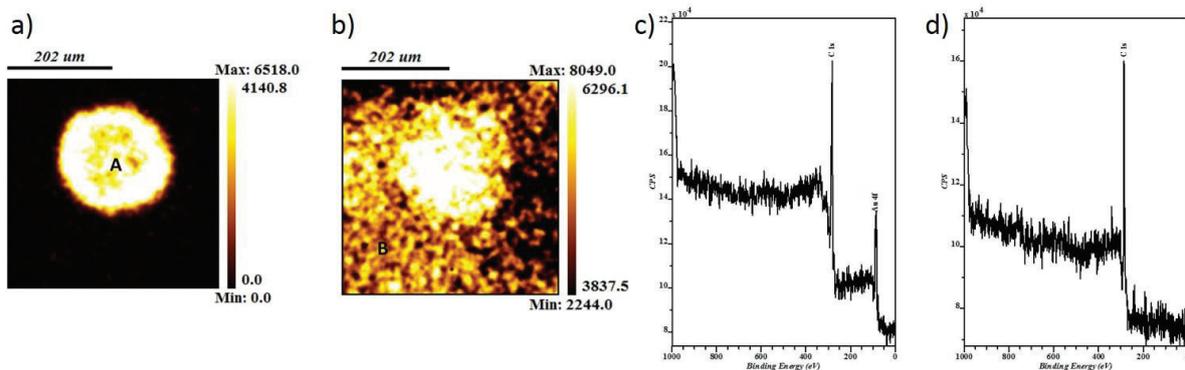


Figure 46 : Analyses XPS.

a) cartes parallèles XPS du signal de l'or (faible grossissement, énergie de transmission 80eV), b) cartes parallèles XPS du signal du carbone (faible grossissement, énergie de transmission 80eV), c) Spectre acquis à l'intérieur d'un micropuits (point A) et d) spectre acquis à l'extérieur du micropuits (point B) (MgK $\alpha$ , 160PE, taille d'un spot 100  $\mu$ m).

Ces résultats sont soutenus par l'analyse ToF comme illustré sur la Figure 50 où les cartes d'ions positifs d'un micropuits sont présentées. Bien que les pics de masse relatifs à l'or ne soient observés que dans les micropuits, les pics de masse du polystyrène sont également visibles à l'intérieur des micropuits, ce qui indique que les résidus de gravure du polymère sont présents. En effet, les pics de masse typiques de fragmentation du polystyrène tels que C<sub>4</sub>H<sub>3</sub> (m/z 51), C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (m/z 77), C<sub>7</sub>H<sub>7</sub> (m/z 91), C<sub>8</sub>H<sub>9</sub> (m/z 105) et C<sub>14</sub>H<sub>10</sub> (m/z 178) en ions positifs (Piwowar et al., 2008) (Figure 50) et tels que CH (m/z 13), C<sub>2</sub>H (m/z 25), C<sub>3</sub>H<sub>2</sub> (m/z 38), C<sub>4</sub>H (m/z 49), C<sub>4</sub>H<sub>3</sub> (m/z 51), C<sub>5</sub>H<sub>2</sub> (m/z 62) et C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (m/z 75) en ions négatifs (Eynde et al., 1997) (Figure 49) sont observés dans la partie de polystyrène, ainsi que dans les micropuits. Les cartes d'ions négatifs sont présentées en Figure 50. Néanmoins, à la fois le XPS et TOF-SIMS sont des techniques très tensio-sensibles. En particulier, la sensibilité de l'analyse XPS est estimée à environ 10 nm tandis que le TOF-SIMS sonde les deux premières couches atomiques de surface correspondant à environ 2-3nm (Vickerman *et al.*, 2009). De ce fait, le signal de l'or détecté par XPS et TOF-SIMS indique que l'épaisseur de la couche de polymère résiduel ne dépasse pas 2-4 nm au maximum.

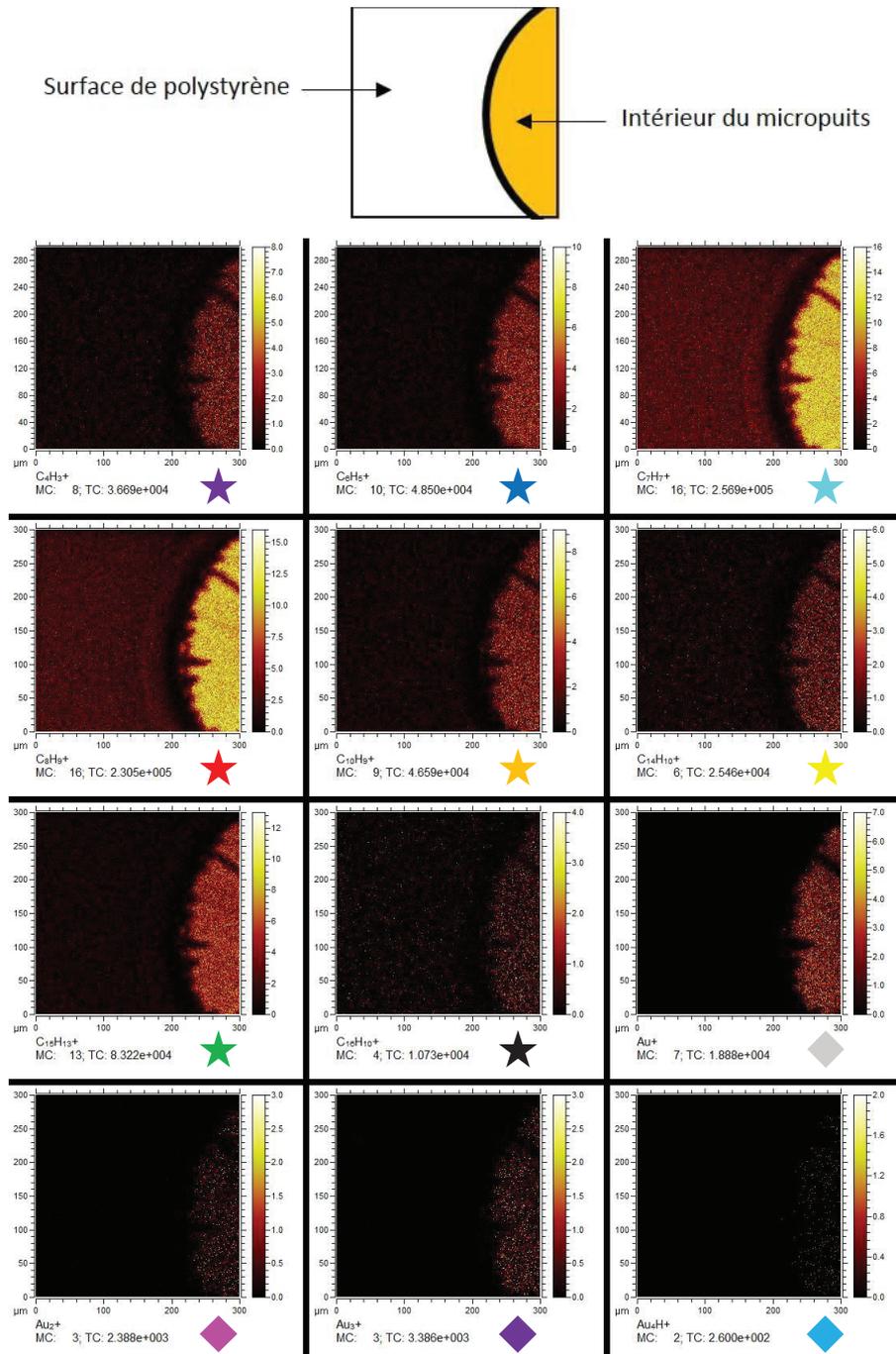


Figure 47 : Cartes chimiques d'ions positifs pour l'échantillon PS/Au à l'intérieur et à l'extérieur du micropuits (surface d'analyse  $50 \times 50 \mu m^2$ ).

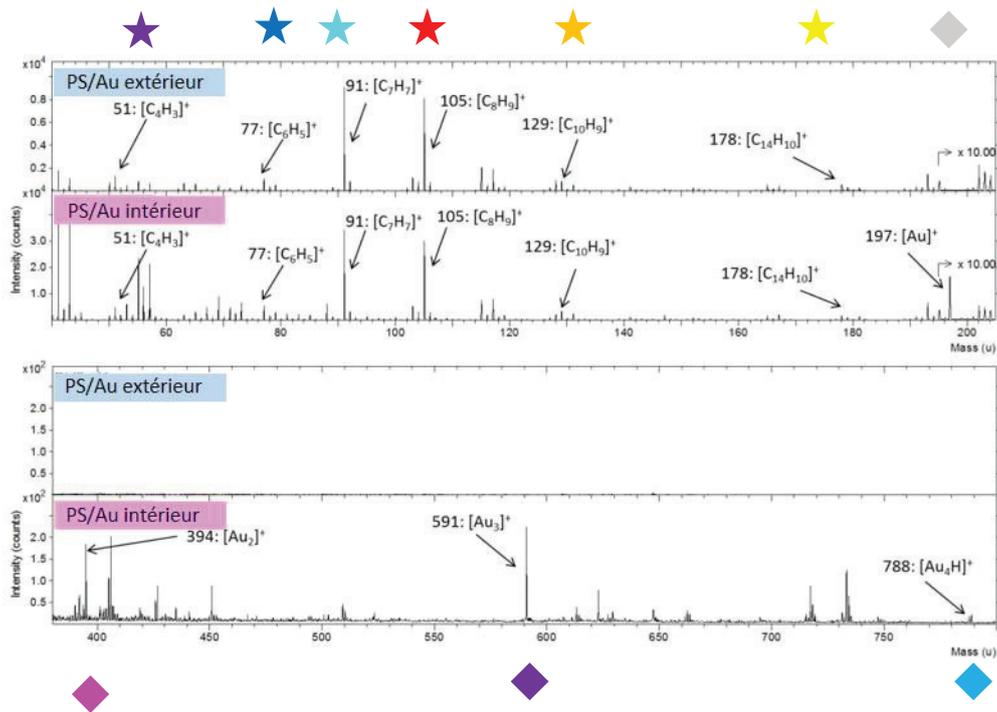


Figure 48 : Analyse ToF-SIMS. Portions du spectre de masse d'ions positifs pour l'échantillon PS/Au à l'intérieur et à l'extérieur du micropuits (surface d'analyse 50x50  $\mu\text{m}$ ) issues des cartes chimiques Figure 47.

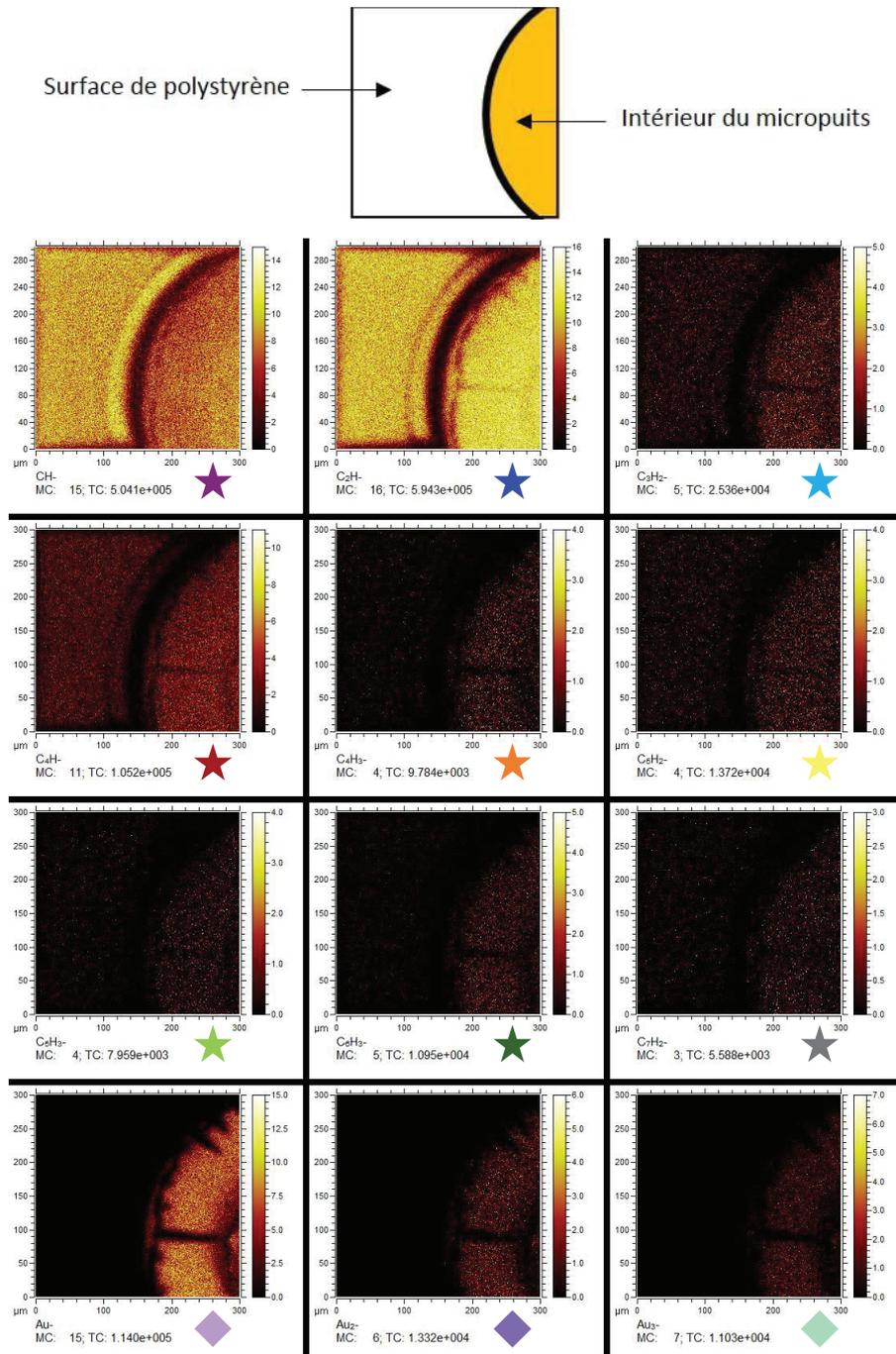


Figure 49 : Cartes chimiques d'ions négatifs pour l'échantillon PS/Au à l'intérieur (or) et à l'extérieur du micropuits (polystyrène) (surface d'analyse 50x50 μm).

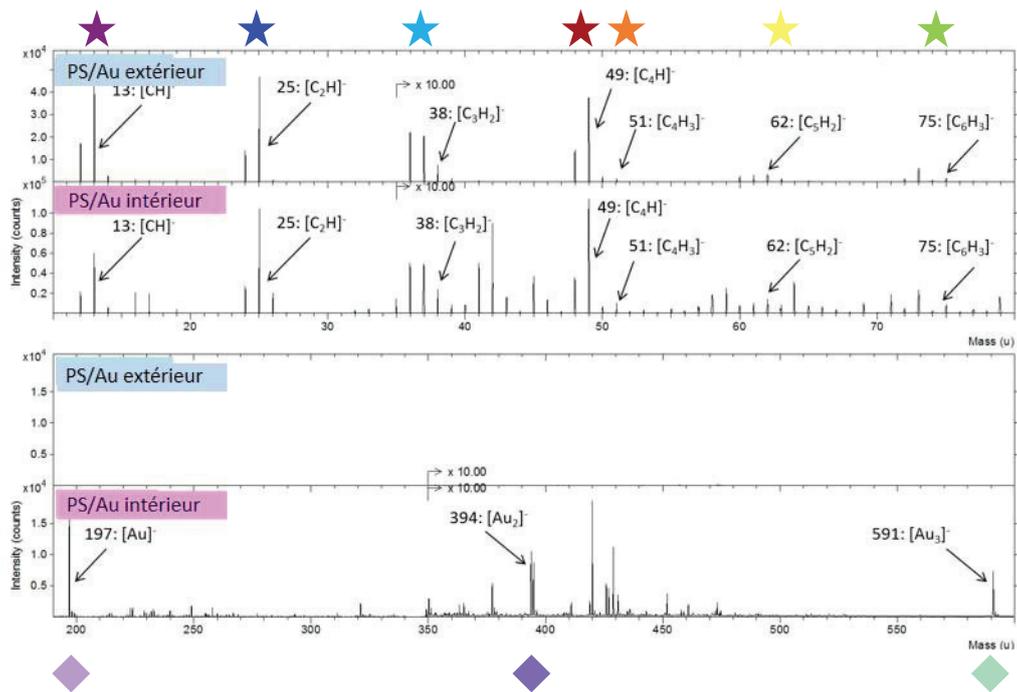


Figure 50 : Analyse ToF-SIMS. Portions du spectre de masse d'ions négatifs pour l'échantillon PS/Au à l'intérieur (or) et à l'extérieur du micropuits (polystyrène) (surface d'analyse 50x50  $\mu\text{m}$ ) issues des cartes chimiques Figure 49.

De plus, des mesures par SPRi ont été effectuées. La courbe de plasmon mesurée sur une surface d'or nue a été comparée à celle mesurée au fond des puits du support microstructuré et sur la surface de polystyrène. La courbe mesurée au fond des puits est similaire à celle mesurée sur l'or nu, tandis qu'il n'y a pas de plasmons significatifs sur la surface de polystyrène (Figure 51). Cela confirme à nouveau le fait que la surface du fond des micropuits du support microstructuré soit de l'or, permettant ainsi de réaliser la détection des signaux en SPRi. La présence de quelques résidus de polystyrène de 2-4 nm d'épaisseur semble avoir un faible impact sur les courbes de plasmon.

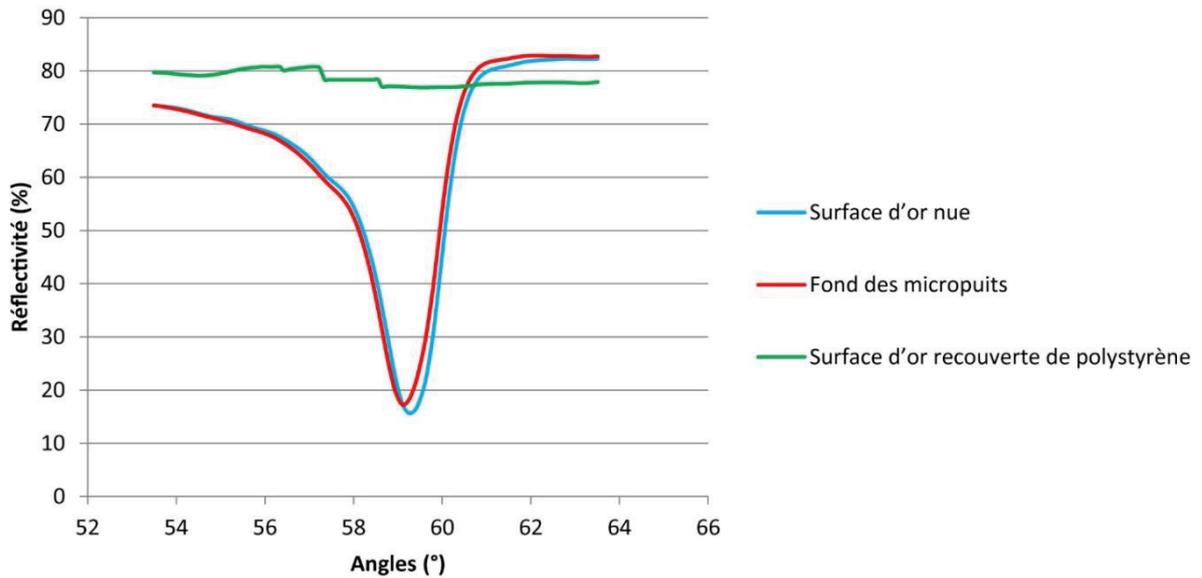


Figure 51 : Mesures de plasmons. Courbes mesurées sur de l'or nu, de l'or recouvert de polystyrène et au fond des micropuits (polystyrène troué découvrant la couche d'or).

## 1.2. CULTURE CELLULAIRE SUR LA PUCE

Afin de démontrer le contraste d'adhésion des cellules entre le polystyrène et l'or, des cellules HeLa ont étéensemencées sur le support pendant 24h. La biopuce est ensuite rincée deux fois par du PBS afin d'éliminer les cellules faiblement adhérentes (Figure 52).

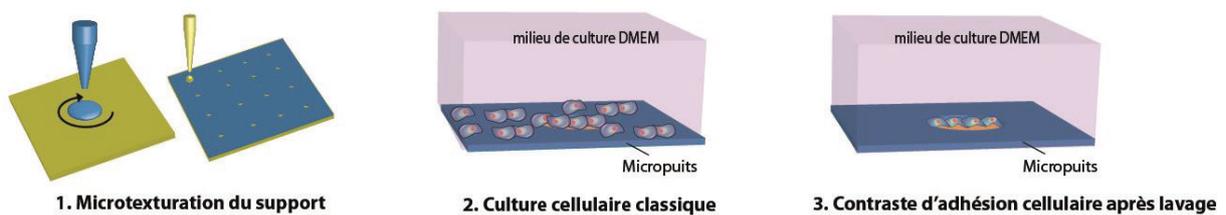


Figure 52 : Schéma de principe de la culture cellulaire localisée sur le support microtexturé.

Dans cette approche, le diamètre des micropuits va directement contrôler le nombre de cellules localisées. Un puits d'un diamètre de 400  $\mu\text{m}$  devrait contenir jusqu'à 150 cellules adhérentes (estimation calculée à partir de la taille moyenne d'une cellule HeLa adhérente, 22  $\mu\text{m}$  de diamètre).

Après 24h de culture cellulaire sur le support microtexturé, les cellules HeLa semblent avoir adhéré partout sans présenter de préférence pour les micropuits (Figure 53-a). Après deux rinçages par du PBS, il ne reste plus que les cellules adhérentes à l'intérieur des micropuits. Ces rinçages ont donc permis de décrocher les cellules qui sont à l'extérieur des micropuits sans détacher les cellules qui sont fortement adhérentes sur l'or au fond des micropuits (Figure 53-b).

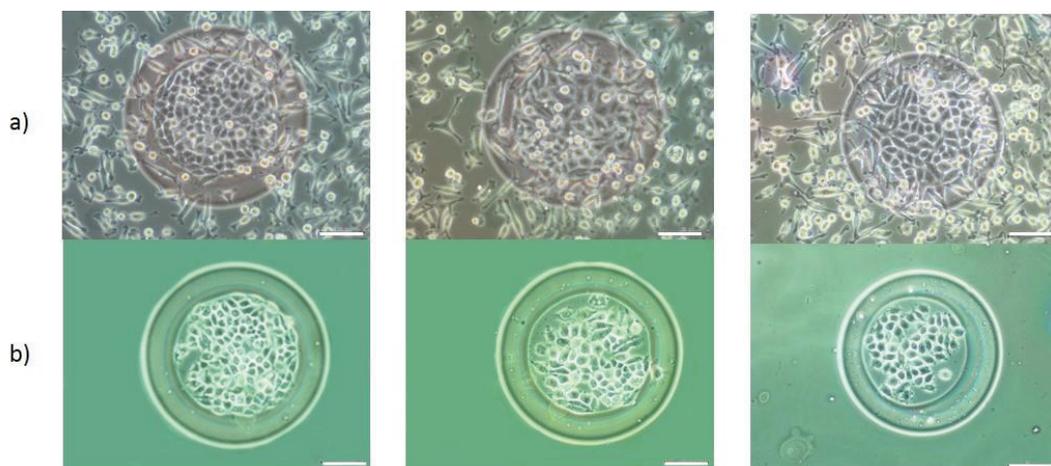
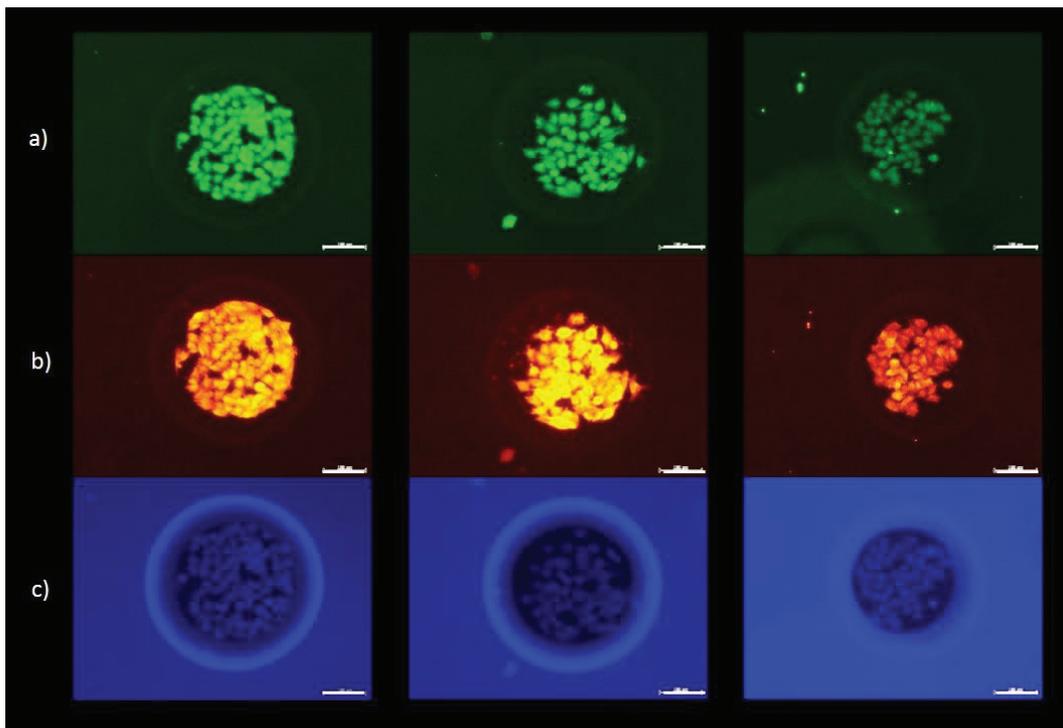


Figure 53 : Observation par microscopie optique des cellules HeLa mises en culture sur le support microstructuré à une concentration de  $2.10^6$  cellules/mL.

a) cellules HeLa en culture sur le support à  $t = 24\text{h}$ , b) après rinçage par du PBS et fixation (la barre d'échelle correspond à 100  $\mu\text{m}$ ).

Afin de caractériser davantage l'adhésion cellulaire au fond des micropuits, les interactions des cellules avec la surface ont été étudiées en utilisant un marquage spécifique des protéines de la matrice intracellulaire. L'immunocoloration positive de la vinculine (Figure 54-a) a permis de mettre en évidence les adhésions focales (Piwowar *et al.*, 2008). De plus, un vaste réseau d'actine du cytosquelette a été observé par marquage avec de la phalloïdine (Figure 54-b), caractéristique de l'adhésion des cellules HeLa à un support solide. En effet, la présence de filaments d'actine, un élément important de tous les types de complexes d'adhésion de la matrice (Eynde *et al.*, 1997), est

classiquement trouvé en grande quantité dans le cytoplasme des cellules adhérentes. Enfin, le marquage DAPI du noyau a permis de compter les cellules adhérentes (Figure 54-c). Comme attendu, 100 cellules ( $\pm 30$  cellules) ont été piégées dans un micropuits de  $400 \mu\text{m}$  (avec un taux de remplissage des micropuits par les cellules de 100%, taux calculé en comptant le nombre de micropuits remplis sur une puce avec une matrice de 100 micropuits).



*Figure 54 : Observation par microscopie de fluorescence des cellules HeLa mises en culture sur le support microstructuré à une concentration de  $2.10^6$  cellules/mL.*

*a) marquage anti-vinculine - FITC, b) marquage phalloïdine, c) marquage DAPI (la barre d'échelle correspond à  $100 \mu\text{m}$ ).*

De plus, des images en microscopie confocale ont été obtenues afin d'observer avec une meilleure résolution ces interactions (Figure 55).

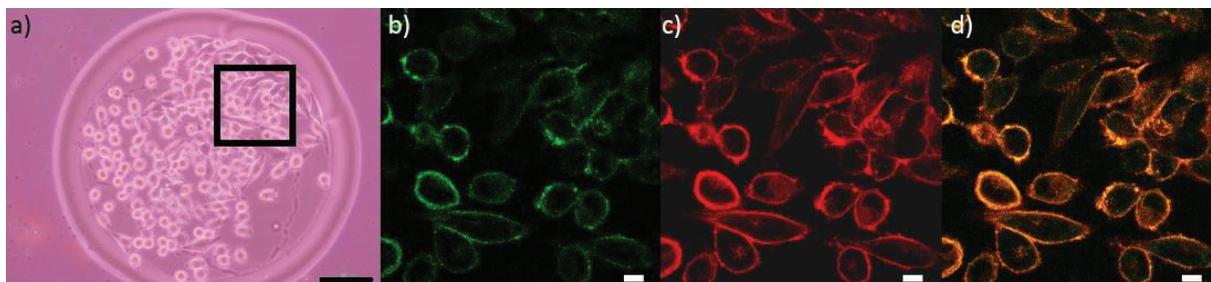


Figure 55 : Images obtenues en microscopie optique (a) et confocale (b, c, d) des cellules HeLa en culture dans les micropuits. a) Après 24h de culture et rinçage par du PBS, b) marquage anti-vinculine – FITC, c) marquage phalloïdine, superposition des deux marquages (la barre d'échelle noire correspond à 100  $\mu\text{m}$  et la barre d'échelle blanche correspond à 5  $\mu\text{m}$ ).

En conclusion, ces micropuits, formés grâce à un dépôt de toluène sur une fine couche de polystyrène, permettent bien de séquestrer les cellules grâce à la différence de composition entre l'intérieur (or) et l'extérieur (polystyrène) des micropuits, en utilisant une méthode classique de culture cellulaire.

### 1.3. TRANSFECTION *IN SITU*

Afin de répondre à une des exigences de multiplexage, il est nécessaire d'obtenir des cellules ayant plusieurs phénotypes différents sur un même support. C'est pourquoi, nous avons utilisé la méthode de transfection *in situ* (également appelée transfection inverse du fait que l'ADN est d'abord déposé sur le support avant d'être transfecté dans les cellules) afin d'avoir plusieurs phénotypes de cellules HeLa sur une même puce. Afin d'avoir une preuve de concept de la validité de cette technique avec la biopuce développée, nous avons utilisé deux plasmides qui codent pour une protéine fluorescente, le pmCherry et le p-eGFP. La composition de la solution de transfection a été optimisée afin d'avoir la meilleure efficacité possible.

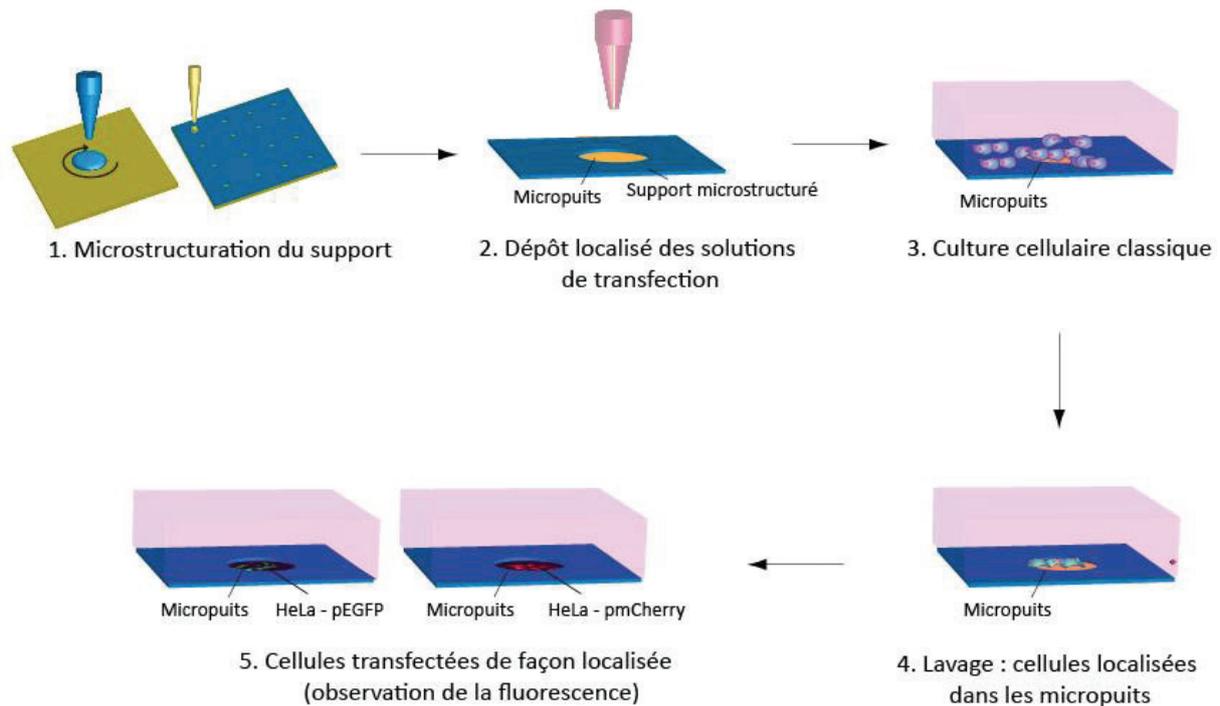


Figure 56 : Schéma de principe de la méthode développée pour transférer in situ des cellules HeLa dans les micropuits

Après 24 heures de culture, nous observons une efficacité de transfection de 35 % ( $\pm 3\%$ ) (taux calculé en prenant le ratio du nombre de cellules transfectées sur le nombre total de cellules par puits sur une matrice de 100 micropuits). Ce taux est comparable à l'efficacité qui peut être obtenue dans des conditions de transfection classique dans une boîte de Pétri. Par ailleurs, nous n'observons pas de contamination d'un puits à l'autre, preuve que la surface de polystyrène est une barrière efficace contre la diffusion des molécules et la migration cellulaire (Figure 57). Nous avons utilisé ici deux plasmides différents qui codent chacun pour une protéine fluorescente afin de prouver la validité de la méthode mais il serait possible, grâce à l'automate de dépôt, d'augmenter le nombre de plasmides à transférer et ainsi d'augmenter le taux de multiplexage. De la même manière, il serait possible de déposer des plasmides d'intérêt et d'étudier la fonction d'un gène en particulier. En revanche, cette méthode ne permet d'avoir qu'un seul type cellulaire par puce.

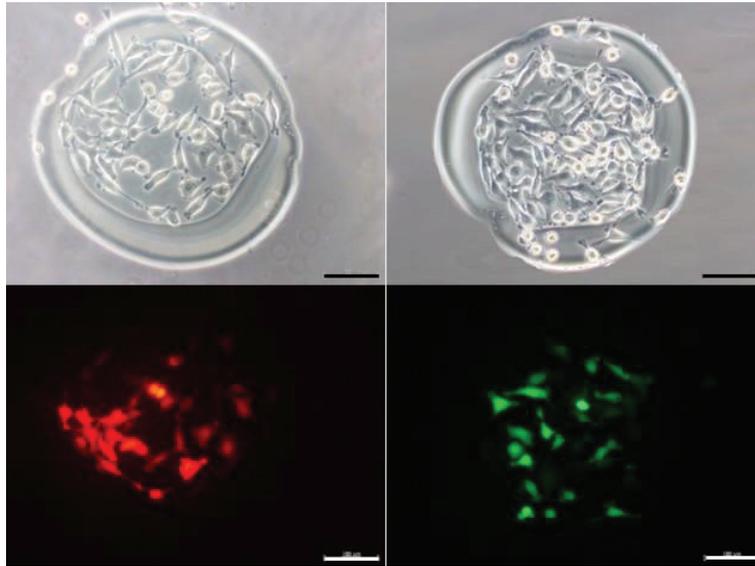


Figure 57 : Images par microscopie optique (haut) et de fluorescence (bas) de deux micropuits de la biopuce présentant des cellules HeLa transfectées in situ par les plasmides pmCherry (rouge) ou eGFP (vert).

#### 1.4. DÉPÔT AUTOMATISÉ DES CELLULES HELA DANS L'ALGINATE

Une autre possibilité de multiplexage est d'adresser spécifiquement les cellules dans un puits donné et ainsi de pouvoir cultiver différentes lignées de cellules sur une même puce. Cependant, le dépôt direct de cellules dans un volume aussi faible est difficilement reproductible et conduit, la plupart du temps, à un faible taux de survie du à l'évaporation de la solution déposée (même dans une atmosphère avec une humidité contrôlée (Yusof *et al.*, 2011)).

Nous avons donc choisi de développer une méthode de dépôt automatisé des cellules permettant la culture de cellules vivantes dans des micropuits en utilisant une technique d'encapsulation des cellules dans l'alginate pendant le dépôt des cellules. L'alginate a la propriété de gélifier instantanément dans des conditions douces en présence de calcium. La solution de dépôt est donc liquide dans le capillaire de l'automate, permettant un processus efficace. Les gouttes éjectées produisent rapidement une matrice de gel 3D lorsqu'elle touche la surface préalablement couverte par des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Le procédé a l'avantage d'être complètement biocompatible et le contraste d'adhésion apporté par le support

garantit que, même si les capsules d'alginate sont plus larges que les micropuits, les cellules à l'extérieur des puits n'adhéreront pas au support.

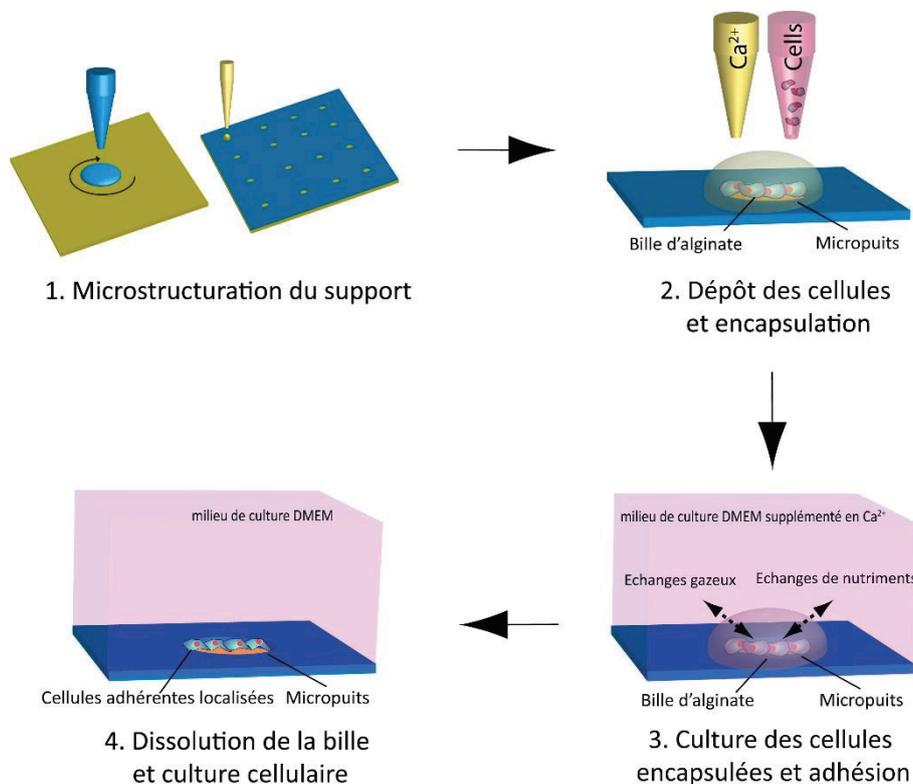


Figure 58 : Schéma de principe de la méthode développée pour l'encapsulation des cellules dans de l'alginate dans les micropuits.

Afin de former ces billes d'alginate, différents paramètres ont dû être optimisés tels que la concentration des solutions d'alginate et de calcium, le nombre de gouttes des solutions et la concentration en cellules. La concentration de la solution d'alginate a été déterminée notamment à cause de deux contraintes importantes : la dissolution de l'alginate dans le milieu de culture et la viscosité de la solution. En effet, nous ne sommes pas arrivés à faire une solution d'alginate plus concentrée que 4% (m/v). Cependant à cette concentration, la solution d'alginate est très visqueuse et aucune goutte ne peut être éjectée par l'automate de dépôt. Différentes concentrations ont alors été testées : 0,5%, 0,7%, 1% et 2%. Il a été possible de former des gouttes avec l'automate avec chacune de ces concentrations. Nous avons alors repris les cellules en suspension dans ces solutions

d'alginate. Nous avons pu constater que cela augmentait la viscosité de la solution et qu'il n'était alors plus possible d'éjecter une goutte avec une solution d'alginate à une concentration finale de 2%. Nous avons décidé de travailler à une concentration de 1% d'alginate finale pour la suite des expériences. Il a ensuite fallu déterminer la concentration de dichlorure de calcium en solution dans du milieu de culture nécessaire pour former une bille d'alginate de calcium. Pour cela, nous avons préparé une gamme de concentrations de 2 mM à 100 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Des billes ont pu être formées avec toutes les concentrations de calcium sur une lame de polycarbonate recouverte d'or. Cependant lorsque l'on recouvre ce support de milieu de culture supplémenté en  $\text{CaCl}_2$  2 mM, seules les billes formées avec une solution de  $\text{CaCl}_2$  à une concentration de 100 mM restent intactes après 48h à l'incubateur (nécessaire pour la culture ultérieure de cellules). C'est donc cette condition qui a été retenue. Nous avons ensuite voulu déterminer le volume minimal de la bille nécessaire à la survie des cellules. Pour cela, nous avons décidé de travailler avec une suspension de cellules à une concentration de  $2.10^6$  cellules/mL en solution dans l'alginate 1%. Cette concentration permet d'avoir environ 40 cellules/billes. Une gamme de concentrations de cellules a été réalisée ultérieurement et est décrite dans le paragraphe 2.2. Nous avons décidé de déposer le même volume pour les solutions de calcium et d'alginate afin d'avoir deux spots superposés de même diamètre (en théorie). Nous avons alors fait une gamme de spots en déposant de 12 nL à 24 nL de chaque solution. Le support a ensuite été mis en culture pendant 24h. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 8.

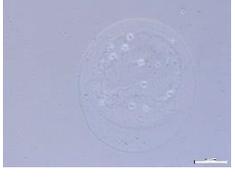
Volume déposé de chaque solution	12 nL	16 nL	20 nL	24 nL
Observation par microscopie optique				

Tableau 8 : Observation par microscopie optique des billes d'alginate formées en fonction du volume déposé.

À partir de 16 nL de chaque solution déposée les cellules semblent être vivantes dans les billes, mais au vue du faible écart de volume, nous avons préféré, par précaution, continuer à travailler avec des volumes de 24 nL.

La matrice d'alginate formée a donc apporté un double bénéfice ; elle maintient les cellules dans un environnement hydraté pendant le dépôt mais permet aussi les échanges d'oxygène et de nutriments entre les cellules et le milieu de culture tout en maintenant les cellules confinées dans les micropuits. Les cellules déposées présentent une forme arrondie et se développent dans un environnement 3D. Ce confinement 3D dans du milieu supplémenté en calcium a été maintenu pendant les premières 24 heures afin de permettre l'adhésion des cellules. Après 24 heures de culture, le gel d'alginate a été facilement dissout par rinçage avec du milieu de culture dépourvu en calcium, laissant ainsi les cellules adhérentes libres mais piégées dans les micropuits de la puce. Le nombre de cellules adhérentes par micropuits est alors de  $55 \pm 15$  avec un taux de dépôt des cellules dans l'alginate de 100% (taux calculé en comptant le nombre de micropuits avec une bille d'alginate qui encapsule les cellules). Un marquage mort/vivant par de l'iodure de propidium, agent intercalant des acides nucléiques qui pénètre dans les cellules mortes en traversant les membranes perméabilisées, a montré qu'une grande majorité des cellules déposées sont toujours vivantes après 72 heures. En effet, une seule cellule a été marquée positivement par l'iodure de propidium parmi tous les micropuits étudiés. Ces expériences nous ont permis de valider cette approche d'encapsulation *in situ* pour le dépôt de cellules vivantes sur une surface microstructurée.

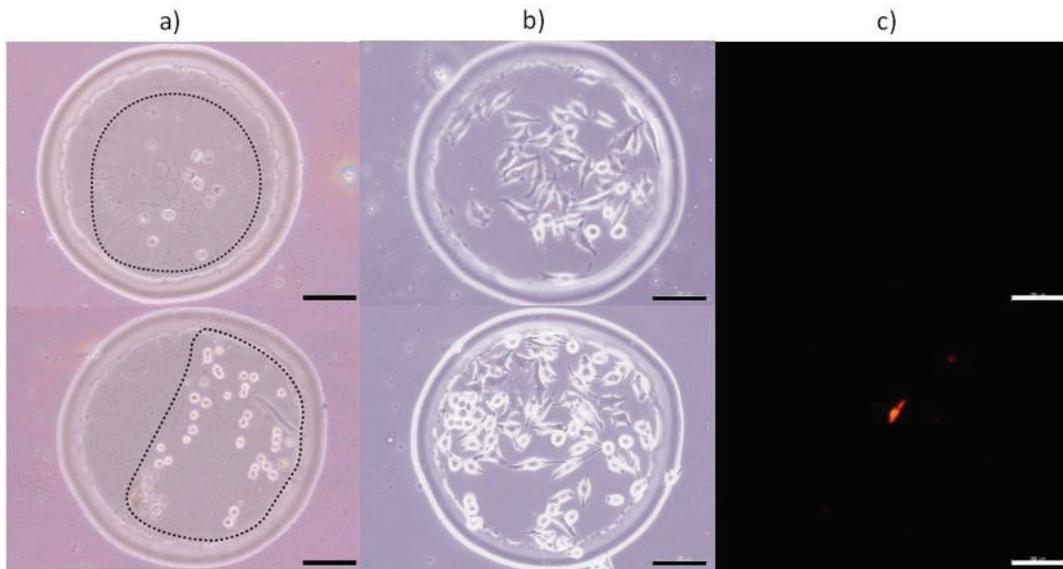


Figure 59 : Observation par microscopie optique et de fluorescence de cellules HeLa dans deux micropuits différents d'une puce.

a) Cellules HeLa encapsulées dans un gel d'alginate juste après le dépôt (les pointillés noirs délimitent la capsule d'alginate), b) cellules adhérentes à  $t = 72h$  après changement de milieu, c) marquage mort/vivant à  $t = 72h$ , on observe ici une seule cellule morte (fluorescente grâce au marquage par l'iodure de propidium) dans le puits du bas (les barres d'échelles représentent  $100 \mu m$ ).

### 1.5. CO-CULTURE DE CELLULES HELA

Afin de démontrer le potentiel du contrôle de localisation des cellules avec cette méthode d'encapsulation, deux lignées différentes de cellules HeLa, HeLa [+] et HeLa-eGFP ont été co-déposées sur la même puce. Les deux lignées de cellules ont été encapsulées au même moment dans des micropuits différents et cultivées pendant 24h avant d'être libérées de leur capsule d'alginate. La Figure 60 présente les images de microscopie optique et de fluorescence de quatre micropuits différents remplis soit avec des cellules HeLa [+] soit avec des cellules HeLa-eGFP après 72h de co-culture. Aucune cellule HeLa-eGFP n'a pu être observée dans les micropuits de HeLa [+], preuve que le contraste d'adhésion entre le polystyrène et l'or est une barrière efficace à la diffusion des cellules sur la surface de la puce. De plus, le processus d'encapsulation s'avère ici être un moyen efficace pour

contrôler la localisation des cellules déposées qui restent dans les capsules d'alginate pendant les 24 premières heures de culture.

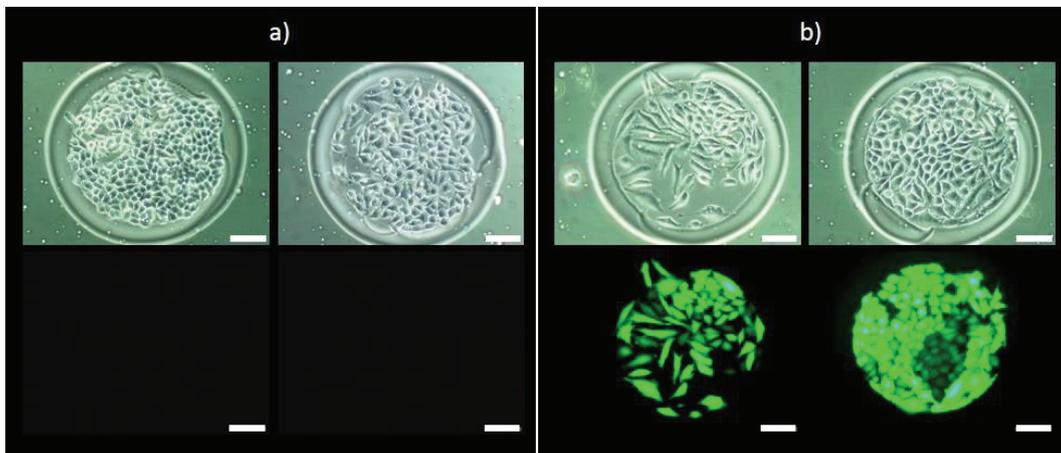


Figure 60 : Images de microscopie optique (haut) et de fluorescence (bas) de cellules HeLa [+]. (a) et HeLa-eGFP (b) après 72h de co-culture (la barre d'échelle correspond à 100  $\mu$ m).

## 1.6. ADAPTATION AUX CELLULES LNCaP

Afin de démontrer le potentiel de cette biopuce dans la détection de molécules sécrétées par des cellules, les cellules HeLa ont été remplacées par des cellules de cancer de la prostate (LNCaP) (Horszewicz *et al.*, 1983). Ces cellules ont la particularité de sécréter l'antigène prostate-spécifique (PSA) et la  $\beta$ -2-microglobuline (B2M) de façon androgéno-dépendante (Kollara *et al.*, 2003).

### 1.6.1. CULTURE CELLULAIRE SUR LA PUCE

Afin de vérifier si les propriétés de la puce développée avec des cellules HeLa peuvent être utilisées avec un autre type de cellules adhérentes, des cellules LNCaP ont été ensemencées sur le support pendant 24h. La biopuce a ensuite été rincée deux fois par du PBS afin d'éliminer les cellules faiblement adhérentes

Après 24 heures de culture, nous pouvons observer que le contraste d'adhésion entre le polystyrène et l'or est très important avec cette population cellulaire puisque toutes les cellules adhérentes sont dans les micropuits. Contrairement aux cellules HeLa, ces cellules n'adhèrent pas du tout sur la surface de polystyrène. En revanche leur adhésion sur l'or est stable puisque les cellules ne sont pas détachées après plusieurs lavages par du PBS (Figure 61).

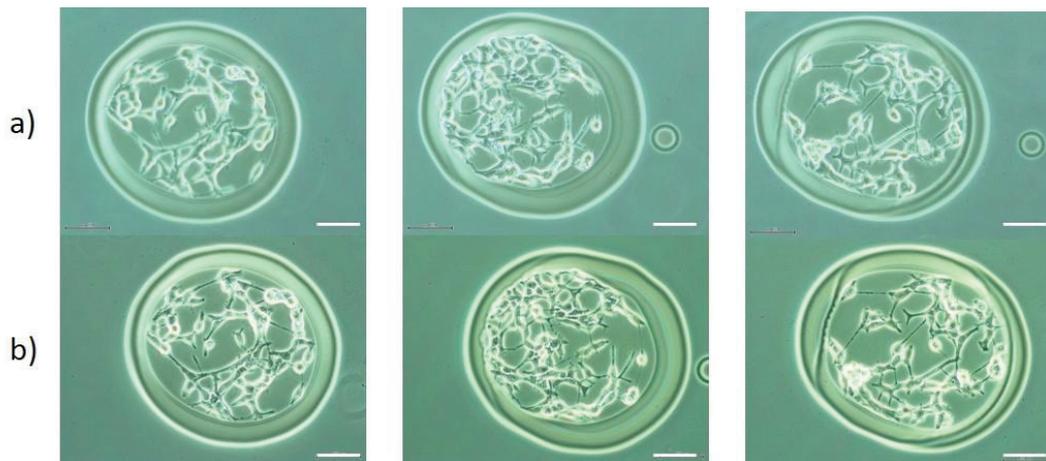


Figure 61 : Observation par microscopie optique des cellules LNCaP mises en culture sur le support microstructuré à une concentration de  $2.10^6$  cellules/mL.

a) cellules LNCaP en culture sur le support à  $t = 24h$ , b) après rinçage par du PBS et fixation (la barre d'échelle représente  $100 \mu m$ ).

Les cellules LNCaP ont ensuite été fixées et marquées par un anticorps anti-vinculine – FITC (Figure 62-a), la phalloïdine (Figure 62-b) et le DAPI (Figure 62-c). Ces cellules ont une forme très allongée sur la surface d'or. L'intensité du marquage du réseau d'actine est très importante tout comme celle du marquage de la vinculine. Seulement  $50 (\pm 15)$  cellules ont été piégées par micropuits.

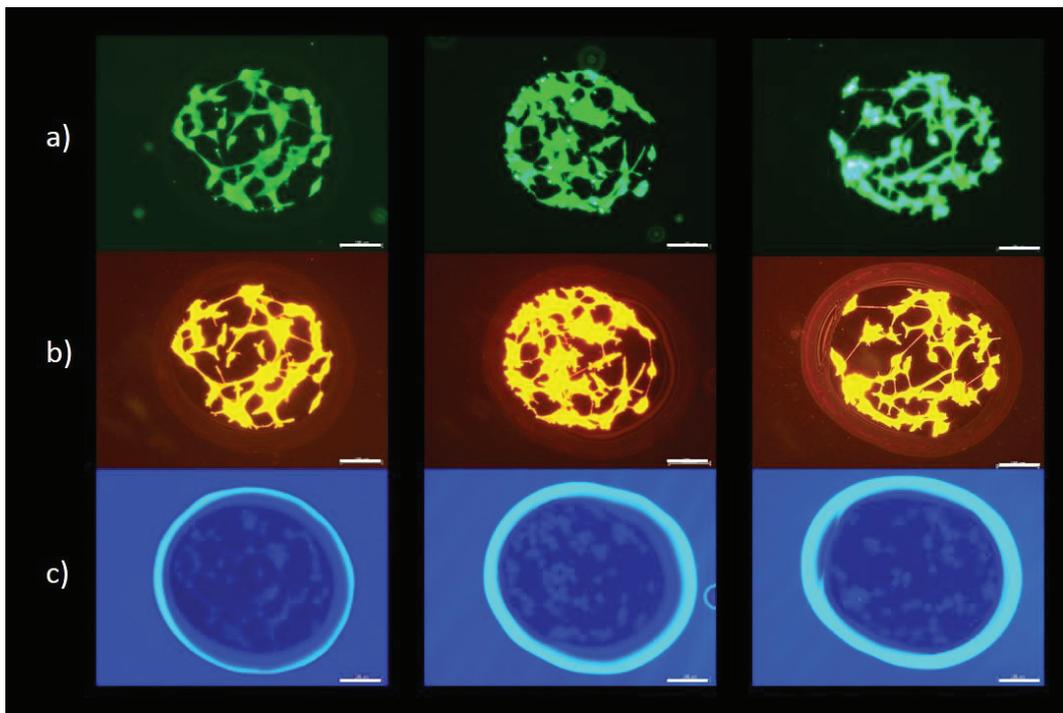


Figure 62 : Observation par microscopie de fluorescence des cellules LNCaP mises en culture sur le support microstructuré à une concentration de  $2 \cdot 10^6$  cellules/mL.

a) marquage anti-vinculine - FITC, b) marquage phalloïdine, c) marquage DAPI (la barre d'échelle correspond à  $100 \mu\text{m}$ ).

Afin de détecter les protéines sécrétées par les cellules LNCaP grâce à la SPRI, des anticorps anti-PSA et anti-B2M ont tout d'abord été immobilisés au fond des micropuits. 1 heure plus tard, les cellules LNCaP ont étéensemencées sur la surface de la puce (Figure 63).

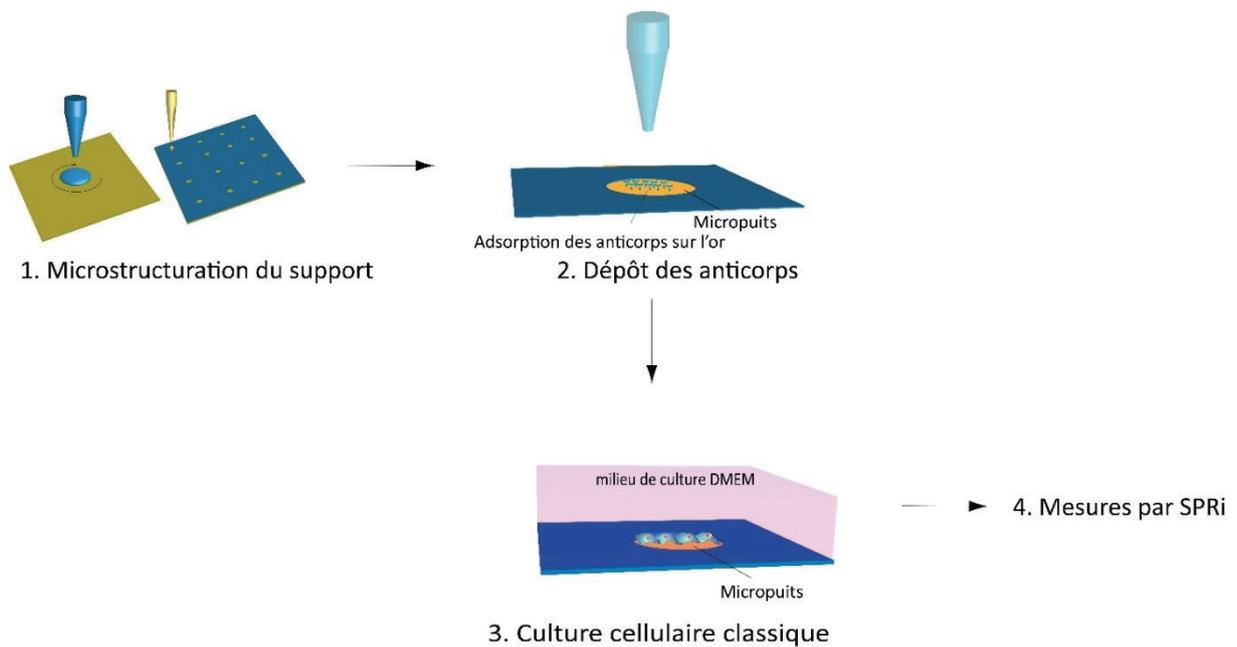


Figure 63 : Schéma du principe de fabrication de la biopuce pour les mesures SPRI avec les cellules LNCaP.

Nous avons observé les spots d'anticorps par microscopie optique juste après le dépôt (Figure 64-a). Nous pouvons constater que le spot d'anticorps est bien au centre du micropuits mais que son diamètre est inférieur à celui du puits. Après 24 heures de culture, nous pouvons observer que le contraste d'adhésion entre le polystyrène et l'or est très important avec cette population cellulaire puisque toutes les cellules adhérentes sont dans les micropuits (sans rinçage). De plus, nous avons remarqué que les cellules adhèrent de préférence à partir des bords internes du puits (surface d'or) plutôt qu'au centre (anticorps immobilisés) (Figure 64).

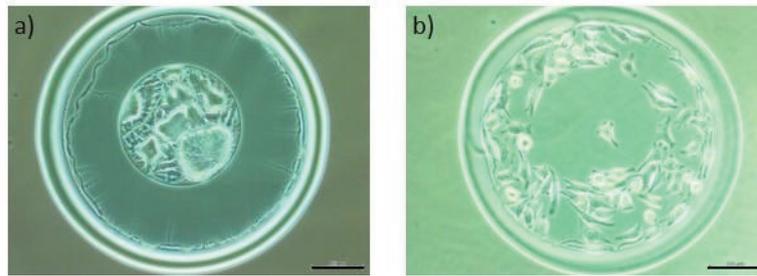


Figure 64 : Observation par microscopie optique de la biopuce pour les mesures SPRi avec les cellules LNCaP. a) un spot d'anticorps dans un micropuits juste après le dépôt, b) cellules adhérentes après 24h de culture (la barre d'échelle représente 100 µm).

### 1.6.2. MESURES SPRi

Après 24 heures de culture, la biopuce a été assemblée avec un prisme en verre de SPRi puis montée dans l'appareil. La chambre de culture, en système statique, a été remplie avec du DMEM (400 µL). Après une heure de stabilisation, de la DHT à une concentration de 100 nM a été injectée dans la chambre de culture afin d'induire la sécrétion de PSA et de B2M qui a pu être détectée grâce aux anticorps spécifiques immobilisés au fond des micropuits. La matrice de spots est présentée dans la Figure 65. Cette matrice comprend trois types de zones d'analyse différentes : a) des cellules adhérentes directement sur l'or dans les micropuits, b) des cellules adhérentes sur des anticorps anti-PSA immobilisés au fond des micropuits et c) des cellules adhérentes sur des anticorps anti-B2M immobilisés au fond des micropuits. Du fait que dans le cas (a) les protéines qui seront sécrétées par les cellules devraient s'accumuler sur la surface d'or, ces points d'analyse permettront de suivre l'adsorption non spécifique des protéines sécrétées sur l'or.



- Cellules LNCaP adhérentes dans les micropuits
- Spots d'anticorps Anti-PSA + cellules LNCaP adhérentes dans les micropuits
- Spots d'anticorps Anti-B2M + cellules LNCaP adhérentes dans les micropuits

Figure 65 : Matrice des micropuits remplis de cellules LNCaP adhérentes où des anticorps ont été préalablement immobilisés ou non.

Trois paramètres différents ont été suivis en utilisant le signal SPR (pourcentage de réflectivité) : la variation du signal SPR au-dessous de cellules adhérentes sur l'or, la variation du signal SPR au-dessous de cellules adhérentes sur des anticorps anti-PSA et la variation du signal SPR au-dessous de cellules adhérentes sur des anticorps anti-B2M. Les courbes présentées ont été obtenues en moyennant les résultats de tous les spots d'un même type sur la même puce. Les résultats obtenus sont résumés sur la Figure 66.

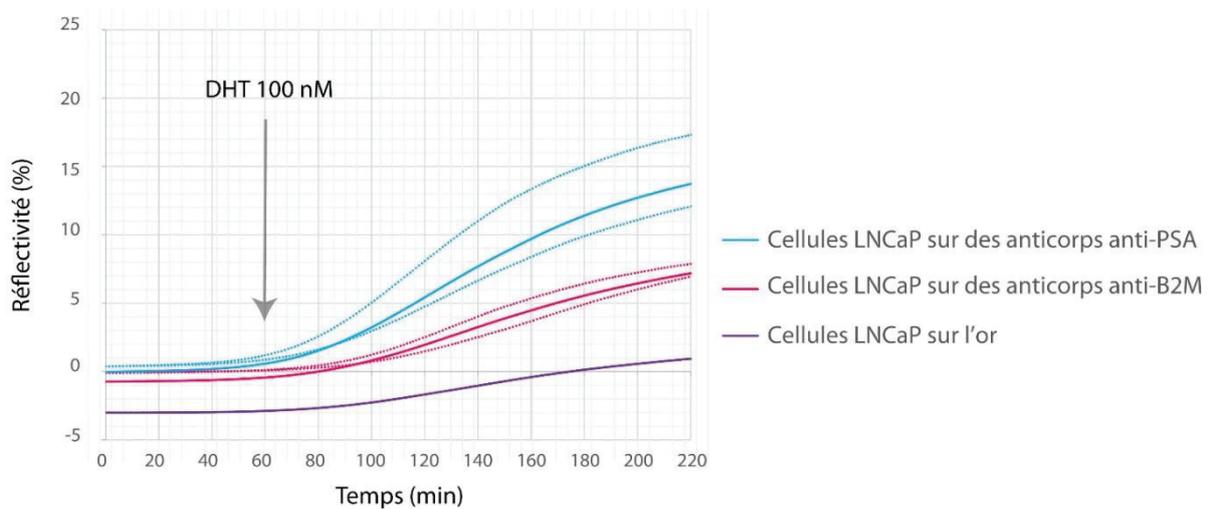


Figure 66 : Détection des molécules sécrétées par les cellules LNCaP dans les micropuits de la puce par SPRi (les pointillés correspondent aux valeurs minimales et maximales obtenues).

L'injection de l'inducteur, la DHT dans la cellule de mesure, après 60 minutes de mesure, entraîne la sécrétion des protéines PSA et B2M par les cellules LNCaP. L'augmentation de la concentration de ces protéines qui s'accumulent est suivie grâce à la mesure de réflectivité.

Comme on peut le voir sur le sensorgramme, le PSA et la B2M ont tous deux pu être détectés rapidement après l'induction par la DHT et la quantité de protéines sécrétées est croissante dans le temps. En comparant les courbes obtenues pour la sécrétion des molécules et celle qui correspond à la déviation du signal (cellules LNCaP adhérentes au fond d'un micropuits ne contenant pas d'anticorps), la spécificité du signal a pu être confirmée.

Les variations de réflectivité ont été converties en quantité de molécules par unité de surface (en pg/mm<sup>2</sup>) en utilisant l'équation suivante (équation fournie par Genoptix) :

$$\tau = \frac{\Delta R L_{ZC}}{S_{P,R} \delta n / \delta c}$$

Où  $\Delta R$  est la variation de réflectivité en pourcentage,

$L_{ZC} = 1,02 \cdot 10^{-4}$  mm (profondeur de pénétration de l'onde de plasmon),

$S_{P,R} = 2,25 \cdot 10^3$  %/RIU (sensibilité de la SPR en pourcentage par unité d'indice de réfraction),

$\Delta n / \delta c = 1,9 \cdot 10^{-10}$  mm<sup>3</sup>/pg.

Les variations de réflectivité maximales sont de 14% pour le PSA et de 7% pour la B2M. Il y a donc 3340 pg/mm<sup>2</sup> de PSA et 1670 pg/mm<sup>2</sup> de B2M.

Les spots d'anticorps ont un diamètre moyen de 250  $\mu$ m soit une surface de 49062,5  $\mu$ m<sup>2</sup>. Il est alors possible d'estimer la quantité de protéines par spots. Il y a donc 166 pg de PSA par spot et 82 pg de B2M par spot. Le volume de la chambre de culture est de 400  $\mu$ L, la concentration de PSA est donc de 415 pg/mL et celle de B2M est de 205 pg/mL pour chaque spot.

Il y a environ 50 cellules LNCaP adhérentes par spot d'anticorps, une cellule a alors sécrété 3,32 pg de PSA et 1,64 pg de B2M 2h40 après induction.

En utilisant la constante d'Avogadro ( $N_A = 6,02214129 \cdot 10^{23}$  mol<sup>-1</sup>) et les masses moléculaires des protéines, il est alors possible d'obtenir le nombre de molécules par spot. Le PSA a une masse moléculaire moyenne de 28 kDa, il y a donc  $6 \cdot 10^{-15}$  mol de PSA par spot soit  $3,6 \cdot 10^9$  molécules. La B2M a une masse moléculaire moyenne de 12 kDa, il y a donc  $7 \cdot 10^{-15}$  mol de B2M soit  $4,2 \cdot 10^9$  molécules.

Toutes ces valeurs sont présentées dans le Tableau 9.

	Masse moléculaire (kDa)	Réflectivité maximale (%)	$\Gamma$ (pg/mm <sup>2</sup> )	Quantité de protéine par spot (pg)	Nombre de moles	Nombre de molécules
PSA	28	14	3340	166	$6 \cdot 10^{-15}$	$3,6 \cdot 10^9$
B2M	12	7	1670	82	$7 \cdot 10^{-15}$	$4,2 \cdot 10^9$

Tableau 9 : Récapitulatif des valeurs estimées pour le PSA et B2M suite aux mesures SPRi (McCormack *et al.*, 1995) (Capeillereblandin *et al.*, 1991).

Ces petites protéines ont un diamètre d'environ 20 Å (2 nm) soit une surface projetée de 3,14 nm<sup>2</sup> ( $3,14 \cdot 10^{-6} \mu\text{m}^2$ ). En divisant l'aire d'un spot (*nb* 49062,5  $\mu\text{m}^2$ ) par l'aire d'une protéine, nous obtenons le nombre maximal théorique de protéines par spot, soit  $1,6 \cdot 10^{10}$  molécules. Les nombres de molécules de PSA et de B2M calculés précédemment étant inférieures à cette valeur, nous pouvons en conclure que les forts signaux obtenus en SPRi sont plausibles. De plus, la concentration de PSA sécrété (415 ng/L) est proche de celle décrite dans la littérature (125 ng/L) (Malatesta *et al.*, 2000).

Bien que les cellules ne soient pas adhérentes directement sur les anticorps, le signal mesuré est important, ce qui montre que les micropuits permettent, non seulement de confiner les cellules, mais aussi de surconcentrer les molécules sécrétées dans un espace restreint qui permet leur capture par les anticorps immobilisés au fond du même micropuits (Figure 67).

Par ailleurs, les faibles résidus de polystyrène dans les micropuits ne semblent pas gêner les mesures SPRi.

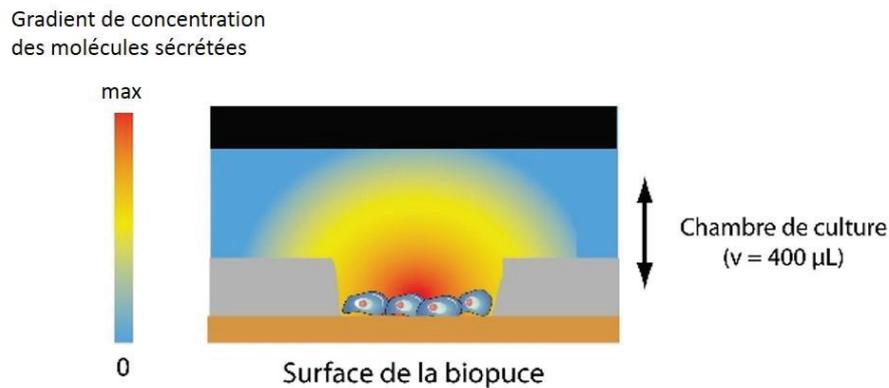


Figure 67 : Modélisation du système de confinement par micropuits permettant la concentration des molécules sécrétées par les cellules pour une détection par SPRI.

## 1.7. CONCLUSION

Nous avons développé une puce à cellules grâce à la microtexturation d'un support présentant une surface d'or. Le dépôt d'une fine couche de polystyrène et sa dissolution locale grâce à de faibles dépôts de toluène a permis de former des micropuits dont le fond révèle la couche d'or de la surface. La différence de composition entre l'intérieur et l'extérieur de ces micropuits a permis de créer un contraste d'adhésion afin de confiner des cellules adhérentes. Ces cellules ont pu être transfectées *in situ* par des plasmides codant pour des protéines fluorescentes afin d'apporter une première approche de multiplexage et ainsi d'avoir plusieurs phénotypes de cellules sur la même puce. Une méthode d'encapsulation a ensuite été développée afin de pouvoir déposer localement et de façon contrôlée les cellules dans les micropuits. Cette technique consistant en la formation de billes d'alginate à l'intérieur des micropuits s'est avéré être un moyen efficace pour permettre le maintien des cellules dans un environnement hydraté lors du dépôt automatisé des cellules. La biopuce a dans un premier temps été mise au point avec des cellules HeLa puis appliquée à des cellules de cancer de la prostate (LNCaP). Ces cellules ont la particularité de sécréter l'antigène prostate-spécifique (PSA) après induction par la dihydrotestostérone. Les cellules LNCaP ont donc été notre modèle d'étude pour suivre la sécrétion de molécules par les cellules en utilisant la SPRI. Des anticorps (spécifiques et non spécifiques) ont été immobilisés au fond des micropuits, les cellules ont ensuite étéensemencées sur

le support. Après 24 heures de culture, la biopuce a été assemblée avec un prisme de SPRi puis montée dans l'appareil. La cinétique de sécrétion a alors pu être suivie.

## 2. DEUXIÈME APPROCHE : CELLULES ENCAPSULÉES DIRECTEMENT SUR LA COUCHE SENSIBLE

La capacité des billes d'alginate à maintenir les cellules confinées à une position donnée nous a amené à concevoir une deuxième biopuce avec un concept plus simple. En effet, dans cette approche la surface n'est pas modifiée pour créer un contraste d'adhésion. Toutes les étapes de fabrication sont réalisées avec un robot de dépôt automatisé.

### 2.1. IMMOBILISATION DES ANTICORPS ET DÉPÔT DES CELLULES LOCALISÉS

Les anticorps anti-PSA et anti-B2M sont immobilisés à des positions définies sur la lame de verre recouverte d'or afin de créer une matrice de spots d'anticorps. Après une heure d'incubation du support, les cellules en solution dans l'alginate sont déposées (sur les anticorps ou non pour les contrôles négatifs) puis une solution de calcium est déposée afin de former les billes et d'encapsuler *in situ* les cellules (Figure 68 et Figure 69).

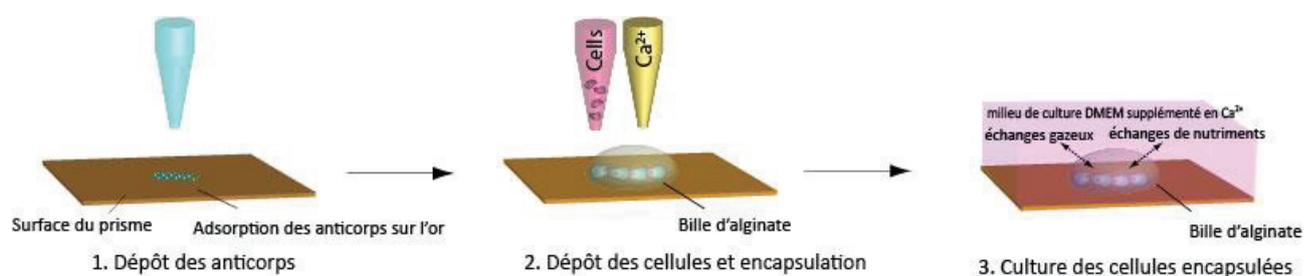


Figure 68 : Schéma illustrant le principe de fabrication de la biopuce simplifiée.

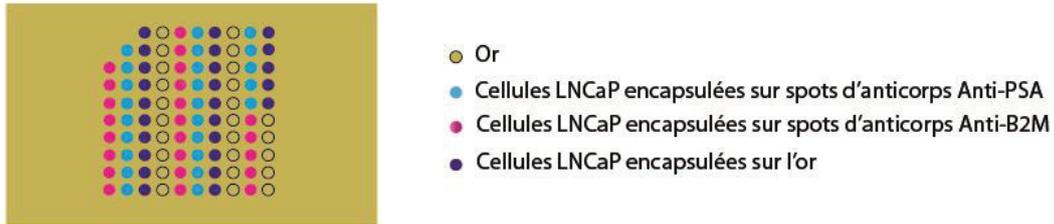


Figure 69 : Matrice des spots de cellules LNCaP sur des spots d'anticorps préalablement immobilisés ou sur l'or nu.

La puce est ensuite mise en culture dans du DMEM supplémenté en  $\text{CaCl}_2$  2 mM afin de maintenir l'intégrité des billes d'alginate. Après 24 heures de culture, les cellules LNCaP sont adhérentes sur la surface d'or et restent confinées dans la bille d'alginate (Figure 70). L'alginate est donc une barrière suffisante pour maintenir les cellules de façon localisée à une position donnée sur le support. En effet, la bille reste « accrochée » à l'endroit où elle a été formée. De plus, les cellules ne diffusent pas à l'extérieur du gel d'alginate.

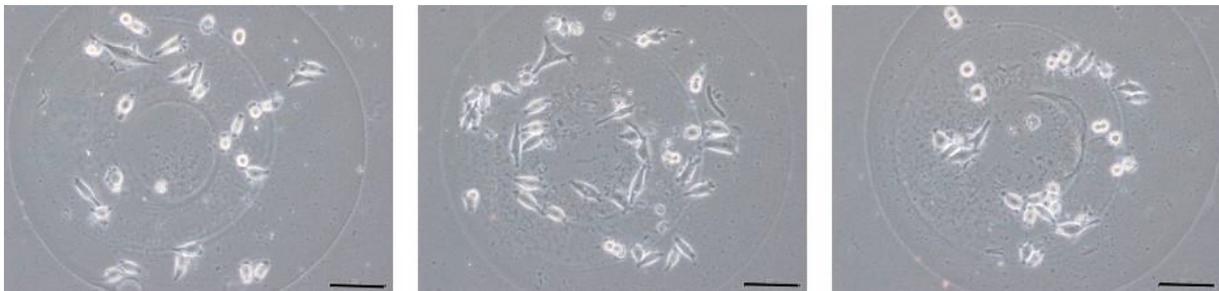


Figure 70: Images obtenues par microscopie optique des cellules LNCaP dans trois billes d'alginate sur la surface d'or après 24 heures de culture (la barre d'échelle représente 100  $\mu\text{m}$ ).

## 2.2. CONTRÔLE DU NOMBRE DE CELLULES

Cette approche permet donc l'encapsulation des cellules dans un volume très faible, environ 30 nL, et permet le contrôle précis du nombre de cellules dans chaque bille d'alginate. En effet, le nombre de cellules dans la bille d'alginate est directement relié à la concentration de cellules dans la solution de

dépôt. Un contrôle précis du nombre de cellules dans les billes (de 1 à 100 cellules) peut être atteint avec une bonne reproductibilité (la déviation standard moyenne est de 18,91%) (Figure 71-a). Comme nous pouvons le voir sur la Figure 71-b, même les billes avec une haute densité de cellules peuvent confiner les cellules dans la matrice d'alginate. Cependant, ces billes ne pourront pas être maintenues en culture plus de 24 heures car le nombre de cellules deviendra alors trop important dans la bille.

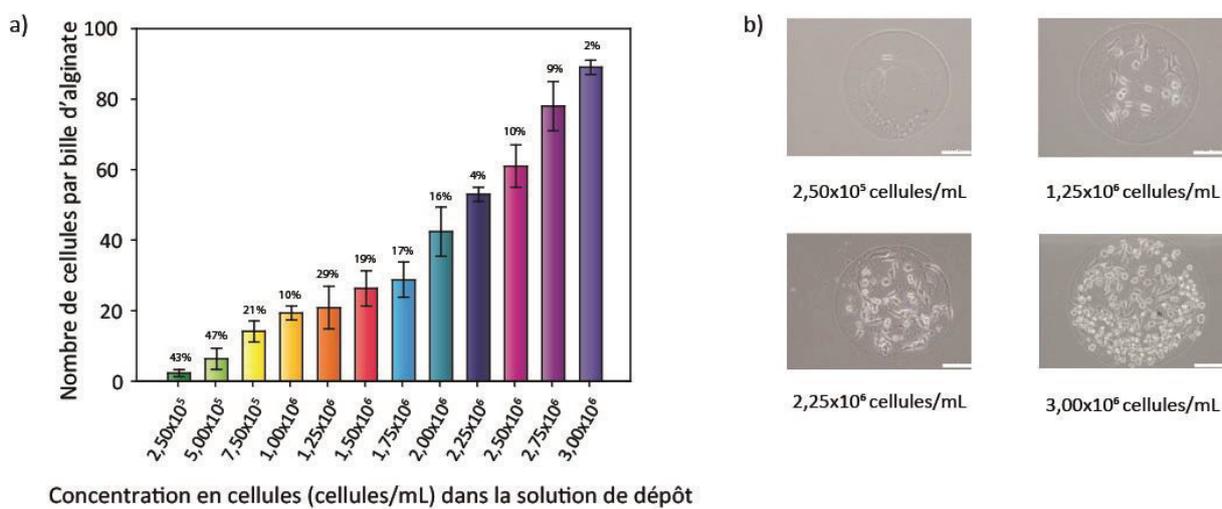


Figure 71 : Contrôle du nombre de cellules dans une bille d'alginate.

a) Nombre de cellules par bille pour chaque concentration de cellules dans la solution de dépôt (les barres d'erreurs représentent la déviation standard), b) Images par microscopie optique de 4 billes d'alginate différentes après 4 heures de culture (les barres d'échelle représentent 100  $\mu$ m).

## 2.3. POSSIBILITÉS D'AVOIR DIFFÉRENTES LIGNÉES CELLULAIRES SUR LE MÊME SUPPORT

### 2.3.1. TRANSFECTION STABLE DES CELLULES LNCAP

Afin d'avoir trois phénotypes différents des cellules LNCaP que l'on puisse distinguer facilement, des transfections stables par des plasmides codant pour des protéines fluorescentes, eGFP (vert) et pmCherry (rouge) ont été réalisées. Les plasmides utilisés, pEGFP et pmCherry, portent le gène *néo*,

un gène de résistance à la néomycine. La sélection des clones stables a ainsi pu être réalisée en additionnant de la généticine (G418).

Des tests de survie cellulaire ont tout d'abord été réalisés afin de déterminer la concentration de néomycine nécessaire pour sélectionner les cellules ayant intégré les plasmides. Pour cela des cellules ont été ensemencées dans une plaque 12 puits. Lorsque les cellules ont atteint 80% de confluence, différentes concentrations de néomycine (de 0,1 mg/mL à 1mg/mL) ont été ajoutées dans les différents puits. La concentration optimale de néomycine est celle qui tue 100% des cellules après 7 jours, ici 0,3 mg/mL.

Les cellules, ensemencées la veille de la transfection à raison de  $1,5 \cdot 10^6$  cellules par boîte de 100 mm de diamètre, sont transfectées par lipofection en présence d'un lipide cationique, la lipofectamine<sup>®</sup>, permettant la formation de liposomes de fusion. Chaque transfection est réalisée pendant 3 heures à 37°C en présence de 6,7 µg de plasmides et de 40 µL de lipofectamine<sup>®</sup>. Le milieu est alors changé et les cellules sont mises en culture. La sélection des clones stables est réalisée en additionnant de la néomycine (G418) à une concentration de 300 µg/mL au milieu de culture cellulaire 24 heures après la transfection.

Après 15 à 20 jours de sélection, des clones isolés sont récupérés puis amplifiés. Les clones sont ensuite sélectionnés selon leur capacité à produire la protéine rapportrice.

### 2.3.2. DÉPÔT LOCALISÉ DES DIFFÉRENTES LIGNÉES DE CELLULES LNCaP

Afin de démontrer le potentiel de cette technique d'encapsulation directement sur l'or pour le multiplexage, nous avons déposé sur un même support les 3 types différents de cellules LNCaP : LNCaP [+], LNCaP-eGFP et LNCaP-pmCherry. Les cellules LNCaP [+], LNCaP-eGFP et LNCaP-pmCherry ont donc été encapsulées sur le support ( $5 \cdot 10^5$  cellules/mL) puis mises en culture (Figure 72).

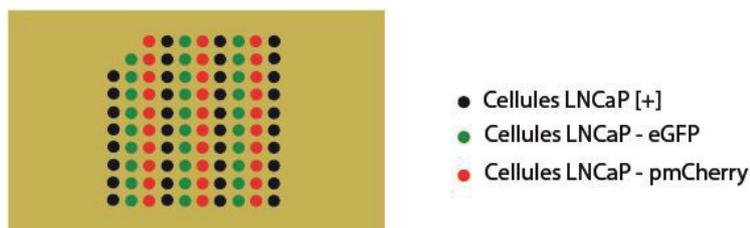


Figure 72 : Matrice des spots des différentes lignées de cellules LNCaP encapsulées sur la surface d'or.

La Figure 73 présente les images obtenues par microscopie optique et de fluorescence de trois billes d'alginate encapsulant chacune une lignée différente de cellules LNCaP après 24h de co-culture. Nous n'observons pas de contamination d'une bille à l'autre, preuve que cette technique d'encapsulation est un moyen efficace pour cultiver différentes lignées cellulaires sur la même surface.

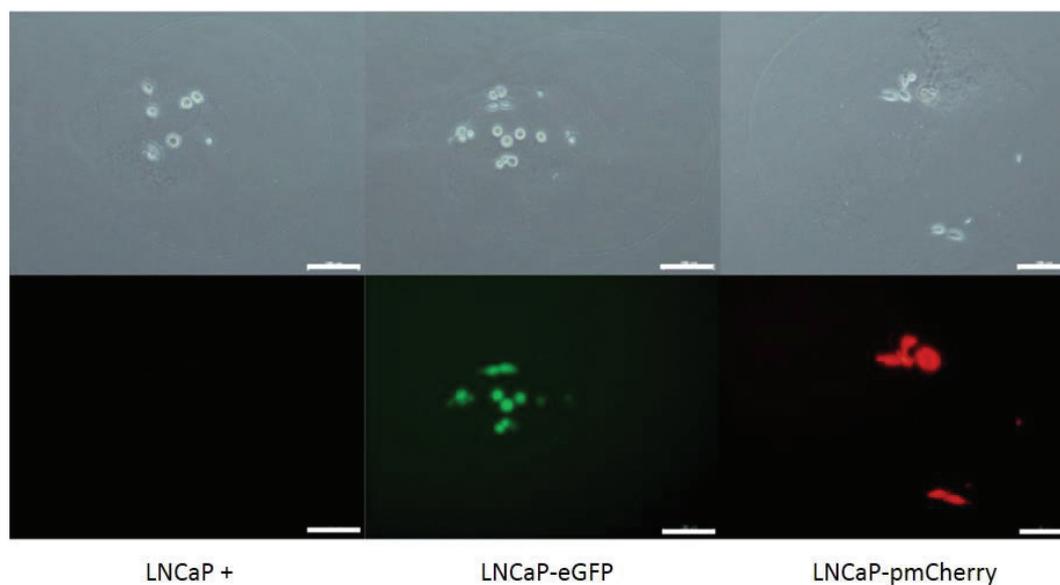


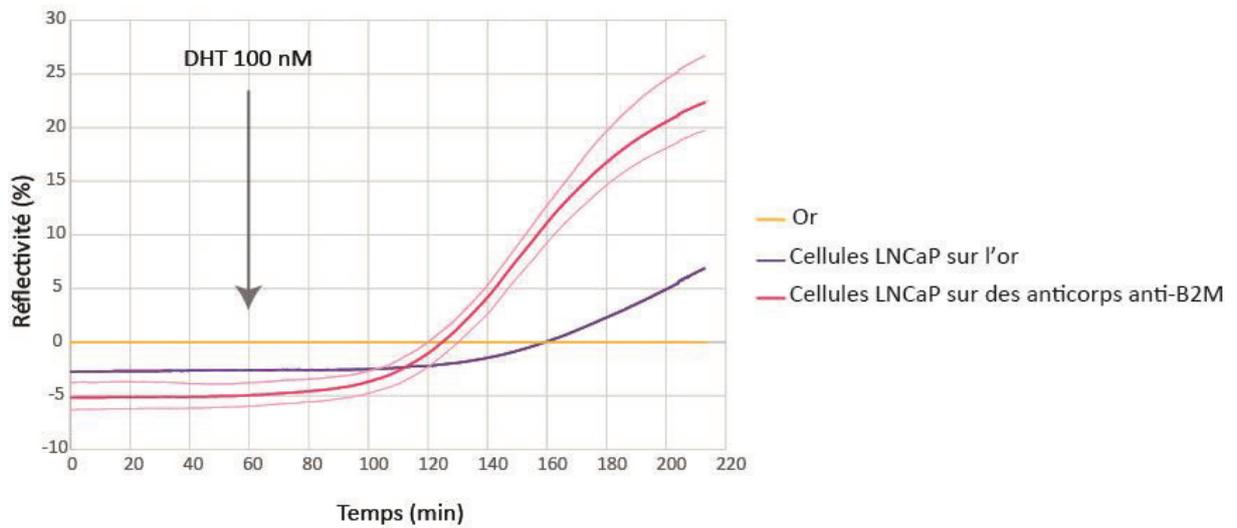
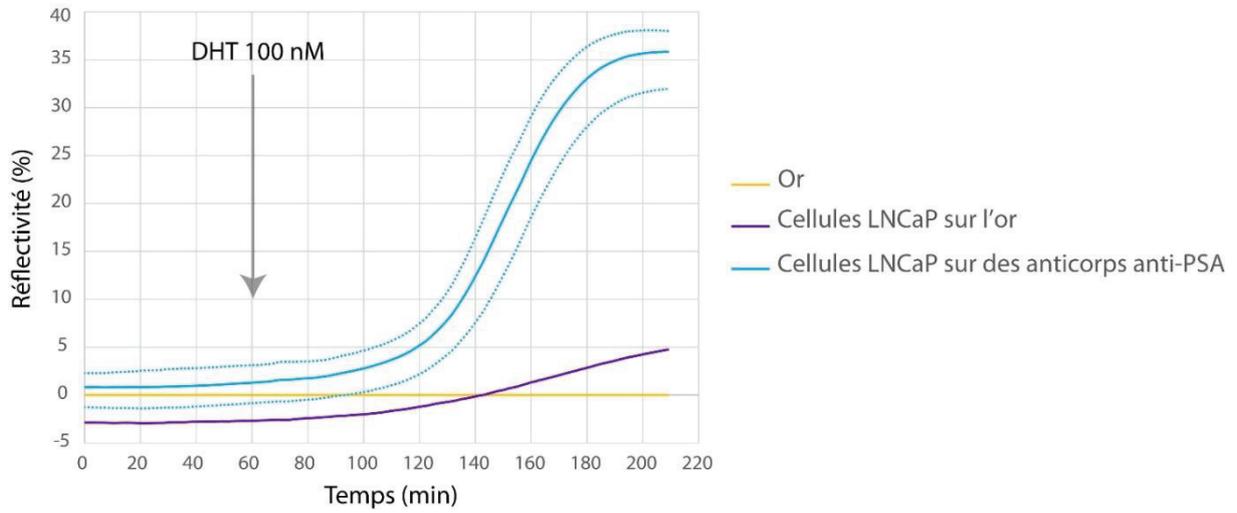
Figure 73 : Observation par microscopies optique (en haut) et de fluorescence (en bas) de trois lignées différentes de cellules LNCaP encapsulées dans des billes d'alginate. (La barre d'échelle représente 100  $\mu$ m).

## 2.4. MESURES SPRi

Les anticorps anti-PSA et anti-B2M ont été immobilisés à des positions définies sur la lame de verre recouverte d'or afin de créer une matrice de spots d'anticorps (Figure 69). Après une heure d'incubation du support, les cellules en solution dans l'alginate ont été déposées à une concentration de  $2 \cdot 10^6$  cellules/mL afin d'avoir environ 50 cellules par bille sur les spots (cf paragraphe 2.2) d'anticorps ou sur l'or nu puis une solution de calcium est déposée afin de former les billes et d'encapsuler *in situ* les cellules.

Après 24 heures de culture dans les billes d'alginate, la lamelle d'or a été assemblée avec un prisme en verre de SPRi puis montée dans l'appareil. La chambre de culture a été remplie avec 400  $\mu$ L de DMEM. Après une heure de stabilisation, de la DHT à une concentration de 100 nM a été injectée dans la chambre de culture et la sécrétion de PSA et de B2M a pu être détectée grâce aux anticorps spécifiques immobilisés.

Quatre paramètres différents ont été suivis en utilisant le signal SPR : la déviation du signal SPR sur l'or nu, la variation SPR au-dessous de cellules adhérentes sur l'or, la variation du signal SPR au-dessous de cellules adhérentes sur des anticorps anti-PSA et la variation du signal SPR au-dessous de cellules adhérentes sur des anticorps anti-B2M. Les courbes présentées ont été obtenues en moyennant les résultats de tous les spots d'un même type sur la même puce. Les résultats obtenus sont résumés sur les Figure 74 et Figure 75.



Comme dans la première approche, les variations de réflectivité ont été converties en quantité de molécules par unité de surface (en pg/mm<sup>2</sup>) en utilisant l'équation suivante (équation fournie par Genoptix) :

$$\tau = \frac{\Delta R L_{ZC}}{S_{P,R} \delta n / \delta c}$$

Où  $\Delta R$  est la variation de réflectivité en pourcentage,

$L_{ZC} = 1,02 \cdot 10^{-4}$  mm (profondeur de pénétration de l'onde de plasmon),

$S_{P,R} = 2,25 \cdot 10^3$  %/RIU (sensibilité de la SPR en pourcentage par unité d'indice de réfraction),

$\Delta n / \delta c = 1,9 \cdot 10^{-10}$  mm<sup>3</sup>/pg.

Les variations de réflectivité maximales sont de 35% pour le PSA et de 15% pour la B2M. Il y a donc 8351 pg/mm<sup>2</sup> de PSA et 3579 pg/mm<sup>2</sup> de B2M.

Les spots d'anticorps ont un diamètre moyen de 250  $\mu$ m soit une surface de 49062,5  $\mu$ m<sup>2</sup>. Il est alors possible d'estimer la quantité de protéines par spots. Il y a donc 409 pg de PSA par spot et 176 pg de B2M par spot. Le volume de la chambre de culture est de 400  $\mu$ L, la concentration de PSA est donc de 1023 pg/mL et celle de B2M est de 440 pg/mL pour chaque spot.

Il y a environ 50 cellules LNCaP adhérentes par spot d'anticorps, une cellule a alors sécrété 8,18 pg de PSA et 3,52 pg de B2M 2h40 après induction.

En utilisant la constante d'Avogadro ( $N_A = 6,02214129 \cdot 10^{23}$  mol<sup>-1</sup>) et les masses moléculaires des protéines, il est alors possible d'obtenir le nombre de molécules par spot. Le PSA a une masse moléculaire moyenne de 28 kDa, il y a donc  $15 \cdot 10^{-15}$  mol de PSA par spot soit  $9 \cdot 10^9$  molécules. La B2M a une masse moléculaire moyenne de 12 kDa, il y a donc  $15 \cdot 10^{-15}$  mol de B2M soit  $9 \cdot 10^9$  molécules.

Toutes ces valeurs sont présentées dans le Tableau 10.

	Masse moléculaire (kDa)	Réflectivité maximale (%)	$\Gamma$ (pg/mm <sup>2</sup> )	Quantité de protéine par spot (pg)	Nombre de moles	Nombre de molécules
PSA	28	35	8351	409	15.10 <sup>-15</sup>	9.10 <sup>9</sup>
B2M	12	15	3579	176	15. 10 <sup>-15</sup>	9.10 <sup>9</sup>

Tableau 10 : Récapitulatif des valeurs estimées pour le PSA et B2M suite aux mesures SPRi.

Ces petites protéines ont un diamètre d'environ 20 Å (2 nm) soit une surface projetée de 3,14 nm<sup>2</sup> (3,14.10<sup>-6</sup> μm<sup>2</sup>). En divisant l'aire d'un spot (*nb* 49062,5 μm<sup>2</sup>) par l'aire d'une protéine, nous obtenons le nombre maximal théorique de protéines par spot, soit 1,6.10<sup>10</sup> molécules. Les nombres de molécules de PSA et de B2M calculés précédemment étant inférieures à cette valeur, nous pouvons en conclure que les forts signaux obtenus en SPRi sont plausibles.

Comme nous pouvons le voir sur les sensorgrammes, le PSA et la B2M ont tous deux pu être détectés dans les 20 premières minutes suivant l'induction par la DHT. Lorsque l'on compare ces résultats à ceux obtenus en utilisant une détection par un ELISA standard sur des surnageants de culture (Figure 76), l'avantage de la biopuce développée semble être indéniable. En effet, en utilisant un système d'immuno-essai classique, le PSA est difficilement détectable avant le premier jour suivant l'induction par la DHT. Une telle détection précoce du PSA et de la B2M sécrétées dans notre microsysteme a été attribuée à l'effet de surconcentration des protéines sécrétées, possible uniquement grâce à la présence des cellules dans les billes d'alginate, au-dessus des anticorps de détection. En effet, un très faible volume a été piégé entre les cellules et la surface modifiée avec les anticorps, entraînant une très grande surconcentration des protéines.

Enfin, le signal SPR mesuré stabilisé après 120-200 minutes d'induction, semble être une conséquence de la saturation de la capacité d'interaction des anticorps immobilisés et non une chute de la sécrétion. La cinétique de sécrétion observée est donc une association de l'effet de surconcentration des protéines sécrétées et de la saturation de la couche sensible composée des anticorps immobilisés. Par conséquent, la cinétique longue observée en utilisant un système ELISA classique ne pourrait être atteinte en utilisant notre microsysteme.

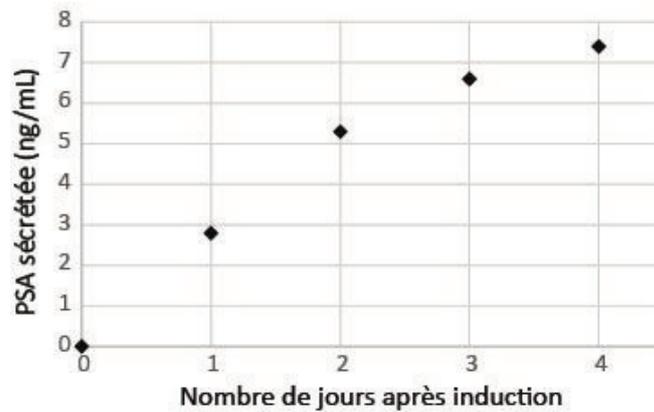


Figure 76 : Immuno-détection du PSA dans des surnageants de culture. L'induction par la DHT a été effectuée à  $t=0$ .

## 2.5. CONCLUSION

Certaines des méthodes mises au point dans le développement de la première biopuce ont pu être facilement adaptées afin de concevoir une deuxième biopuce d'un concept plus simple puisque celle-ci ne présente pas de texturation de surface. En effet, les billes d'alginate seules ont été utilisées ici afin de piéger des cellules à une position donnée. Les anticorps immobilisés sur la surface d'or à des positions précises grâce à l'automate de dépôt non contact ont permis de suivre la cinétique de sécrétion des molécules par les cellules LNCaP encapsulées et adhérentes aux mêmes positions par SPRi. Les cinétiques de sécrétion observées sont plus fortes alors que le nombre de cellules par bille d'alginate est similaire au nombre de cellules par micropuits dans la première approche. En effet, à  $t = 200$  min, le signal mesuré est de 35 % de réflectivité pour le PSA sécrété (soit 409 pg ou  $9 \cdot 10^9$  molécules par spot) et de 15% de réflectivité pour la B2M sécrétée (soit 176 pg ou  $9 \cdot 10^9$  molécules par spot) alors que dans la première approche où les cellules étaient confinées dans des micropuits le signal mesuré était de 14 % de réflectivité pour le PSA sécrété (soit 166 pg ou  $3,6 \cdot 10^9$  molécules par spot) et de 7% de réflectivité pour la B2M sécrétée (soit 82 pg ou  $4,2 \cdot 10^9$  molécules par spot). Les valeurs obtenues

avec cette deuxième biopuce sont donc environ 2,5 fois supérieures à celles obtenues avec la première biopuce conçue. Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer cette variation de signal puisqu'en théorie le taux de molécules sécrétées devrait être semblable. La première hypothèse est que, tout compte fait, les résidus de polystyrène restant au fond des micropuits diminuent le signal puisque les plasmons ne peuvent pas passer à travers le polystyrène. Une autre hypothèse est que les billes d'alginate augmentent encore l'effet de surconcentration des molécules piégées dans ce très faible volume (48 nL). Enfin une dernière hypothèse est que le calcium présent dans les billes d'alginate active les promoteurs responsables de la sécrétion du PSA et de la B2M. En revanche, la cinétique de sécrétion est plus lente. En effet les molécules sécrétées sont détectées environ 80 minutes après l'induction après une période de latence alors qu'avec la biopuce présentant des cellules adhérentes directement dans les micropuits les molécules sécrétées étaient détectées à partir de 40 minutes après l'induction. Ce ralentissement de cinétique peut provenir de la diffusion des molécules à travers la bille d'alginate pour atteindre les anticorps immobilisés.

### 3. TROISIÈME APPROCHE : CULTURE LOCALISÉE EN SYSTÈME FERMÉ

Une autre approche a ensuite été envisagée. Il s'agit de réaliser une biopuce comportant un support microtexturé pour la culture localisée des cellules qui sera placée en face d'une lamelle d'or sur laquelle des anticorps dirigés contre les molécules à détecter seront greffés. Ces deux supports seront reliés par un espaceur qui permettra d'une part l'apport d'inducteurs grâce à un système microfluidique et d'autre part le contrôle de la distance entre les cellules et la surface sensible (entre 25 et 150  $\mu\text{m}$ ) Figure 77.

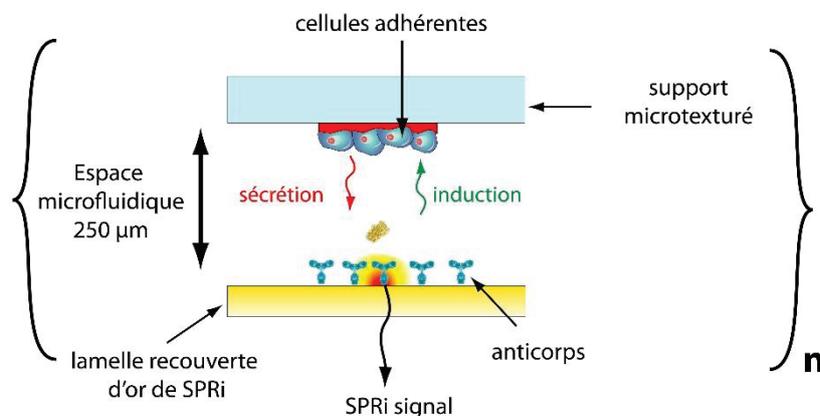


Figure 77 : Schéma du concept de la biopuce en système fermé

#### 3.1. INTRODUCTION

La production de surfaces résistantes à l'adsorption de protéines a toujours été un sujet de grand intérêt et est souvent considéré comme un élément clé dans le développement de matériaux biomédicaux implantés, des dispositifs de diagnostic et les transporteurs de médicament. Les surfaces hydrophiles composées de polyéthylène glycol (PEG) ou d'oxyde de polyéthylène (PEO) sont des surfaces non adhésives largement utilisées en raison de leur robustesse et de leur stabilité. Il existe de nombreuses techniques utilisées pour préparer des revêtements à base de PEG / PEO : la chimisorption de polythiol (oxyde d'éthylène) (Prime *et al.*, 1993), l'adsorption physique (Xia *et al.*, 2002) et le

revêtement par centrifugation stabilisée par traitement par faisceau d'ions (Manso-Silvan *et al.*, 2004). Cependant ces méthodes sont souvent dépendantes de la rugosité de surface et aboutissent généralement à des surfaces à faible densité de chaînes de PEO / PEG, à une diminution de la robustesse et la réduction des propriétés non adhésives. D'autre part, l'utilisation de technique de déposition par polymérisation par plasma à faible pression de précurseurs d'oxyde d'éthylène (Shen *et al.*, 2002) et d'éther diméthylrique d'éthylène de glycol DEGME (Bretagnol *et al.*, 2006) a ouvert une voie pour la création de revêtements anti-adhésifs « PEO-like » plus robustes, denses et homogènes. De plus, le dépôt par polymérisation par plasma a lieu en une seule étape et permet la production de revêtements ultra-minces (<50 nm) sur une grande variété de substrats, ainsi que sur des surfaces en trois dimensions. Ces revêtements « PEO-like » ont aussi été largement utilisés comme plateformes de culture pour l'analyse du comportement cellulaire (Ruiz *et al.*, 2013). Ces plateformes fonctionnelles ont été produites en modelant les puces à protéines spécifiques des cellules (fibronectine et collagène par exemple) directement sur une couche « PEO-like ». De telles surfaces contrastées ont permis la création d'un microenvironnement artificiel ayant la capacité de contrôler la position exacte de cellules.

### 3.2. FABRICATION DE LA BIOPUCE

La première étape de conception de cette biopuce est de microtexturer la surface accueillant les cellules. Cette surface est une lame de polycarbonate de 25 x 12 x 1 mm percée en deux endroits pour permettre l'entrée et la sortie du flux et recouverte par un film d'oxyde de polyéthylène (PEO) déposé par traitement plasma. Trois épaisseurs différentes pour ce film de PEO ont été testées : 30 nm, 50 nm et 70 nm. Ce film de PEO est cytophobe mais permet l'adsorption des protéines. Afin de créer des spots permettant l'adhésion des cellules, de la fibronectine à une concentration de 200 µg/mL a été déposée de façon organisée sur cette surface modifiée (Tableau 11). Différents volumes de fibronectine déposés ont été testés afin d'optimiser le diamètre des spots pour l'adhésion des cellules. Le support est ensuite passé aux UV pendant 15 minutes afin de le stériliser.

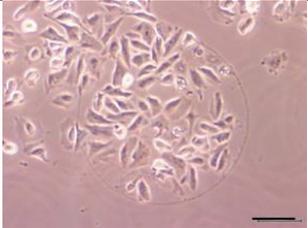
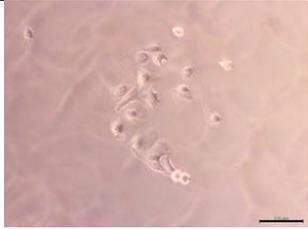
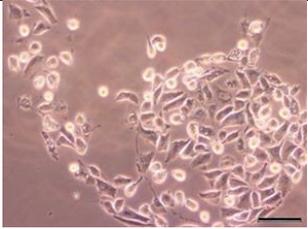
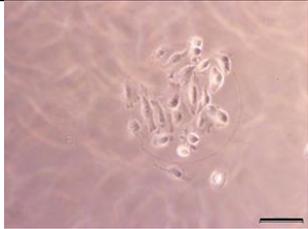
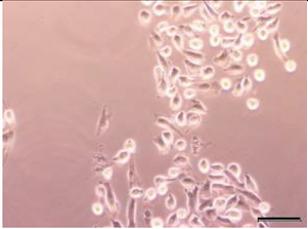
Volume Fibronectine 200 µg/mL déposé (nL)	Épaisseur du film de PEO (nm)		
	30	50	70
1,6			
2,4			
3,2			

Tableau 11 : Images obtenues par microscopie optique de cellules LNCaP adhérentes sur des spots de fibronectine sur une surface de PEO en fonction du volume de fibronectine déposé et de l'épaisseur du film de PEO (la barre d'échelle représente 100 µm).

Afin d'obtenir le meilleur contraste d'adhésion cellulaire, la lame de polycarbonate sera donc recouverte d'un film de 50 nm de PEO sur lequel des dépôts de fibronectine à une concentration de 200 µg/mL seront réalisés.

En parallèle, 2,4 nL des anticorps anti-PSA, anti-B2M et non spécifiques (anti-CRP) à une concentration de 200 µg/mL ont été déposés de façon organisée sur la lamelle d'or afin de créer une matrice d'anticorps immobilisés qui est l'image miroir de la matrice des spots de fibronectine (Figure 78).

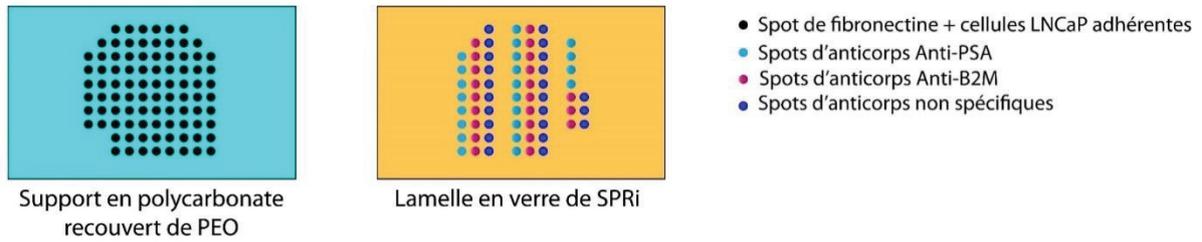


Figure 78 : Matrice des spots de fibronectine sur le support en polycarbonate préalablement recouvert d'un film de PEO et matrice des spots d'anticorps sur la lamelle en verre de SPRI.

Les deux supports sont ensuite assemblés grâce à un adhésif double face qui permet de créer un espace microfluidique. 100  $\mu\text{L}$  d'une suspension de cellules LNCaP à une concentration de  $2.10^6$  cellules/mL sont ensuite injectés dans la biopuce qui est alors retournée afin que la surface microtexturée soit en bas pour permettre l'adhésion des cellules. Après 1 heure de culture, la biopuce est retournée et les cellules sont rincées 3 fois par injection de PBS dans le flux. La biopuce est alors assemblée avec un prisme en verre et montée dans l'appareil de SPRI. Ces différentes étapes sont présentées sur la Figure 79.

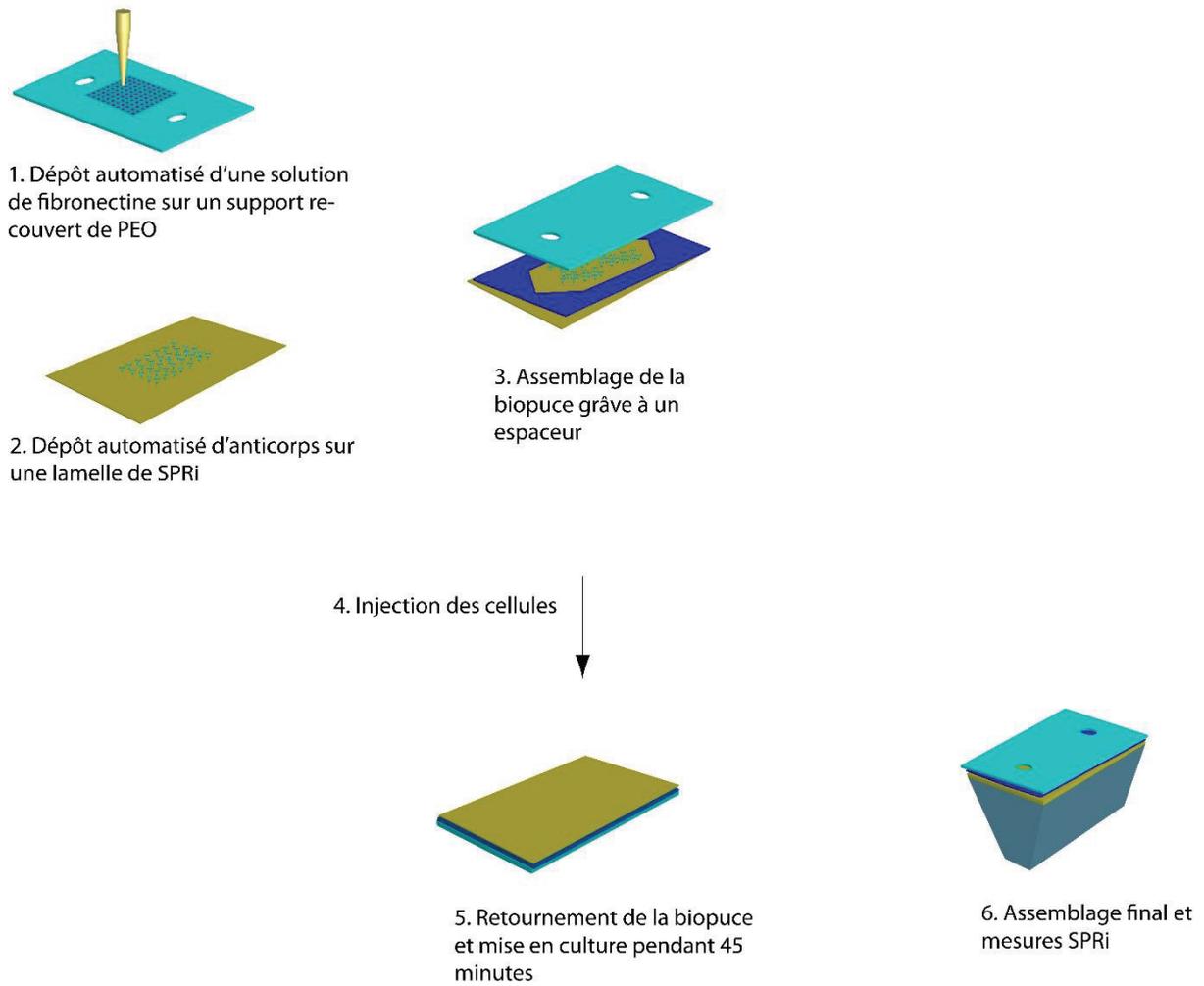


Figure 79 : Schéma présentant les différentes étapes pour la préparation de la biopuce en système fermé.

### 3.3. CULTURE CELLULAIRE LOCALISÉE

Le PEO est un outil efficace pour la culture cellulaire localisée. En effet, après seulement une heure de culture et 3 rinçages par du PBS, les cellules LNCaP sont adhérentes uniquement sur les spots de fibronectine (Figure 80).

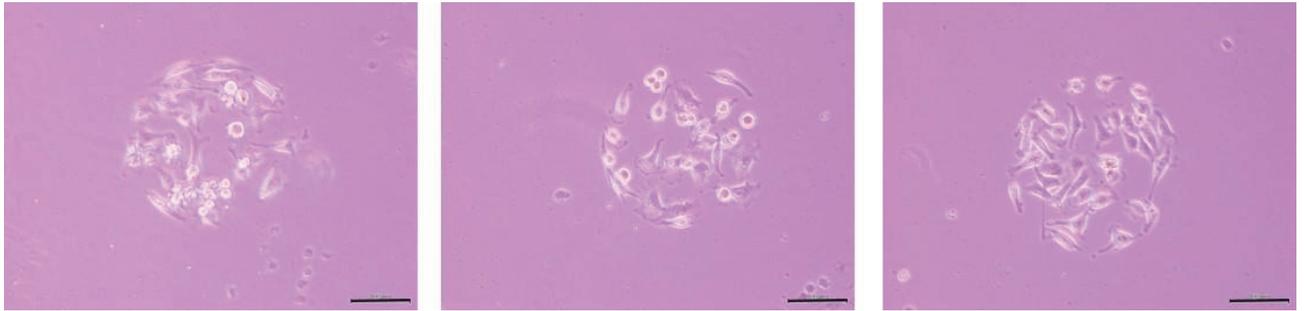


Figure 80 : Images obtenues par microscopie optique de cellules LNCaP adhérentes sur trois spots différents de fibronectine après 1 heure de culture et rinçage par du PBS (la barre d'échelle représente 100  $\mu\text{m}$ ).

### 3.4. MESURES SPRi

Afin de suivre en temps réel la sécrétion de B2M et de PSA par les cellules LNCaP, la biopuce a été assemblée avec un prisme en verre de SPRi et insérée dans l'appareil. Le système fluide comprend une boucle de 500  $\mu\text{L}$  pour l'injection de l'inducteur et un espace de 100  $\mu\text{L}$  entre les deux lamelles. Du DMEM passe en continue avec un flux de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  dans le système. Quatre paramètres différents ont été suivis en utilisant le signal SPR (pourcentage de réflectivité) : la déviation du signal SPR sur l'or nu en face de cellules adhérentes, la variation du signal SPR sur des anticorps non-spécifiques immobilisés en face des cellules adhérentes, la variation du signal SPR sur des anticorps anti-B2M immobilisés en face des cellules adhérentes et la variation du signal SPR sur des anticorps anti-PSA immobilisés en face des cellules adhérentes. Les résultats obtenus sont résumés sur la Figure 81. Comme on peut le voir, le PSA et la B2M sécrétés ont tous deux pu être détectés pendant les 30 premières minutes suivant l'induction par la DHT.

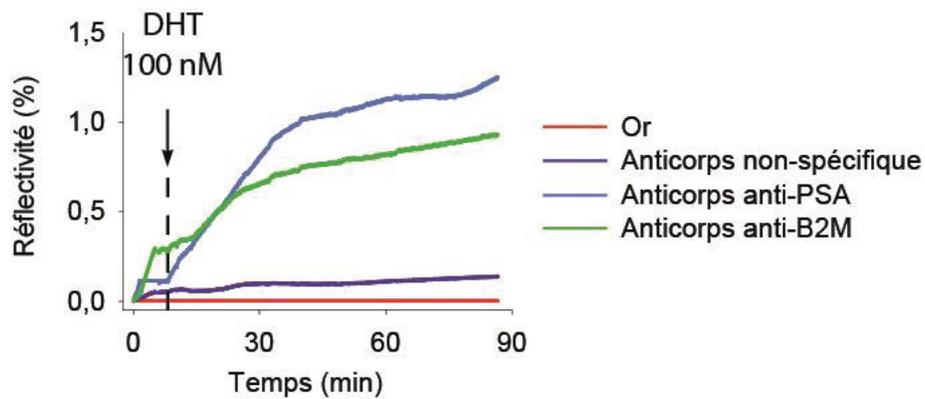


Figure 81 : Détection en temps réel du PSA et de la B2M sécrétés par les cellules LNCaP après induction par le DHT.

Le signal SPRi mesuré est beaucoup plus bas que dans les deux approches précédentes. Cela peut venir notamment du fait que les cellules sont ici situées à 250  $\mu\text{m}$  de la surface sensible, les protéines sécrétées doivent donc diffuser avant d'être reconnues par les anticorps spécifiques. De plus, nous travaillons ici en système fluide et non pas statique comme précédemment, les protéines ne s'accumulent donc plus.

Les variations de réflectivité ont pu être converties en quantité de molécules par unité de surface (en  $\text{pg}/\text{mm}^2$ ) en utilisant l'équation suivante (équation fournie par Genoptix) :

$$\tau = \frac{\Delta R L_{ZC}}{S_{P,R} \delta n / \delta c}$$

Où  $\Delta R$  est la variation de réflectivité en pourcentage,

$L_{ZC} = 1,02 \cdot 10^{-4}$  mm (profondeur de pénétration de l'onde de plasmon),

$S_{P,R} = 2,25 \cdot 10^3$  %/RIU (sensibilité de la SPR en pourcentage par unité d'indice de réfraction),

$\Delta n / \delta c = 1,9 \cdot 10^{-10}$   $\text{mm}^3/\text{pg}$ .

Les variations de réflectivité maximales sont de 1,3% pour le PSA et de 0,8% pour la B2M. Il y a donc 310  $\text{pg}/\text{mm}^2$  de PSA et 191  $\text{pg}/\text{mm}^2$  de B2M.

Les spots d'anticorps ont un diamètre moyen de 250  $\mu\text{m}$  soit une surface de 49062,5  $\mu\text{m}^2$ . Il est alors possible d'estimer la quantité de protéines par spots. Il y a donc 15 pg de PSA par spot et 9 pg de B2M par spot.

Il y a environ 30 cellules LNCaP adhérentes par spot d'anticorps, une cellule aurait alors sécrété 0,5 pg de PSA et 0,3 pg de B2M 1h20 après induction. Cependant ces chiffres sont beaucoup trop faibles pour être le reflet direct de la sécrétion. Ce modèle n'est donc pas approprié pour cette application car la diffusion des molécules est trop importante due à la distance entre les cellules et la couche sensible (250  $\mu\text{m}$ ). De plus les molécules sécrétées non capturées rapidement par les anticorps spécifiques sont éliminées dans le flux, on n'a donc plus d'accumulation de ces molécules au cours du temps.

### 3.5. CONCLUSION

Nous avons pu réaliser avec succès une biopuce fermée, facile à réaliser et qui présente l'avantage de pouvoir être fabriquée à l'avance, stockée et transportée (à 4°C) jusqu'à l'injection des cellules et qui ne nécessite pas d'équipement particulier. De plus, avec ce concept, le temps d'adhésion des cellules est très court (1h contre 4h dans des conditions classiques de culture cellulaire). La cinétique de sécrétion du PSA et de la B2M par les cellules LNCaP a également pu être suivie par SPRI. De plus, la réponse des cellules à l'inducteur a pu être observée après seulement 30 minutes (alors que pour les deux systèmes précédemment décrits la réponse était plutôt observée 1h après l'induction). Cependant l'intensité du signal est plus faible à cause des contraintes diffusionnelles mais est très spécifique.

## 4. BILLES D'ALGINATE EN SOLUTION

Dans les deux premières approches de biopuce, nous avons encapsulé des cellules dans des billes d'alginate. Nous nous sommes alors demandé s'il serait possible d'avoir une cellule dans une goutte de solution déposée (400 pL). Pour cela, il a été nécessaire de travailler avec au moins une phase liquide correspondant à un film de calcium sur le support afin d'éviter l'évaporation pendant le dépôt automatisé de la suspension de cellules/alginate dans ces très faibles volumes (Figure 82).

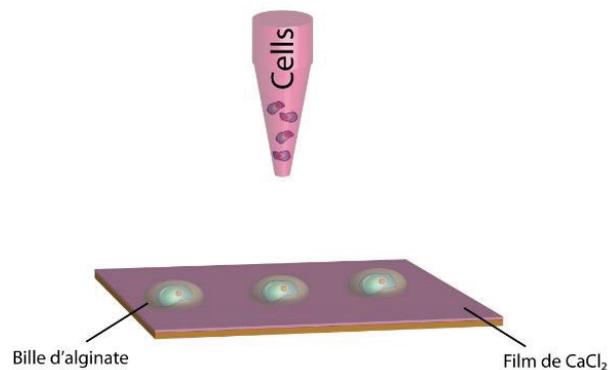


Figure 82 : Schéma de principe de la technique de formation des billes d'alginate en solution.

### 4.1. CONTRÔLE DU NOMBRE DE CELLULES PAR GOUTTE

Nous avons vu précédemment (cf 2.2) que le nombre de cellules par bille d'alginate est directement relié à la concentration de cellules dans la solution d'alginate. Nous avons donc voulu voir ici s'il était possible d'avoir une cellule par goutte d'alginate (400 pL). Il a donc fallu adapter la concentration de la suspension de cellules par rapport au volume final (de 48 nL à 800 pL). Différentes concentrations ont alors été testées. Pour chaque concentration, une matrice de 100 billes a été réalisée puis observée en microscopie optique afin de compter le nombre de cellules par billes. Les résultats obtenus ont l'allure d'une gaussienne centrée sur une valeur qui augmente lorsque la concentration en cellules

augmente. Il est donc plus difficile d’obtenir avec une haute reproductibilité une cellule par bille (Figure 83).

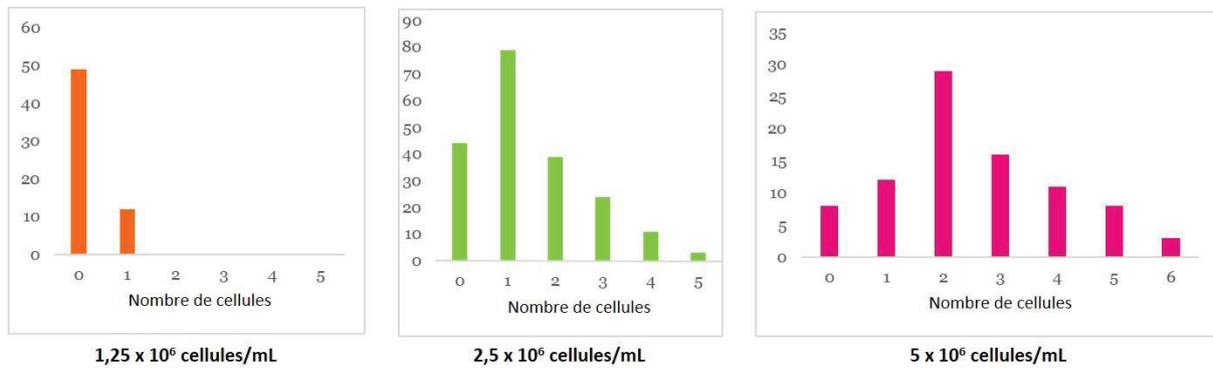


Figure 83 : Contrôle du nombre de cellules encapsulées dans une bille formée d’une goutte (400  $\mu$ L) d’alginate.

Nous nous sommes ensuite demandé quel était le nombre maximal de cellules dans une goutte d’alginate. Pour cela, nous avons utilisé la plus forte concentration de cellules ( $1 \cdot 10^7$  cellules/mL) qui puisse être déposée par le robot de dépôt en solution dans de l’alginate 1%. En effet, l’augmentation du nombre de cellules dans la solution d’alginate entraîne une hausse de la viscosité de la solution, ce qui est un facteur limitant pour l’éjection d’une goutte par l’automate de dépôt. En comptant le nombre de cellules par goutte sur une matrice de 100 billes, nous n’avons pas pu constater que la gaussienne n’est plus centrée sur une seule valeur. Nous n’avons donc pas pu estimer de nombre moyen de cellules par bille avec cette concentration élevée de cellules dans la solution de départ (Figure 84).

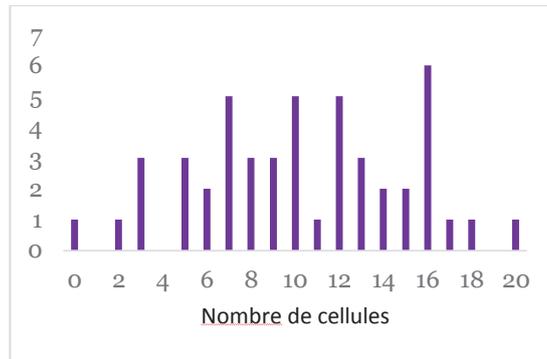


Figure 84 : Graphique représentant le nombre de cellules par bille d'alginate avec une suspension de cellules dans l'alginate à une concentration de  $1.10^7$  cellules/mL.

En théorie nous pensons que le nombre de cellules était relié à la concentration. C'est pourquoi nous avons calculé le nombre maximal théorique de cellules par bille. Nous avons des billes de 400 pL soit  $400\ 000\ \mu\text{m}^3$  et des cellules d'un volume moyen de  $5\ 575\ \mu\text{m}^3$  (diamètre de 22  $\mu\text{m}$ ), le nombre maximal de cellules par bille devrait alors être de 72 or nous ne sommes pas arrivés à obtenir plus de 20 cellules par bille. Nous pouvons en conclure que les billes formées ne sont pas tout à fait sphériques.

## 4.2. APPLICATION

Nous travaillons actuellement avec Charlène Bouyer et Frédéric Padilla de l'équipe LabTAU (LABoratory of Therapeutic Applications of Ultrasound) de l'INSERM de Lyon qui travaillent sur les ultrasons pour la manipulation de particules et notamment de cellules.

L'ingénierie tissulaire est un domaine de recherche en plein essor. En effet, le développement de matériel de culture en 3 dimensions est indispensable pour comprendre le comportement physiologique des cellules dans un environnement 3D mais aussi pour établir des modèles de maladie ou délivrance de médicaments ciblés. De nos jours, il est encore difficile d'établir des assemblages 3D de cellules car cela nécessite régulièrement de nombreuses manipulations et précautions/compétences particulières. L'utilisation d'ultrasons pourrait alors palier à ces problèmes,

pour permettre une manipulation de cellules facile et sans multiples étapes. En effet, les cellules se dirigent naturellement vers les zones de faibles pressions (nœuds de pression) ultrasonores. Le principe était de développer un dispositif pour la manipulation et l’organisation cellulaire en 3 dimensions, sans contact, facile d’utilisation et transportable.

Etablir un champ acoustique avec des nœuds de pression où l’on souhaite organiser les cellules, permettrait alors d’obtenir des motifs différents en fonction des besoins. L’organisation en couches est un phénomène omniprésent dans plusieurs tissus biologiques tels que la peau ou le cortex cérébral. Être capable de reproduire une telle organisation *in vitro* peut aider à obtenir des modèles pour différents tissus.

L’équipe LabTAU s’est alors dirigée vers la création d’ondes stationnaires ultrasonores pour permettre des motifs de couches parallèles de nœuds de pression. Pour cela, une céramique piézoélectrique a été utilisée pour générer des ondes stationnaires au sein de boîte de pétri. Des ondes acoustiques sont produites par la céramique et vont se sommer à des ondes réfléchies de façon à créer des ondes stationnaires. En modulant la fréquence ultrasonore on peut moduler la distance entre 2 nœuds de pression et donc la distance entre 2 couches cellulaires. En utilisant des solutions de fibrinogène/thrombine, il est possible d’encapsuler les particules dans un tel schéma d’organisation. Il est alors possible de garder le gel pour le mettre en culture, par exemple. Par la suite, le gel peut être coupé et étudié au microscope pour valider la présence de multicouches parallèles (Figure 85).

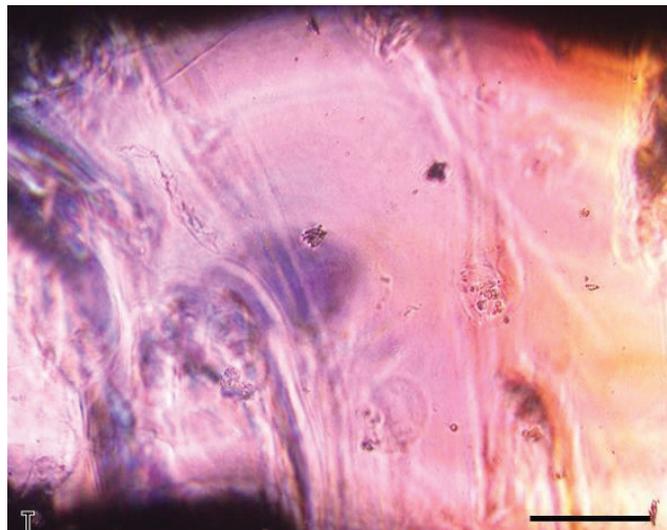


Figure 85 : Vue de profil d’un gel où des cellules sont piégées dans un motif à multicouches parallèles.

Ces résultats ont ouvert de nombreuses perspectives. En effet, cette plateforme acoustique pourrait permettre de manipuler des cellules, de les organiser suivant un schéma multicouche et de les cultiver pour étudier le comportement des cellules en 3D. C’est pourquoi, nous avons joint nos compétences

afin de voir s'il était possible d'organiser des cellules encapsulées dans des microbilles d'alginate en solution selon un schéma multicouche.

Pour cela des gouttes (1200 x 400 pL) d'une solution d'alginate 1% contenant des fibroblastes NIH-3T3 ont été déposées dans une cuve de lévitation remplie une solution de fibrinogène 10 mg/mL – CaCl<sub>2</sub> 100 mM. La cuve a ensuite été montée dans le dispositif de lévitation. De la thrombine a été ajoutée dans la cuve à une concentration finale de 1 U/mL. Les ultrasons sont générés pendant 10 minutes. En théorie, les alignements ont lieu plus rapidement mais c'est le temps que met la thrombine pour former le gel avec le fibrinogène. Le gel est ensuite coupé afin de pouvoir observer les différentes couches par microscopie. Nous avons pu observer que les billes ne sont pas toutes au même niveau dans le gel. Cependant il est difficile de vraiment distinguer des couches (Figure 86). En effet, il n'y a pas assez de billes d'alginate en solution pour former des couches continues. Nous travaillons actuellement à l'optimisation.



*Figure 86 : Image obtenue par microscopie optique d'une coupe transversale d'un gel de fibrinogène/thrombine contenant des billes d'alginate avec des cellules après lévitation pendant 10 minutes.*

### 4.3. CONCLUSION

Il a été possible de réduire la taille des billes d'alginate (de 48 nL à environ 400 pL) en formant ces billes directement dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  100 mM. Le nombre de cellules par billes peut être contrôlé pour des faibles concentrations cellulaires mais atteint vite la saturation du fait du faible volume de la bille formée (20 cellules au maximum). De plus, la bille d'alginate n'a pas une forme tout à fait sphérique en solution car la goutte se fige en entrant au contact du calcium.

En travaillant avec l'équipe LabTAU de l'INSERM nous avons pu commencer à organiser ces billes en 3D dans un gel grâce à des ultrasons mais beaucoup de paramètres sont encore à optimiser.



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont porté sur le développement d'une puce à cellules multiplexée pour l'étude de réponses parallélisées.

Afin de détecter les molécules sécrétées par les cellules en temps réel et sans marquage, la SPRi a été choisie comme système de détection et le choix du support en a découlé, une lamelle de SPRi (25 x 12 x 1 mm) dont la surface est recouverte d'or.

Dans un premier temps ce support a été microstructuré afin d'isoler des cellules. Pour cela une couche homogène de polystyrène a été déposée sur la surface d'or. Des micropuits ont ensuite été formés par dépôt de toluène sur la surface de polystyrène. Le fond de ces puits est composé de la couche d'or initiale, permettant ainsi de créer un contraste d'adhésion entre l'extérieur en polystyrène (cytophobe) et le fond des micropuits en or (cytophile) en plus de la barrière physique. Ces micropuits ont pu être caractérisés grâce à différentes techniques (profilométrie, analyses XPS et ToF, ...). Dans ce système miniaturisé, différentes lignées cellulaires ont pu être co-cultivées sur ce support microtexturé. Pour cela, de petites populations de cellules (de 1 à 100) ont été déposées localement de façon automatisée grâce à la formation d'une bille d'alginate. Cette biopuce a tout d'abord été mise au point avec des cellules HeLa puis transposée aux cellules de cancer de la prostate, les cellules LNCaP. Ces cellules ont la particularité de sécréter l'antigène prostate-spécifique (PSA) et la  $\beta$ -2-microglobuline (B2M) en réponse aux hormones telles que la dihydrotestostérone (DHT). Les cellules LNCaP ont donc été un bon modèle pour étudier la sécrétion de molécules par des cellules par SPRi, grâce aux anticorps spécifiques immobilisés au fond des micropuits. Par ailleurs, il est également possible d'avoir plusieurs phénotypes d'une même lignée cellulaire grâce à la transfection *in situ* à l'intérieur des micropuits. Deux plasmides codant pour des protéines fluorescentes ont été utilisés, les plasmides pmCherry et eGFP, afin de visualiser par microscopie de fluorescence les cellules transfectées. Grâce au confinement des cellules dans les puits, il n'y a pas de contamination d'une population de cellules à une autre.

La capacité des billes d'alginate à maintenir les cellules encapsulées à une position donnée a conduit à une deuxième approche pour la conception de la biopuce. Dans cette approche, la surface n'a pas été modifiée et les billes d'alginate seules ont permis de confiner de petites populations de cellules (de 1 à 100 de manière contrôlée) dans chaque bille. Les anticorps immobilisés sur la surface d'or préalablement au dépôt des cellules dans l'alginate aux mêmes positions ont permis de suivre la cinétique de sécrétion de PSA et de B2M par les cellules LNCaP par SPRI.

D'autre part, un troisième concept de cette puce à cellules a été réalisé. Il s'agit d'un système fermé constitué de deux supports reliés entre eux par un espaceur qui forme un espace microfluidique d'un volume d'environ 100  $\mu$ L. Le premier support est la lamelle de SPRI sur laquelle les anticorps ont été immobilisés de façon à créer une matrice de spots. Le deuxième support est une lamelle de polycarbonate microtexturé par un film de PEO et une matrice de spots de fibronectine qui est l'image miroir de la matrice des spots d'anticorps. Ces spots de fibronectine ont permis l'adhésion localisée des cellules en un temps très court (1h), permettant ainsi de réaliser une biopuce prête rapidement pour l'analyse. Les cinétiques de sécrétion de PSA et de B2M ont également pu être suivies par SPRI.

Ces trois systèmes ont pu être réalisés en partie grâce à un automate de micro-dépôt non contact qui a permis de contrôler précisément les faibles volumes d'échantillons déposés (solutions de transfection, anticorps, cellules, fibronectine) mais surtout leur position en x,y sur les supports permettant ainsi la superposition de plusieurs composés.

L'application directe des outils développés sera l'étude de l'activité de promoteurs liés aux processus d'oncogenèse, en particulier dans le cas du cancer du sein et du côlon : les récepteurs aux hormones stéroïdiennes (RHS) et les facteurs de transcription liés aux voies Wnt/ $\beta$ -caténine, ainsi que le criblage d'une banque de composés chimiques qui pourrait inclure des molécules thérapeutiques inconnues. La réalisation de ce projet permettra de fournir un nouvel outil pour le dépistage des activités des RHS (échantillons environnementaux ou nouveaux composés chimiques) aux universitaires ou à l'industrie. Il permettra également l'identification de nouveaux modulateurs de la voie de signalisation de la transcription Wnt et des RHS, qui pourraient être utiles comme outil pour décrypter le rôle de ces réseaux transcriptionnels sur l'homéostasie cellulaire et la tumorigenèse, et pourraient également être identifiés à l'avenir en tant que nouveaux médicaments pour le traitement du cancer du sein ou des cancers du côlon.

Enfin, dans une dernière partie, la formation de bille d'alginate en solution a été présentée. Ces billes pouvant contenir de 1 à 20 cellules en fonction de la concentration de la solution initiale, serviront dans un premier temps à l'encapsulation de cellules neuronales afin de créer des réseaux 3D par cavitation dans le cadre du projet avec l'équipe LabTau mais pourront par la suite être utilisées pour d'autres applications en encapsulant d'autres types cellulaires.



---

## RÉFÉRENCES

---



- Ahn K, Kerbage C, Hunt TP, Westervelt RM, Link DR, Weitz DA (2006). Dielectrophoretic manipulation of drops for high-speed microfluidic sorting devices. *Applied Physics Letters* **88**(2): 3.
- Akagi Y, Rao SR, Morita Y, Tamiya E (2004). Optimization of fluorescent cell-based assays for high-throughput analysis using microchamber array chip formats. *Science and Technology of Advanced Materials* **5**(3): 343-349.
- Amatore C, Arbault S, Guille M, Lemaitre F (2008). Electrochemical monitoring of single cell secretion: Vesicular exocytosis and oxidative stress. *Chemical Reviews* **108**(7): 2585-2621.
- Arai K, Iwanaga S, Toda H, Genci C, Nishiyama Y, Nakamura M (2011). Three-dimensional inkjet biofabrication based on designed images. *Biofabrication* **3**(3).
- Ashton RS, Peltier J, Fasano CA, O'Neill A, Leonard J, Temple S, *et al.* (2007). High-Throughput Screening of Gene Function in Stem Cells Using Clonal Microarrays. *Stem Cells* **25**(11): 2928-2935.
- Aslani P, Kennedy RA (1996). Studies on diffusion in alginate gels .1. Effect of cross-linking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen. *Journal of Controlled Release* **42**(1): 75-82.
- Baghdoyan S, Roupioz Y, Pitaval A, Castel D, Khomyakova E, Papine A, *et al.* (2004). Quantitative analysis of highly parallel transfection in cell microarrays. *Nucleic Acids Research* **32**(9).
- Baret J-C, Miller OJ, Taly V, Ryckelynck M, El-Harrak A, Frenz L, *et al.* (2009). Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity. *Lab on a Chip* **9**(13): 1850-1858.
- Batorsky A, Liao JH, Lund AW, Plopper GE, Stegemann JP (2005). Encapsulation of adult human mesenchymal stem cells within collagen-agarose microenvironments. *Biotechnology and Bioengineering* **92**(4): 492-500.
- Benya PD, Shaffer JD (1982). Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* **30**(1): 215-224.
- Ber S, Kose GT, Hasirci V (2005). Bone tissue engineering on patterned collagen films: an in vitro study. *Biomaterials* **26**(14): 1977-1986.
- Besra L, Liu M (2007). A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD). *Progress in Materials Science* **52**(1): 1-61.
- Betre H, Setton LA, Meyer DE, Chilkoti A (2002). Characterization of a genetically engineered elastin-like polypeptide for cartilaginous tissue repair. *Biomacromolecules* **3**(5): 910-916.

- Bhatia SN, Yarmush ML, Toner M (1997). Controlling cell interactions by micropatterning in co-cultures: Hepatocytes and 3T3 fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research* **34**(2): 189-199.
- Bretagnol F, Lejeune M, Papadopoulou-Bouraoui A, Hasiwa M, Rauscher H, Ceccone G, *et al.* (2006). Fouling and non-fouling surfaces produced by plasma polymerization of ethylene oxide monomer. *Acta Biomaterialia* **2**(2): 165-172.
- Brouzes E, Medkova M, Savenelli N, Marran D, Twardowski M, Hutchison JB, *et al.* (2009). Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(34): 14195-14200.
- Calvert P (2007). Printing cells. *Science* **318**(5848): 208-209.
- Campo VL, Kawano DF, da Silva DB, Jr., Carvalho I (2009). Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis - A review. *Carbohydrate Polymers* **77**(2): 167-180.
- Capeillereblandin C, Delaveau T, Descamps-latscha B (1991). Structural modifications of human beta-2-microbulin treated with oxygen-derived radicals. *Biochemical Journal* **277**: 175-182.
- Carrel A, Burrows MT (1911). Cultivation of tissues in vitro and its technique. *Journal of Experimental Medicine* **13**(3): 387-U334.
- Castel D, Pitaval A, Debily M-A, Gidrol X (2006). Cell microarrays in drug discovery. *Drug Discovery Today* **11**(13-14): 616-622.
- Catelas I, Sese N, Wu BM, Dunn JCY, Helgerson S, Tawil B (2006). Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. *Tissue Engineering* **12**(8): 2385-2396.
- Chabert M, Dorfman KD, Viovy JL (2005). Droplet fusion by alternating current (AC) field electrocoalescence in microchannels. *Electrophoresis* **26**(19): 3706-3715.
- Chan BP, Hui TY, Yeung CW, Li J, Mo I, Chan GCF (2007). Self-assembled collagen-human mesenchymal stem cell microspheres for regenerative medicine. *Biomaterials* **28**(31): 4652-4666.
- Chandra RA, Douglas ES, Mathies RA, Bertozzi CR, Francis MB (2006). Programmable cell adhesion encoded by DNA hybridization. *Angewandte Chemie-International Edition* **45**(6): 896-901.
- Chatelet C, Damour O, Domard A (2001). Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* **22**(3): 261-268.
- Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE (1997). Geometric control of cell life and death. *Science* **276**(5317): 1425-1428.

- Chen WYJ, Abatangelo G (1999). Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair and Regeneration* **7**(2): 79-89.
- Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, *et al.* (2000). Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials* **21**(21): 2155-2161.
- Cheong R, Wang CJ, Levchenko A (2009). High Content Cell Screening in a Microfluidic Device. *Molecular & Cellular Proteomics* **8**(3): 433-442.
- Chin VI, Taupin P, Sanga S, Scheel J, Gage FH, Bhatia SN (2004). Microfabricated platform for studying stem cell fates. *Biotechnology and Bioengineering* **88**(3): 399-415.
- Christman KL, Vardanian AJ, Fang QZ, Sievers RE, Fok HH, Lee RJ (2004). Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium. *Journal of the American College of Cardiology* **44**(3): 654-660.
- Chung BG, Flanagan LA, Rhee SW, Schwartz PH, Lee AP, Monuki ES, *et al.* (2005). Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device. *Lab on a Chip* **5**(4): 401-406.
- Chung C, Burdick JA (2009). Influence of Three-Dimensional Hyaluronic Acid Microenvironments on Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis. *Tissue Engineering Part A* **15**(2): 243-254.
- Chung JHY, Naficy S, Yue Z, Kapsa R, Quigley A, Moulton SE, *et al.* (2013). Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells. *Biomaterials Science* **1**(7): 763-773.
- Collins FS, Lander ES, Rogers J, Waterston RH, Int Human Genome Sequencing C (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**(7011): 931-945.
- Collins JM, Lam RTS, Yang Z, Semsarieh B, Smetana AB, Nettikadan S (2012). Targeted delivery to single cells in precisely controlled microenvironments. *Lab on a Chip* **12**(15): 2643-2648.
- Collins MN, Birkinshaw C (2007). Comparison of the effectiveness of four different crosslinking agents with hyaluronic acid hydrogel films for tissue-culture applications. *Journal of Applied Polymer Science* **104**(5): 3183-3191.
- Correia CR, Reis RL, Mano JF (2013a). Multilayered Hierarchical Capsules Providing Cell Adhesion Sites. *Biomacromolecules* **14**(3): 743-751.
- Correia CR, Sher P, Reis RL, Mano JF (2013b). Liquefied chitosan-alginate multilayer capsules incorporating poly(L-lactic acid) microparticles as cell carriers. *Soft Matter* **9**(7): 2125-2130.

Costa NL, Sher P, Mano JF (2011a). Liquefied Capsules Coated with Multilayered Polyelectrolyte Films for Cell Immobilization. *Advanced Engineering Materials* **13**(6): B218-B224.

Costa RR, Castro E, Javier Arias F, Carlos Rodriguez-Cabello J, Mano JF (2013a). Multifunctional Compartmentalized Capsules with a Hierarchical Organization from the Nano to the Macro Scales. *Biomacromolecules* **14**(7): 2403-2410.

Costa RR, Custodio CA, Arias FJ, Rodriguez-Cabello JC, Mano JF (2011b). Layer-by-Layer Assembly of Chitosan and Recombinant Biopolymers into Biomimetic Coatings with Multiple Stimuli-Responsive Properties. *Small* **7**(18): 2640-2649.

Costa RR, Custodio CA, Testero AM, Arias FJ, Rodriguez-Cabello JC, Alves NM, *et al.* (2009). Stimuli-Responsive Thin Coatings Using Elastin-Like Polymers for Biomedical Applications. *Advanced Functional Materials* **19**(20): 3210-3218.

Costa RR, Testera AM, Javier Arias F, Carlos Rodriguez-Cabello J, Mano JF (2013b). Layer-by-Layer Film Growth Using Polysaccharides and Recombinant Polypeptides: A Combinatorial Approach. *Journal of Physical Chemistry B* **117**(22): 6839-6848.

Couto DS, Hong Z, Mano JF (2009). Development of bioactive and biodegradable chitosan-based injectable systems containing bioactive glass nanoparticles. *Acta Biomaterialia* **5**(1): 115-123.

Cui X, Boland T, D'Lima DD, Lotz MK (2012). Thermal inkjet printing in tissue engineering and regenerative medicine. *Recent patents on drug delivery & formulation* **6**(2): 149-155.

Dalmay C, Villemejeane J, Joubert V, Silve A, Arnaud-Cormos D, Francais O, *et al.* (2011). A microfluidic biochip for the nanoporation of living cells. *Biosensors & Bioelectronics* **26**(12): 4649-4655.

de Vos P, Faas MM, Strand B, Calafiore R (2006). Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials* **27**(32): 5603-5617.

de Vries AHB, Krenn BE, van Driel R, Kanger JS (2005). Micro magnetic tweezers for nanomanipulation inside live cells. *Biophysical Journal* **88**(3): 2137-2144.

Deiss F, LaFratta CN, Symer M, Blicharz TM, Sojic N, Walt DR (2009). Multiplexed Sandwich Immunoassays Using Electrochemiluminescence Imaging Resolved at the Single Bead Level. *Journal of the American Chemical Society* **131**(17): 6088-+.

del Campo A, Bruce IJ (2005). Substrate patterning and activation strategies for DNA chip fabrication. In: Wittmann C (ed). *Immobilisation of DNA on Chips I*, edn, Vol. 260. p^pp 77-111.

- Denoual M, Mace Y, Le Pioufle B, Mognol P, Castel D, Gidrol X (2006). Vacuum casting to manufacture a plastic biochip for highly parallel cell transfection. *Measurement Science & Technology* **17**(12): 3134-3140.
- Deutsch M, Deutsch A, Shirihai O, Hurevich I, Afrimzon E, Shafran Y, *et al.* (2006). A novel miniature cell retainer for correlative high-content analysis of individual untethered non-adherent cells. *Lab on a Chip* **6**(8): 995-1000.
- Di Carlo D, Wu LY, Lee LP (2006). Dynamic single cell culture array. *Lab on a Chip* **6**(11): 1445-1449.
- Dirosa M (1972). Biological properties of carrageenan. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **24**(2): 89-102.
- Dixon JE, Shah DA, Rogers C, Hall S, Weston N, Parmenter CDJ, *et al.* (2014). Combined hydrogels that switch human pluripotent stem cells from self-renewal to differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**(15): 5580-5585.
- Doil C, Mailand N, Bekker-Jensen S, Menard P, Larsen DH, Pepperkok R, *et al.* (2009). RNF168 Binds and Amplifies Ubiquitin Conjugates on Damaged Chromosomes to Allow Accumulation of Repair Proteins. *Cell* **136**(3): 435-446.
- du Roure O, Saez A, Buguin A, Austin RH, Chavrier P, Silberzan P, *et al.* (2005). Force mapping in epithelial cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(7): 2390-2395.
- Edd JF, Di Carlo D, Humphry KJ, Koster S, Irimia D, Weitz DA, *et al.* (2008). Controlled encapsulation of single-cells into monodisperse picolitre drops. *Lab on a Chip* **8**(8): 1262-1264.
- Elbert DL (2011). Liquid-liquid two-phase systems for the production of porous hydrogels and hydrogel microspheres for biomedical applications: A tutorial review. *Acta Biomaterialia* **7**(1): 31-56.
- Ellis SR, Ferris CJ, Gilmore KJ, Mitchell TW, Blanksby SJ, Panhuis MIH (2012). Direct Lipid Profiling of Single Cells from Inkjet Printed Microarrays. *Analytical Chemistry* **84**(22): 9679-9683.
- Endo T, Yamamura S, Kerman K, Tamiya E (2008). Label-free cell-based assay using localized surface plasmon resonance biosensor. *Analytica Chimica Acta* **614**(2): 182-189.
- Erfle H, Neumann B, Liebel U, Rogers P, Held M, Walter T, *et al.* (2007). Reverse transfection on cell arrays for high content screening microscopy. *Nature Protocols* **2**(2): 392-399.
- Evander M, Johansson L, Lilliehorn T, Piskur J, Lindvall M, Johansson S, *et al.* (2007). Noninvasive acoustic cell trapping in a microfluidic perfusion system for online bioassays. *Analytical Chemistry* **79**(7): 2984-2991.

Eynde XV, Weng LT, Bertrand P (1997). Influence of tacticity on polymer surfaces studied by ToF-SIMS. *Surface and Interface Analysis* **25**(1): 41-45.

Falsey JR, Renil M, Park S, Li SJ, Lam KS (2001). Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. *Bioconjugate Chemistry* **12**(3): 346-353.

Fernandes TG, Kwon S-J, Lee M-Y, Clark DS, Cabral JMS, Dordick JS (2008). On-chip, cell-based microarray immunofluorescence assay for high-throughput analysis of target proteins. *Analytical Chemistry* **80**(17): 6633-6639.

Ferris CJ, Gilmore KJ, Beirne S, McCallum D, Wallace GG, Panhuis MIH (2013). Bio-ink for on-demand printing of living cells. *Biomaterials Science* **1**(2): 224-230.

Fesenko DO, Nasedkina TV, Mirzabekov AD (2001). A bacterial microchip: the principle of operation as exemplified by detection of antibiotics. *Doklady. Biochemistry and biophysics* **381**: 427-429.

Fujita S, Onuki-Nagasaki R, Fukuda J, Enomoto J, Yamaguchi S, Miyake M (2013). Development of super-dense transfected cell microarrays generated by piezoelectric inkjet printing. *Lab on a Chip* **13**(1): 77-80.

Garcia Y, Hemantkumar N, Collighan R, Griffin M, Rodriguez-Cabello JC, Pandit A (2009). In Vitro Characterization of a Collagen Scaffold Enzymatically Cross-Linked with a Tailored Elastin-like Polymer. *Tissue Engineering Part A* **15**(4): 887-899.

Gasparini L, Maniglio D, Migliaresi C (2013). Microencapsulation of cells in alginate through an electrohydrodynamic process. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **28**(5): 413-425.

Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research* **12**(4): 264-265.

Gillette BM, Jensen JA, Wang M, Tchao J, Sia SK (2010). Dynamic Hydrogels: Switching of 3D Microenvironments Using Two-Component Naturally Derived Extracellular Matrices. *Advanced Materials* **22**(6): 686-691.

Grier DG (2003). A revolution in optical manipulation. *Nature* **424**(6950): 810-816.

Grosjean L, Cherif B, Mercey E, Roget A, Levy Y, Marche PN, *et al.* (2005). A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process. *Analytical Biochemistry* **347**(2): 193-200.

Grover SC, Skirtach AG, Gauthier RC, Grover CP (2001). Automated single-cell sorting system based on optical trapping. *Journal of Biomedical Optics* **6**(1): 14-22.

- Guaccio A, Borselli C, Oliviero O, Netti PA (2008). Oxygen consumption of chondrocytes in agarose and collagen gels: A comparative analysis. *Biomaterials* **29**(10): 1484-1493.
- Guedon P, Livache T, Martin F, Lesbre F, Roget A, Bidan G, *et al.* (2000). Characterization and optimization of a real-time, parallel, label-free, polypyrrole-based DNA sensor by surface plasmon resonance imaging. *Analytical Chemistry* **72**(24): 6003-6009.
- Guibet M, Colin S, Barbeyron T, Genicot S, Kloareg B, Michel G, *et al.* (2007). Degradation of lambda-carrageenan by *Pseudoalteromonas carrageenovora* lambda-carrageenase: a new family of glycoside hydrolases unrelated to kappa- and iota-carrageenases. *Biochemical Journal* **404**: 105-114.
- Guillotin B, Guillemot F (2011). Cell patterning technologies for organotypic tissue fabrication. *Trends in Biotechnology* **29**(4): 183-190.
- Han Q, Bradshaw EM, Nilsson B, Hafler DA, Love JC (2010). Multidimensional analysis of the frequencies and rates of cytokine secretion from single cells by quantitative microengraving. *Lab on a Chip* **10**(11): 1391-1400.
- He MY, Edgar JS, Jeffries GDM, Lorenz RM, Shelby JP, Chiu DT (2005). Selective encapsulation of single cells and subcellular organelles into picoliter- and femtoliter-volume droplets. *Analytical Chemistry* **77**(6): 1539-1544.
- Hernandez RM, Orive G, Murua A, Luis Pedraz J (2010). Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**(7-8): 711-730.
- Hide M, Tsutsui T, Sato H, Nishimura T, Morimoto K, Yamamoto S, *et al.* (2002). Real-time analysis of ligand-induced cell surface and intracellular reactions of living mast cells using a surface plasmon resonance-based biosensor. *Analytical Biochemistry* **302**(1): 28-37.
- Hodges E, Redelius JS, Wu WL, Hoog C (2005). Accelerated discovery of novel protein function in cultured human cells. *Molecular & Cellular Proteomics* **4**(9): 1319-1327.
- Holtze C, Rowat AC, Agresti JJ, Hutchison JB, Angile FE, Schmitz CHJ, *et al.* (2008). Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. *Lab on a Chip* **8**(10): 1632-1639.
- Hook AL, Thissen H, Voelcker NH (2009). Advanced Substrate Fabrication for Cell Microarrays. *Biomacromolecules* **10**(3): 573-579.
- Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, *et al.* (1983). LNCaP model of human prostatic-carcinoma. *Cancer Research* **43**(4): 1809-1818.

- Hu XY, Bessette PH, Qian JR, Meinhart CD, Daugherty PS, Soh HT (2005). Marker-specific sorting of rare cells using dielectrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(44): 15757-15761.
- Huang B, Yu F, Zare RN (2007). Surface plasmon resonance imaging using a high numerical aperture microscope objective. *Analytical Chemistry* **79**(7): 2979-2983.
- Hui EE, Bhatia SN (2007). Microscale control of cell contact and spacing via three-component surface patterning. *Langmuir* **23**(8): 4103-4107.
- Hultstrom J, Manneberg O, Dopf K, Hertz HM, Brismar H, Wiklund M (2007). Proliferation and viability of adherent cells manipulated by standing-wave ultrasound in a microfluidic chip. *Ultrasound in Medicine and Biology* **33**(1): 145-151.
- Hung CT, Lima EG, Mauck RL, Taki E, LeRoux MA, Lu HH, *et al.* (2003). Anatomically shaped osteochondral constructs for articular cartilage repair. *Journal of Biomechanics* **36**(12): 1853-1864.
- Hunziker EB (2002). Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage* **10**(6): 432-463.
- Hwang CM, Sant S, Masaeli M, Kachouie NN, Zamanian B, Lee S-H, *et al.* (2010). Fabrication of three-dimensional porous cell-laden hydrogel for tissue engineering. *Biofabrication* **2**(3): 1-12.
- Indovina PL, Tettamanti E, Miccianciogiammarinaro MS, Palma MU (1979). Thermal hysteresis and reversibility of gel-sol transition in agarose-water systems. *Journal of Chemical Physics* **70**(6): 2840-2847.
- Jamil MMA, Denyer MCT, Youseffi M, Britland ST, Liu S, See CW, *et al.* (2008). Imaging of the cell surface interface using objective coupled widefield surface plasmon microscopy. *Journal of Structural Biology* **164**(1): 75-80.
- Jang L-S, Wang M-H (2007). Microfluidic device for cell capture and impedance measurement. *Biomedical Microdevices* **9**(5): 737-743.
- Jiang XY, Bruzewicz DA, Wong AP, Piel M, Whitesides GM (2005). Directing cell migration with asymmetric micropatterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(4): 975-978.
- Jin A, Ozawa T, Tajiri K, Obata T, Kondo S, Kinoshita K, *et al.* (2009). A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. *Nature Medicine* **15**(9): 1088-U1146.

- Joensson HN, Samuels ML, Brouzes ER, Medkova M, Uhlen M, Link DR, *et al.* (2009). Detection and Analysis of Low-Abundance Cell-Surface Biomarkers Using Enzymatic Amplification in Microfluidic Droplets. *Angewandte Chemie-International Edition* **48**(14): 2518-2521.
- Jun Y, Kim MJ, Hwang YH, Jeon EA, Kang AR, Lee S-H, *et al.* (2013). Microfluidics-generated pancreatic islet microfibers for enhanced immunoprotection. *Biomaterials* **34**(33): 8122-8130.
- Kaji H, Tsukidate K, Matsue T, Nishizawa M (2004). In situ control of cellular growth and migration on substrates using microelectrodes. *Journal of the American Chemical Society* **126**(46): 15026-15027.
- Kane RS, Takayama S, Ostuni E, Ingber DE, Whitesides GM (1999). Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* **20**(23-24): 2363-2376.
- Karoubi G, Ormiston ML, Stewart DJ, Courtman DW (2009). Single-cell hydrogel encapsulation for enhanced survival of human marrow stromal cells. *Biomaterials* **30**(29): 5445-5455.
- Khademhosseini A, Eng G, Yeh J, Fukuda J, Blumling J, Langer R, *et al.* (2006). Micromolding of photocrosslinkable hyaluronic acid for cell encapsulation and entrapment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **79A**(3): 522-532.
- Khademhosseini A, Yeh J, Eng G, Karp J, Kaji H, Borenstein J, *et al.* (2005). Cell docking inside microwells within reversibly sealed microfluidic channels for fabricating multiphenotype cell arrays. *Lab on a Chip* **5**(12): 1380-1386.
- Kim IL, Mauck RL, Burdick JA (2011). Hydrogel design for cartilage tissue engineering: A case study with hyaluronic acid. *Biomaterials* **32**(34): 8771-8782.
- Kim L, Vahey MD, Lee HY, Voldman J (2006). Microfluidic arrays for logarithmically perfused embryonic stem cell culture. *Lab on a Chip* **6**(3): 394-406.
- King KR, Wang S, Irimia D, Jayaraman A, Toner M, Yarmush ML (2007). A high-throughput microfluidic real-time gene expression living cell array. *Lab on a Chip* **7**(1): 77-85.
- Kollara A, Diamandis EP, Brown TJ (2003). Secretion of endogenous kallikreins 2 and 3 by androgen receptor-transfected PC-3 prostate cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **84**(5): 493-502.
- Kong HJ, Smith MK, Mooney DJ (2003). Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells. *Biomaterials* **24**(22): 4023-4029.
- Koster S, Angile FE, Duan H, Agresti JJ, Wintner A, Schmitz C, *et al.* (2008). Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells. *Lab on a Chip* **8**(7): 1110-1115.

- Kovac JR, Voldman J (2007). Intuitive, image-based cell sorting using optofluidic cell sorting. *Analytical Chemistry* **79**(24): 9321-9330.
- Kuijpers AJ, Engbers GHM, Feijen J, De Smedt SC, Meyvis TKL, Demeester J, *et al.* (1999). Characterization of the network structure of carbodiimide cross-linked gelatin gels. *Macromolecules* **32**(10): 3325-3333.
- Kumachev A, Greener J, Tumarkin E, Eiser E, Zandstra PW, Kumacheva E (2011). High-throughput generation of hydrogel microbeads with varying elasticity for cell encapsulation. *Biomaterials* **32**(6): 1477-1483.
- Kumar R, Conklin DS, Mittal V (2003). High-throughput selection of effective RNAi probes for gene silencing. *Genome Research* **13**(10): 2333-2340.
- Kuo CK, Ma PX (2001). Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* **22**(6): 511-521.
- Kurth I, Franke K, Pompe T, Bornhauser M, Werner C (2009). Hematopoietic stem and progenitor cells in adhesive microcavities. *Integrative Biology* **1**(5-6): 427-434.
- Lasheras JC, Hopfinger EJ (2000). Liquid jet instability and atomization in a coaxial gas stream. *Annual Review of Fluid Mechanics* **32**: 275-307.
- Laurent TC, Fraser JRE (1992). Hyaluronan. *Faseb Journal* **6**(7): 2397-2404.
- Le Pioufle B, Surbled P, Nagai H, Murakami Y, Chun KS, Tamiya E, *et al.* (2000). Living cells captured on a bio-microsystem devoted to DNA injection. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* **12**(1-2): 77-81.
- Lee CH, Singla A, Lee Y (2001). Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics* **221**(1-2): 1-22.
- Lee KY, Park WH, Ha WS (1997). Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules. *Journal of Applied Polymer Science* **63**(4): 425-432.
- Lee M-Y, Kumar RA, Sukumaran SM, Hogg MG, Clark DS, Dordick JS (2008). Three-dimensional cellular microarray for high-throughput toxicology assays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(1): 59-63.
- Li N, Tourovskaia A, Folch A (2003). Biology on a chip: microfabrication for studying the behavior of cultured cells. *Critical reviews in biomedical engineering* **31**(5-6): 423-488.

- Liberski AR, Delaney JT, Jr., Schubert US (2011). "One Cell-One Well": A New Approach to Inkjet Printing Single Cell Microarrays. *Acs Combinatorial Science* **13**(2): 190-195.
- Lima AC, Batista P, Valente TAM, Sofia Silva A, Correia IJ, Mano JF (2013). Novel Methodology Based on Biomimetic Superhydrophobic Substrates to Immobilize Cells and Proteins in Hydrogel Spheres for Applications in Bone Regeneration. *Tissue Engineering Part A* **19**(9-10): 1175-1187.
- Lima AC, Correia CR, Oliveira MB, Mano JF (2014). Sequential ionic and thermogelation of chitosan spherical hydrogels prepared using superhydrophobic surfaces to immobilize cells and drugs. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **29**(1): 50-65.
- Lima AC, Sher P, Mano JF (2012). Production methodologies of polymeric and hydrogel particles for drug delivery applications. *Expert Opinion on Drug Delivery* **9**(2): 231-248.
- Link DR, Anna SL, Weitz DA, Stone HA (2004). Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices. *Physical Review Letters* **92**(5): 4.
- Litvinov RI, Gorkun OV, Owen SF, Shuman H, Weisel JW (2005). Polymerization of fibrin: specificity, strength, and stability of knob-hole interactions studied at the single-molecule level. *Blood* **106**(9): 2944-2951.
- Liu C, Lei T, Ino K, Matsue T, Tao N, Li C-Z (2012). Real-time monitoring biomarker expression of carcinoma cells by surface plasmon resonance biosensors. *Chemical Communications* **48**(84): 10389-10391.
- Liu W, Dechev N, Foulds IG, Burke R, Parameswaran A, Park EJ (2009). A novel permalloy based magnetic single cell micro array. *Lab on a Chip* **9**(16): 2381-2390.
- Liu WG, Sun SJ, Cao ZQ, Xin Z, Yao KD, Lu WW, *et al.* (2005). An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes. *Biomaterials* **26**(15): 2705-2711.
- Liu Y, Germain T, Pappas D (2014). Microfluidic antibody arrays for simultaneous cell separation and stimulus. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406**(30): 7867-7873.
- Lopez GP, Biebuyck HA, Harter R, Kumar A, Whitesides GM (1993). Fabrication and imaging of 2-dimensional patterns of proteins adsorbed on self-assembled monolayers by scanning electron-microscopy. *Journal of the American Chemical Society* **115**(23): 10774-10781.
- Loram LC, Fuller A, Fick LG, Cartmell T, Poole S, Mitchell D (2007). Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *Journal of Pain* **8**(2): 127-136.
- Lorentz KM, Kontos S, Frey P, Hubbell JA (2011). Engineered aprotinin for improved stability of fibrin biomaterials. *Biomaterials* **32**(2): 430-438.

Love JC, Ronan JL, Grotenbreg GM, van der Veen AG, Ploegh HL (2006). A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies. *Nature Biotechnology* **24**(6): 703-707.

Luna SM, Gomes ME, Mano JF, Reis RL (2010). Development of a Novel Cell Encapsulation System Based on Natural Origin Polymers for Tissue Engineering Applications. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **25**(4): 341-359.

Malafaya PB, Silva GA, Reis RL (2007). Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**(4-5): 207-233.

Malatesta M, Mannello F, Luchetti F, Marcheggiani F, Condemi L, Papa S, *et al.* (2000). Prostate-specific antigen synthesis and secretion by human placenta: A physiological kallikrein source during pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **85**(1): 317-321.

Manneberg O, Vanherberghen B, Svennebring J, Hertz HM, Onfelt B, Wiklund M (2008). A three-dimensional ultrasonic cage for characterization of individual cells. *Applied Physics Letters* **93**(6).

Manso-Silvan M, Valsesia A, Gilliland D, Ceccone G, Rossi F (2004). Ion-beam treatment of PEO; towards a physically stabilized anti-fouling film. *Surface and Interface Analysis* **36**(8): 733-736.

Marquette CA, Corgier BP, Heyries KA, Blum LJ (2008). Biochips: non-conventional strategies for biosensing elements immobilization. *Frontiers in Bioscience-Landmark* **13**: 382-400.

Martins GV, Mano JF, Alves NM (2011). Dual Responsive Nanostructured Surfaces for Biomedical Applications. *Langmuir* **27**(13): 8415-8423.

Martins GV, Merino EG, Mano JF, Alves NM (2010). Crosslink Effect and Albumin Adsorption onto Chitosan/Alginate Multilayered Systems: An in situ QCM-D Study. *Macromolecular Bioscience* **10**(12): 1444-1455.

McCormack RT, Rittenhouse HG, Finlay JA, Sokoloff RL, Wang TJ, Wolfert RL, *et al.* (1995). Molecular-forms of prostate-specific antigen and the human kallikrein gene family - a new era. *Urology* **45**(5): 729-744.

Miao WJ, Bard AJ (2003). Electrogenerated chemluminescence. 72. Determination of immobilized DNA and C-reactive protein on Au(111) electrodes using Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) labels. *Analytical Chemistry* **75**(21): 5825-5834.

Michel AS, Mestdagh MM, Axelos MAV (1997). Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations. *International Journal of Biological Macromolecules* **21**(1-2): 195-200.

- Michelini E, Roda A (2012). Staying alive: new perspectives on cell immobilization for biosensing purposes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **402**(5): 1785-1797.
- Michiels F, van Es H, van Rompaey L, Merchiers P, Francken B, Pittois K, *et al.* (2002). Arrayed adenoviral expression libraries for functional screening. *Nature Biotechnology* **20**(11): 1154-1157.
- Milgram S, Cortes S, Villiers M-B, Marche P, Buhot A, Livache T, *et al.* (2011). On chip real time monitoring of B-cells hybridoma secretion of immunoglobulin. *Biosensors & Bioelectronics* **26**(5): 2728-2732.
- Mir LM, Gehl J, Sersa G, Collins CG, Garbay J-R, Billard V, *et al.* (2006). Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator (TM) by means of invasive or non-invasive electrodes. *Ejc Supplements* **4**(11): 14-25.
- Mosesson MW (2005). Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **3**(8): 1894-1904.
- Mousses S, Caplen NJ, Cornelison R, Weaver D, Basik M, Hautaniemi S, *et al.* (2003). RNAi microarray analysis in cultured mammalian cells. *Genome Research* **13**(10): 2341-2347.
- Mrksich M, Dike LE, Tien J, Ingber DE, Whitesides GM (1997). 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): 305-313.
- Murua A, Portero A, Orive G, Hernandez RM, de Castro M, Luis Pedraz J (2008). Cell microencapsulation technology: Towards clinical application. *Journal of Controlled Release* **132**(2): 76-83.
- Nagoshi E, Saini C, Bauer C, Laroche T, Naef F, Schibler U (2004). Circadian gene expression in individual fibroblasts: Cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* **119**(5): 693-705.
- Neumann B, Walter T, Heriche J-K, Bulkescher J, Erfle H, Conrad C, *et al.* (2010). Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature* **464**(7289): 721-727.
- Nilsson J, Evander M, Hammarstrom B, Laurell T (2009). Review of cell and particle trapping in microfluidic systems. *Analytica Chimica Acta* **649**(2): 141-157.
- Oh EH, Lee SH, Lee SH, Ko HJ, Park TH (2014). Cell-based high-throughput odorant screening system through visualization on a microwell array. *Biosensors & Bioelectronics* **53**: 18-25.

- Ostuni E, Kane R, Chen CS, Ingber DE, Whitesides GM (2000). Patterning mammalian cells using elastomeric membranes. *Langmuir* **16**(20): 7811-7819.
- Pachence JM (1996). Collagen-based devices for soft tissue repair. *Journal of Biomedical Materials Research* **33**(1): 35-40.
- Park YD, Tirelli N, Hubbell JA (2003). Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks. *Biomaterials* **24**(6): 893-900.
- Peterbauer T, Heitz J, Olbrich M, Hering S (2006). Simple and versatile methods for the fabrication of arrays of live mammalian cells. *Lab on a Chip* **6**(7): 857-863.
- Piwovar AM, Lockyer N, Vickerman JC (2008). Investigation of molecular weight effects of polystyrene in ToF-SIMS using C-60(+) and Au+ primary ion beams. *Applied Surface Science* **255**(4): 912-915.
- Poncelet D, Neufeld RJ, Goosen MFA, Burgarski B, Babak V (1999). Formation of microgel beads by electric dispersion of polymer solutions. *Aiche Journal* **45**(9): 2018-2023.
- Popa EG, Carvalho PP, Dias AF, Santos TC, Santo VE, Marques AP, *et al.* (2014). Evaluation of the in vitro and in vivo biocompatibility of carrageenan-based hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **102**(11): 4087-4097.
- Popa EG, Gomes ME, Reis RL (2011). Cell Delivery Systems Using Alginate-Carrageenan Hydrogel Beads and Fibers for Regenerative Medicine Applications. *Biomacromolecules* **12**(11): 3952-3961.
- Prime KL, Whitesides GM (1993). Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide) - A model system using self-assembled monolayers. *Journal of the American Chemical Society* **115**(23): 10714-10721.
- Puga AM, Lima AC, Mano JF, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C (2013). Pectin-coated chitosan microgels crosslinked on superhydrophobic surfaces for 5-fluorouracil encapsulation. *Carbohydrate Polymers* **98**(1): 331-340.
- Rajan S, Djambazian H, Dang HCP, Sladek R, Hudson TJ (2011). The living microarray: a high-throughput platform for measuring transcription dynamics in single cells. *Bmc Genomics* **12**.
- Ramser K, Hanstorp D (2010). Optical manipulation for single-cell studies. *Journal of Biophotonics* **3**(4): 187-206.
- Rantala JK, Makela R, Aaltola A-R, Laasola P, Mpindi J-P, Nees M, *et al.* (2011). A cell spot microarray method for production of high density siRNA transfection microarrays. *Bmc Genomics* **12**.

- Rettig JR, Folch A (2005). Large-scale single-cell trapping and imaging using microwell arrays. *Analytical Chemistry* **77**(17): 5628-5634.
- Revzin A, Sekine K, Sin A, Tompkins RG, Toner M (2005). Development of a microfabricated cytometry platform for characterization and sorting of individual leukocytes. *Lab on a Chip* **5**(1): 30-37.
- Revzin A, Tompkins RG, Toner M (2003). Surface engineering with poly(ethylene glycol) photolithography to create high-density cell arrays on glass. *Langmuir* **19**(23): 9855-9862.
- Rinaudo M (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* **31**(7): 603-632.
- Rocha PM, Santo VE, Gomes ME, Reis RL, Mano JF (2011). Encapsulation of adipose-derived stem cells and transforming growth factor-beta 1 in carrageenan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **26**(5): 493-507.
- Rodriguez NM, Desai RA, Trappmann B, Baker BM, Chen CS (2014). Micropatterned Multicolor Dynamically Adhesive Substrates to Control Cell Adhesion and Multicellular Organization. *Langmuir* **30**(5): 1327-1335.
- Rogers JA, Paul KE, Whitesides GM (1998). Quantifying distortions in soft lithography. *Journal of Vacuum Science & Technology B* **16**(1): 88-97.
- Roth EA, Xu T, Das M, Gregory C, Hickman JJ, Boland T (2004). Inkjet printing for high-throughput cell patterning. *Biomaterials* **25**(17): 3707-3715.
- Rowe SL, Lee S, Stegemann JP (2007). Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels. *Acta Biomaterialia* **3**(1): 59-67.
- Ruiz A, Zychowicz M, Ceriotti L, Mehn D, Sirghi L, Rauscher H, *et al.* (2013). Microcontact printing and microspotting as methods for direct protein patterning on plasma deposited polyethylene oxide: application to stem cell patterning. *Biomedical Microdevices* **15**(3): 495-507.
- Saadi W, Rhee SW, Lin F, Vahidi B, Chung BG, Jeon NL (2007). Generation of stable concentration gradients in 2D and 3D environments using a microfluidic ladder chamber. *Biomedical Microdevices* **9**(5): 627-635.
- Sakai S, Ito S, Inagaki H, Hirose K, Matsuyama T, Taya M, *et al.* (2011). Cell-enclosing gelatin-based microcapsule production for tissue engineering using a microfluidic flow-focusing system. *Biomicrofluidics* **5**(1): 1-7.

- Sakai S, Ito S, Ogushi Y, Hashimoto I, Hosoda N, Sawae Y, *et al.* (2009). Enzymatically fabricated and degradable microcapsules for production of multicellular spheroids with well-defined diameters of less than 150  $\mu\text{m}$ . *Biomaterials* **30**(30): 5937-5942.
- Sams AE, Nixon AJ (1995). Chondrocyte-laden collagen scaffolds for resurfacing extensive articular cartilage defects. *Osteoarthritis and Cartilage* **3**(1): 47-59.
- Sardesai NP, Barron JC, Rusling JF (2011). Carbon Nanotube Microwell Array for Sensitive Electrochemiluminescent Detection of Cancer Biomarker Proteins. *Analytical Chemistry* **83**(17): 6698-6703.
- Schrezenmeir J, Kirchgessner J, Gero L, Kunz LA, Beyer J, Muellerklieser W (1994). Effect of microencapsulation on oxygen distribution in islets organs. *Transplantation* **57**(9): 1308-1314.
- Sefat F, Denyer MCT, Youseffi M (2011). Imaging via widefield surface plasmon resonance microscope for studying bone cell interactions with micropatterned ECM proteins. *Journal of Microscopy* **241**(3): 282-290.
- Selimovic S, Oh J, Bae H, Dokmeci M, Khademhosseini A (2012). Microscale Strategies for Generating Cell-Encapsulating Hydrogels. *Polymers* **4**(3): 1554-1579.
- Seuss S, Boccaccini AR (2013). Electrophoretic Deposition of Biological Macromolecules, Drugs, And Cells. *Biomacromolecules* **14**(10): 3355-3369.
- Shah M, Hsueh P-Y, Sun G, Chang HY, Janib SM, MacKay JA (2012). Biodegradation of elastin-like polypeptide nanoparticles. *Protein Science* **21**(6): 743-750.
- Shen MC, Martinson L, Wagner MS, Castner DG, Ratner BD, Horbett TA (2002). PEO-like plasma polymerized tetraglyme surface interactions with leukocytes and proteins: in vitro and in vivo studies. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **13**(4): 367-390.
- Shi J, Ahmed D, Mao X, Lin S-CS, Lawit A, Huang TJ (2009). Acoustic tweezers: patterning cells and microparticles using standing surface acoustic waves (SSAW). *Lab on a Chip* **9**(20): 2890-2895.
- Shin MK, Kim SK, Jung H (2011). Integration of intra- and extravasation in one cell-based microfluidic chip for the study of cancer metastasis. *Lab on a Chip* **11**(22): 3880-3887.
- Shin SR, Aghaei-Ghareh-Bolagh B, Dang TT, Topkaya SN, Gao X, Yang SY, *et al.* (2013). Cell-laden Microengineered and Mechanically Tunable Hybrid Hydrogels of Gelatin and Graphene Oxide. *Advanced Materials* **25**(44): 6385-6391.

- Silva TH, Alves A, Ferreira BM, Oliveira JM, Reys LL, Ferreira RJF, *et al.* (2012). Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest. *International Materials Reviews* **57**(5): 276-307.
- Sittinger M, Hutmacher DW, Risbud MV (2004). Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. *Current Opinion in Biotechnology* **15**(5): 411-418.
- Smeds KA, Grinstaff MW (2001). Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation. *Journal of Biomedical Materials Research* **54**(1): 115-121.
- Smidsrod O, Skjakbraek G (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology* **8**(3): 71-78.
- Song W, Lima AC, Mano JF (2010). Bioinspired methodology to fabricate hydrogel spheres for multi-applications using superhydrophobic substrates. *Soft Matter* **6**(23): 5868-5871.
- Spudich JL, Koshland DE (1976). Non-genetic individuality - chance in single cell. *Nature* **262**(5568): 467-471.
- Struve J, Maher PC, Li YQ, Kinney S, Fehlings MG, Kuntz C, *et al.* (2005). Disruption of the hyaluronan-based extracellular matrix in spinal cord promotes astrocyte proliferation. *Glia* **52**(1): 16-24.
- Sugio Y, Kojima K, Moriguchi H, Takahashi K, Kaneko T, Yasuda K (2004). An agar-based on-chip neural-cell-cultivation system for stepwise control of network pattern generation during cultivation. *Sensors and Actuators B-Chemical* **99**(1): 156-162.
- Suh KY, Seong J, Khademhosseini A, Laibinis PE, Langer R (2004). A simple soft lithographic route to fabrication of poly(ethylene glycol) microstructures for protein and cell patterning. *Biomaterials* **25**(3): 557-563.
- Suraniti E, Sollier E, Calemczuk R, Livache T, Marche PN, Villiers M-B, *et al.* (2007). Real-time detection of lymphocytes binding on an antibody chip using SPR imaging. *Lab on a Chip* **7**(9): 1206-1208.
- Taff BM, Voldman J (2005). A scalable addressable positive-dielectrophoretic cell-sorting array. *Analytical Chemistry* **77**(24): 7976-7983.
- Takayama S, Ostuni E, LeDuc P, Naruse K, Ingber DE, Whitesides GM (2001). Laminar flows - Subcellular positioning of small molecules. *Nature* **411**(6841): 1016-1016.
- Tanaka H, Matsumura M, Veliky IA (1984). Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering* **26**(1): 53-58.

- Tanase M, Felton EJ, Gray DS, Hultgren A, Chen CS, Reich DH (2005). Assembly of multicellular constructs and microarrays of cells using magnetic nanowires. *Lab on a Chip* **5**(6): 598-605.
- Tang S, Yang W, Mao X (2007). Agarose/collagen composite scaffold as an anti-adhesive sheet. *Biomedical Materials* **2**(3): S129-S134.
- Taylor LC, Walt DR (2000). Application of high-density optical microwell arrays in a live-cell biosensing system. *Analytical Biochemistry* **278**(2): 132-142.
- They M (2010). Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *Journal of Cell Science* **123**(24): 4201-4213.
- They M, Racine V, Pepin A, Piel M, Chen Y, Sibarita JB, *et al.* (2005). The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nature Cell Biology* **7**(10): 947-U929.
- Tien J, Nelson CM, Chen CS (2002). Fabrication of aligned microstructures with a single elastomeric stamp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(4): 1758-1762.
- Tokimitsu Y, Kishi H, Kondo S, Honda R, Tajiri K, Motoki K, *et al.* (2007). Single lymphocyte analysis with a microwell array chip. *Cytometry Part A* **71A**(12): 1003-1010.
- Tsong TY (1991). Electroporation of cell-membranes. *Biophysical Journal* **60**(2): 297-306.
- Uludag H, De Vos P, Tresco PA (2000). Technology of mammalian cell encapsulation. *Advanced Drug Delivery Reviews* **42**(1-2): 29-64.
- Valero A, Merino F, Wolbers F, Luttge R, Vermes I, Andersson H, *et al.* (2005). Apoptotic cell death dynamics of HL60 cells studied using a microfluidic cell trap device. *Lab on a Chip* **5**(1): 49-55.
- Valero A, Post JN, van Nieuwkastele JW, ter Braak PM, Kruijer W, van den Berg A (2008). Gene transfer and protein dynamics in stem cells using single cell electroporation in a microfluidic device. *Lab on a Chip* **8**(1): 62-67.
- Van den Bulcke AI, Bogdanov B, De Rooze N, Schacht EH, Cornelissen M, Berghmans H (2000). Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* **1**(1): 31-38.
- Velev OD, Bhatt KH (2006). On-chip micromanipulation and assembly of colloidal particles by electric fields. *Soft Matter* **2**(9): 738-750.
- Vickerman JC, Gilmore IS (2009). *The Principal Techniques* 2nd edition Wiley Ltd.

- Voldman J (2006). Engineered systems for the physical manipulation of single cells. *Current Opinion in Biotechnology* **17**(5): 532-537.
- Wang W, Wang S, Liu Q, Wu J, Tao N (2012). Mapping Single-Cell-Substrate Interactions by Surface Plasmon Resonance Microscopy. *Langmuir* **28**(37): 13373-13379.
- Weadock KS, Miller EJ, Keuffel EL, Dunn MG (1996). Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *Journal of Biomedical Materials Research* **32**(2): 221-226.
- Weisel JW (2005). Fibrinogen and fibrin. *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers* **70**: 247-299.
- Wheeler AR, Thronset WR, Whelan RJ, Leach AM, Zare RN, Liao YH, *et al.* (2003). Microfluidic device for single-cell analysis. *Analytical Chemistry* **75**(14): 3581-3586.
- Wheeler DB, Carpenter AE, Sabatini DM (2005). Cell microarrays and RNA interference chip away at gene function. *Nature Genetics* **37**: S25-S30.
- Winkleman A, Gudiksen KL, Ryan D, Whitesides GM, Greenfield D, Prentiss M (2004). A magnetic trap for living cells suspended in a paramagnetic buffer. *Applied Physics Letters* **85**(12): 2411-2413.
- Wise SG, Weiss AS (2009). Tropoelastin. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**(3): 494-497.
- Wu M-S, Shi H-W, He L-J, Xu J-J, Chen H-Y (2012). Microchip Device with 64-Site Electrode Array for Multiplexed Immunoassay of Cell Surface Antigens Based on Electrochemiluminescence Resonance Energy Transfer. *Analytical Chemistry* **84**(9): 4207-4213.
- Wu RZ, Bailey SN, Sabatini DM (2002). Cell-biological applications of transfected-cell microarrays. *Trends in Cell Biology* **12**(10): 485-488.
- Xia N, Hu YH, Grainger DW, Castner DG (2002). Functionalized poly(ethylene glycol)-grafted polysiloxane monolayers for control of protein binding. *Langmuir* **18**(8): 3255-3262.
- Xie J, Wang C-H (2007). Electro spray in the dripping mode for cell microencapsulation. *Journal of Colloid and Interface Science* **312**(2): 247-255.
- Xu T, Jin J, Gregory C, Hickman JJ, Boland T (2005). Inkjet printing of viable mammalian cells. *Biomaterials* **26**(1): 93-99.
- Xu T, Molnar P, Gregory C, Das M, Boland T, Hickman JJ (2009). Electrophysiological characterization of embryonic hippocampal neurons cultured in a 3D collagen hydrogel. *Biomaterials* **30**(26): 4377-4383.

- Xu T, Olson J, Zhao W, Atala A, Zhu J-M, Yoo JJ (2008). Characterization of cell constructs generated with inkjet printing technology using in vivo magnetic resonance imaging. *Journal of Manufacturing Science and Engineering-Transactions of the Asme* **130**(2).
- Yamaguchi S, Komiya S, Matsunuma E, Yamahira S, Kihara T, Miyake J, *et al.* (2013). Transfer Printing of Transfected Cell Microarrays From Poly(Ethylene Glycol)-Oleyl Surfaces Onto Biological Hydrogels. *Biotechnology and Bioengineering* **110**(12): 3269-3274.
- Yamazoe H, Iwata H (2005). Cell microarray for screening feeder cells for differentiation of embryonic stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **100**(3): 292-296.
- Yanase Y, Hiragun T, Kaneko S, Gould HJ, Greaves MW, Hide M (2010). Detection of refractive index changes in individual living cells by means of surface plasmon resonance imaging. *Biosensors & Bioelectronics* **26**(2): 674-681.
- Yarmush ML, King KR (2009). Living-Cell Microarrays. In. *Annual Review of Biomedical Engineering*, edn, Vol. 11. p<sup>^</sup>pp 235-257.
- Ye Q, Zund G, Benedikt P, Jockenhoevel S, Hoerstrup SP, Sakyama S, *et al.* (2000). Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* **17**(5): 587-591.
- Yoo S, Han S, Park YS, Lee J-H, Oh U, Hwang SW (2009). Lipoxygenase inhibitors suppressed carrageenan-induced Fos-expression and inflammatory pain responses in the rat. *Molecules and Cells* **27**(4): 417-422.
- Yoshikawa T, Uchimura E, Kishi M, Funeriu DP, Miyake M, Miyake J (2004). Transfection microarray of human mesenchymal stem cells and on-chip siRNA gene knockdown. *Journal of Controlled Release* **96**(2): 227-232.
- Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos AG (2005). Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release* **109**(1-3): 256-274.
- Yu J, Gu Y, Du KT, Mihardja S, Sievers RE, Lee RJ (2009). The effect of injected RGD modified alginate on angiogenesis and left ventricular function in a chronic rat infarct model. *Biomaterials* **30**(5): 751-756.
- Yusof A, Keegan H, Spillane CD, Sheils OM, Martin CM, O'Leary JJ, *et al.* (2011). Inkjet-like printing of single-cells. *Lab on a Chip* **11**(14): 2447-2454.
- Zhang J, Qi H, Li Y, Yang J, Gao Q, Zhang C (2008). Electrogenerated chemiluminescence DNA biosensor based on hairpin DNA probe labeled with ruthenium complex. *Analytical Chemistry* **80**(8): 2888-2894.

Zhang SG, Yan L, Altman M, Lasse M, Nugent H, Frankel F, *et al.* (1999). Biological surface engineering: a simple system for cell pattern formation. *Biomaterials* **20**(13): 1213-1220.

Zheng S, Lin H, Liu J-Q, Balic M, Datar R, Cote RJ, *et al.* (2007). Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells. *Journal of Chromatography A* **1162**(2): 154-161.

Zhou H, Xu HHK (2011). The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **32**(30): 7503-7513.

Zhou H, Zhao L, Zhang X (2015). In-Channel Printing-Device Opening Assay for Micropatterning Multiple Cells and Gene Analysis. *Analytical Chemistry* **87**(4): 2048-2053.

Zhu H, Stybayeva G, Silangcruz J, Yan J, Ramanculov E, Dandekar S, *et al.* (2009). Detecting Cytokine Release from Single T-cells. *Analytical Chemistry* **81**(19): 8150-8156.

Ziauddin J, Sabatini DM (2001). Microarrays of cells expressing defined cDNAs. *Nature* **411**(6833): 107-110.





**Résumé** Les travaux présentés dans cette thèse concernent le développement d'une puce à cellules multiplexée pour l'étude de réponses cellulaires parallélisées. La lignée de cellules issues de cancer de la prostate, les cellules LNCaP, ont servi de modèle d'étude grâce à leur capacité à sécréter l'antigène prostate-spécifique (PSA) et la  $\beta$ -2-microglobuline (B2M) en réponse à l'induction par des hormones telles que la dihydrotestostérone (DHT). Nous avons ainsi pu détecter en temps réel et sans marquage ces molécules lors de leur sécrétion par de petites populations de cellules LNCaP adhérentes (de 1 à 100 cellules) à des positions déterminées sur une biopuce SPRi.

Trois approches différentes ont été envisagées pour cette biopuce. La première consistait à microtexturer la surface d'or d'un support de SPRi afin d'obtenir des micropuits dont le fond révèle la surface d'or (région cytophile) et dont l'extérieur est composé de polystyrène (cytophobe) afin de créer un contraste d'adhésion pour la culture cellulaire. Des anticorps ont pu être immobilisés de façon contrôlée dans les micropuits grâce à un automate de micro-dépôt non contact. Dans ce système miniaturisé, différentes lignées cellulaires ont pu être co-cultivées sur une surface de 1 cm<sup>2</sup>, ouvrant la voie au multiplexage. Une petite population de cellules (de 1 à 100) a été déposée de façon automatisée dans chaque micropuits. Afin de maintenir les cellules dans un milieu hydraté au cours du dépôt, un polymère d'alginate biocompatible a été utilisé. Cette méthode permet l'encapsulation de cellules dans un très petit volume (< 50 nL). La capacité de cet hydrogel à maintenir les cellules encapsulées à une position donnée sur le support a conduit à la conception d'une deuxième approche pour la fabrication de la biopuce. En effet dans cette approche la surface n'est pas modifiée et les composés biologiques (anticorps et cellules) sont directement déposés de façon automatisée sur la couche d'or. Enfin une dernière approche a été développée en immobilisant cette fois-ci les cellules sur un support microtexturé placé en face de la couche sensible de SPRi.

Dans les trois approches, les cinétiques de sécrétion du PSA et de la B2M sécrétées ont pu être suivies par SPRi.

### Multiplexed cell chip for the study of parallelized cellular responses

**Abstract** The work reported in this thesis focuses on the development of a multiplexed cell chip for the study of parallelized cellular responses. The lineage of cells from Prostate cancer LNCaP cells, were used as a study model thanks to their ability to secrete prostate-specific antigen (PSA) and  $\beta$ -2-microglobulin (B2M) in response to induction by hormones such as dihydrotestosterone (DHT). We were able to detect in real time these label-free molecules and their secretion by small populations of adherent LNCaP cells (from 1 to 100 cells) at specified positions on a SPRi biochip.

Three different approaches were considered for this biochip. The first was to pattern the gold surface of a SPRi slide to obtain microwells whose bottom reveals the gold surface (cytophilic area) and an outer shell composed of polystyrene (cytophobe) to create an adhesive/non-adhesive surface for cell culture. Antibodies were immobilized in a controlled manner in the microwells using a piezo electric spotter. In this miniaturized system, different cell lines were co-cultured on a surface of 1 cm<sup>2</sup>, paving the way for multiplexing. A small population of cells (1 to 100) was deposited in an automated manner into each microwell. In order to maintain the cells in a hydrated environment during deposition, a biocompatible alginate polymer was used. This method allows the encapsulation of cells in a very small volume (<50 nL). The ability of the hydrogel to maintain the encapsulated cells in a given position on the support led to the design of a second approach for the production of the biochip. In this second approach the surface is not altered and biological compounds (antibodies and cells) are directly deposited in an automated manner on the gold layer. Finally, a last approach was developed by immobilizing the cells on a patterned substrate placed in front of the sensitive layer SPRi.

In all three approaches, the kinetics of PSA secretion and secreted B2M could be followed by SPRi.

**Discipline** Biochimie

**Mots clés** Biopuce ; Transfection in situ ; Culture cellulaire localisée ; Encapsulation ; Hydrogel ; Microtexturation ; SPRi

**Keywords** Microarray ; Reverse transcription ; Localized cell culture ; Encapsulation ; Hydrogel ; Patterning ; SPRi

**Laboratoire** Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires  
Équipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires  
UMR 5246 – Université Lyon 1 – CNRS – CPE Lyon – INSA Lyon  
Bâtiment Curien – 43, Bd du 11 novembre 1918 – 69622 Villeurbanne Cédex