

Liste des abréviations

6-MCH : 6-mercaptohexanol

11-MUA : Acide 11-mercaptoundécanoïque

11-MHA : 11-mercaptohexanol

16-MHA : Acide 16-mercaptohexadécanoïque

- A -

Ac : Anticorps

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

Ag : Antigène

ASCs : *Adipose Stem Cells* / Cellules Souches Adipeuses

- B -

BAT : *Brown Adipose Tissue*

BMMSCs : *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*

BSA : *Bovine Serum Albumin*

- C -

CD : Cluster de Différentiation

CSMs : Cellules Souches Mésenchymateuses

CTC : Cellule Tumorale Cancéreuse

- D -

DI (eau) : Désionisée

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DT2 : Diabète de Type II

- E -

EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

ES : *Embryonic Stem*

- F -

FACS : *Fluorescent Activated Cell Sorter*

FITC : Fluorescéine

FSC : *Forward Scatter*

- G -

GFP : *Green Fluorescent Protein*

- H -

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

- I -

Ig : Immunoglobuline

IPA : Isopropanol

- M -

MACS : *Magnetic Activated Cell Sorter*

- N -

NHS : N-Hydroxysuccinimide

- P -

PBS : *Phosphate Buffer Saline*

PDMS : Polydiméthylsiloxane

PEB : *Post Exposure Bake*

PFA : Paraformaldéhyde

PSGL-1 : *P-Selectin Glycoprotein Ligand 1*

PVP : Polyvinylpyrrolidone

- R -

RMPI : Milieu de culture cellulaire *Roswell Park Memorial Institute*

RPM : Rotations Par Minute

RSA : *Rat Serum Albumin*

- S -

SAM : *Self-Assembled Monolayer* ou Monocouche auto-assemblée

S-NHS : N-Hydroxysulfosuccinimide

SPR : *Surface Plasmon Resonance* ou Résonance de Plasmons de Surface

SPRi : Imagerie par Résonance de Plasmons de Surface

SSC : *Side Scatter*

- U -

UV : Ultraviolet

- W -

WAT : *White Adipose Tissue*

Abstract

Adipose tissue is a rich source of multipotent stem cells: Adipose Stem Cells (or ASCs). Due to their differentiation capabilities, ASCs became cells of considerable interest for regenerative medicine and are of high interest for type II diabetes diagnosis. Known to migrate and circulate in lymph, the hypothesis of their presence in blood is not excluded but no method exists to prove it. The aim of this study is to develop a lab-on-chip able to isolate ASCs from complex biological samples by using passive and label-free microfluidic sorting methods. These methods involve intrinsic properties of fluids and objects. Yet, ASCs do not have specific physical characteristic. We have demonstrated that their diameter is comprised between 10 and 25 μm : they cannot be distinguished from most of other blood cells. In addition, they do not present specific antigen on their membrane. In order to completely isolate ASCs from other cell types, we propose an original approach combining two complementary steps. The first step aims at pre-treating the sample by removing, *via* hydrodynamic filtration, all the cells with a diameter below 10 μm . With this device, red blood cells, which represent more than 99% of blood cells, platelets and some leukocytes, have to be removed. This study has demonstrated that the device is able to effectively pre-treat pure blood sample (either from human or from mouse) as it removes more than 99.9% of red blood cells. It has also been demonstrated that filtration does not lead to cell lysis, which is a promising result for cell viability and the reuse of cells after filtration. The obtained sample contains cells of interest and some remaining hematopoietic cells. The second step aims at refining ASCs isolation by separating them from remaining hematopoietic cells. The method used, called immunological exclusion by cell rolling, is based on antigen-antibody specific reaction. As ASCs do not have specific antigen, leukocytes antigens have been involved. The objective is so to deplete the sample of the remaining leukocytes. This study led to the elaboration of an optimised surface functionalization protocol. Moreover, promising results on cell rolling realised on a surface functionalized with anti-CD45 antibodies were obtained.

Key words: Adipose stem cells, ASCs, Microfluidics, Dry films, Cell sorting, Hydrodynamic filtration, Immunological exclusion

Résumé

Le tissu adipeux est une source riche en cellules souches multipotentes : les Cellules Souches Adipeuses (ASCs pour *Adipose Stem Cells*). Ces cellules, qui possèdent la capacité de se différencier en différents types cellulaires, ouvrent de nombreuses perspectives dans le domaine de la médecine régénératrice et dans des applications telles que le diagnostic du diabète de type 2. Connues pour migrer et circuler dans la lymphe, l'hypothèse de leur présence dans le sang n'est pas exclue mais aucune méthode n'existe afin de le prouver. L'objectif de ces travaux de thèse est alors de développer un laboratoire sur puce capable d'isoler les ASCs à partir d'échantillons biologiques complexes en mettant en application des méthodes microfluidiques de tri passives et sans marquage. Ce sont ainsi les propriétés intrinsèques des cellules qui sont exploitées. Or, les ASCs ne présentent aucune caractéristique physique spécifique. En effet, nous avons tout d'abord montré que leur diamètre est compris entre 10 et 25 μm , ce qui ne leur permet pas de se distinguer de la plupart des cellules sanguines. De même, ces cellules ne possèdent pas d'antigène spécifique sur leur membrane. Nous proposons alors un dispositif combinant deux étapes complémentaires afin d'isoler complètement les ASCs des autres types cellulaires. La première étape a pour objectif de prétraiter l'échantillon en retirant, par filtration hydrodynamique, toutes les cellules de diamètre inférieur à 10 μm . Ce dispositif doit ainsi permettre de retirer du milieu les globules rouges qui représentent plus de 99 % des cellules constituant le sang ainsi que les plaquettes et quelques globules blancs. Ces travaux de thèse ont démontré que le dispositif développé est capable de prétraiter efficacement un échantillon sanguin pur (humain ou murin) en éliminant plus de 99,9 % des globules rouges. De plus, il a été démontré que la filtration n'engendre pas de lyse cellulaire, ce qui est encourageant pour des questions de viabilité cellulaire et l'exploitation des cellules après filtration. L'échantillon alors obtenu contient les cellules d'intérêt ainsi que quelques cellules hématopoïétiques restantes. La deuxième étape a pour but de parfaire l'isolement des ASCs en les séparant des cellules hématopoïétiques restantes. Pour ce faire, la méthode employée, l'exclusion immunologique par *cell rolling*, se base sur la spécificité de la réaction antigène-anticorps. Les ASCs ne possédant pas d'antigène spécifique, ce sont les antigènes spécifiques des leucocytes qui ont été ciblés. L'objectif est ainsi de dépléter l'échantillon des leucocytes restants. Ces travaux ont mené à l'élaboration d'un protocole de fonctionnalisation de surface optimal. De plus, de premiers résultats encourageants sur le *cell rolling* sur une surface fonctionnalisée avec des anticorps anti-CD45 ont été obtenus.

Mots clés : Cellules souches adipeuses, ASCs, Microfluidique, Films secs, Tri cellulaire, Filtration hydrodynamique, Exclusion immunologique

Sommaire

Remerciements.....	i
Liste des abréviations	v
Abstract.....	vii
Résumé	ix
Introduction générale	1
Chapitre I.....	5
Isolement des cellules souches adipeuses : État de l'art et positionnement du problème...	5
I.1 Les cellules souches	7
I.1.1 Qu'appelle-t-on cellule souche ?	7
I.1.2 Origine des cellules souches	9
I.1.3 Intérêts et enjeux des cellules souches	10
I.2 Focalisation sur les cellules souches adipeuses (ASCs)	11
I.2.1 Localisation des ASCs	11
I.2.2 Intérêts et enjeux des ASCs.....	14
I.2.3 Les ASCs circulent-elles dans le sang ?	17
I.2.4 Méthodes actuelles de séparation	19
I.2.5 Résumé et objectifs liés aux cellules souches adipeuses	24
I.3 La microfluidique au service du tri cellulaire	25
I.3.1 Méthodes sans marquage.....	25
I.3.2 Méthodes immunologiques.....	32
I.3.3 Combinaison des méthodes.....	37
I.3.4 Résumé et objectifs liés au développement du dispositif de tri	38
I.4 Techniques de fabrication des laboratoires sur puce	38
I.4.1 Fabrication par photolithographie (lithographie optique)	39
I.4.2 Fabrication par lithographie dure	39
I.4.3 Fabrication par lithographie douce.....	40
I.4.4 Fabrication par laminage	41
I.4.5 Méthode par impression 3D	43
I.4.6 Résumé.....	44
I.5 Positionnement du problème et objectifs de thèse	44
I.5.1 Détermination du diamètre des ASCs.....	44

I.5.2	Bilan et objectifs de la thèse	47
II	Chapitre II.....	49
	Introduction au module de filtration hydrodynamique	49
II.1	Prétraitement de l'échantillon par filtration hydrodynamique	51
II.1.1	Théorie et principe.....	51
II.1.2	Dimensionner des puces microfluidiques.....	54
II.2	Microfabrication des dispositifs.....	56
II.2.1	Contraintes liées aux outils d'observation.....	56
II.2.2	Fabrication des dispositifs microfluidiques par laminages successifs de films secs de résine.....	58
II.2.3	Optimisation du procédé de fabrication : fermeture des structures fluidiques par un capot en verre.....	62
II.2.4	Procédé de fabrication final.....	65
II.3	Protocoles de préparation d'échantillons	69
II.3.1	Préparation des échantillons	69
II.3.2	Marquage cellulaire	72
II.4	Conclusion	74
III	Chapitre III.....	77
	Préconcentration de cellules souches adipeuses circulantes par filtration hydrodynamique	77
III.1	Développement d'un dispositif fonctionnel et vérification du principe de fonctionnement	79
III.1.1	Première version du dispositif	79
III.1.2	Caractérisation, optimisation et validation des dispositifs.....	81
III.2	Développement d'un dispositif fonctionnel	83
III.2.1	Optimisation du design par simulation.....	83
III.2.2	Caractéristiques du nouveau dispositif.....	85
III.2.3	Validation expérimentale : échantillons synthétiques	87
III.2.4	Validation expérimentale : échantillons biologiques	89
III.2.5	Bilan.....	101
III.3	Vérification de l'hypothèse de <i>margination</i> des globules blancs	102
III.3.1	Présentation rapide du phénomène de <i>margination</i>	102
III.3.2	Analyse de l'impact de la <i>margination</i> sur la filtration.....	103
III.3.3	Bilan.....	107

III.4	Vérification de l'hypothèse de saturation des canaux latéraux.....	107
III.4.1	Dimensionnement d'un dispositif à 100 canalisations latérales	107
III.4.2	Analyse qualitative de la filtration	110
III.4.3	Analyse quantitative de la filtration : détermination des taux de filtration.....	112
III.4.4	Vérification par analyse FACS des espèces cellulaires en présence après filtration	113
III.4.5	Sensibilité du dispositif	123
III.4.6	Bilan.....	123
III.5	Conclusion et perspectives	124
IV	Chapitre IV.....	127
Exclusion immunologique des cellules hématopoïétiques : Isolement complet des cellules souches adipeuses		127
IV.1	Exclusion immunologique des cellules hématopoïétiques par <i>cell rolling</i>	129
IV.1.1	Origine du <i>cell rolling</i>	129
IV.1.2	Choix des anticorps adaptés à l'exclusion des cellules hématopoïétiques	132
IV.2	Fabrication des dispositifs microfluidiques : particularité du second module.....	133
IV.3	Fonctionnalisation de surface	138
IV.3.1	Fonctionnalisation de surface : protocole générique.....	138
IV.3.2	Protocole de fonctionnalisation.....	142
IV.3.3	Bilan.....	146
IV.4	Optimisation du protocole de fonctionnalisation de surface par analyse d'interactions moléculaires <i>via</i> la résonance de plasmons de surface	146
IV.4.1	Optimisation des paramètres de greffage des anticorps anti-CD45	146
IV.4.2	Optimisation du protocole de fonctionnalisation de surface par analyse en fluorescence.....	163
IV.5	Ouverture vers le <i>cell rolling</i>.....	171
IV.5.1	<i>Cell rolling</i> en SPRI.....	171
IV.5.2	Bilan.....	174
IV.6	Conclusion et perspectives	175
Conclusion générale.....		177
Annexes.....		183

Introduction générale

L'émergence de la médecine régénératrice est apparue au cours du XX^{ème} siècle *via* les premières réparations tissulaires par thérapie cellulaire. Cette dernière est rendue possible par l'utilisation de cellules souches, cellules aux capacités d'autorenouvellement et de différenciation fabuleuses. A l'origine, les cellules souches ont été rencontrées dans la moelle osseuse, dans les muscles ou encore dans les vaisseaux. Bien que leur utilisation apparut, dès le début, prometteuse, les cellules souches se trouvent en faible quantité dans ces tissus et sont difficilement accessibles.

Ce n'est pas le cas des cellules souches adipeuses, autrement nommées ASCs (pour *Adipose Stem Cell*), qui ont été découvertes récemment dans le tissu adipeux. Ces cellules possèdent les mêmes avantages que n'importe quelle cellule souche (autorenouvellement, capacité de différenciation) sans pour autant avoir les mêmes inconvénients puisqu'elles se trouvent en grande quantité dans leur tissu d'origine et sont facilement accessibles. De plus, elles possèdent des propriétés extrêmement avantageuses qui en font les meilleures candidates pour les thérapies cellulaires.

L'intérêt porté aux ASCs ne se limite pas à la médecine régénératrice puisqu'il a été très récemment démontré que ces cellules possèdent la capacité de migrer hors de leur tissu d'origine. Elles semblent ainsi être impliquées dans des désordres métaboliques, comme par exemple le diabète de type II. L'étude de ces ASCs et en particulier de leurs mécanismes de migration pourrait permettre non seulement de progresser sur les traitements de régénération tissulaire mais également d'aider à la compréhension de divers désordres métaboliques. Or, les outils actuels et les méthodes usuelles d'isolement cellulaire ne sont pas adaptés et ne permettent pas de comprendre complètement ces mécanismes.

Cette étude naît ainsi du besoin de **développer un outil capable d'isoler spécifiquement les cellules souches adipeuses à partir d'échantillons biologiques complexes**. Cet outil devra par ailleurs être capable de traiter les échantillons sans affecter les propriétés biologiques des cellules d'intérêt.

Pour ce faire, nous nous sommes tournés vers les méthodes microfluidiques de tri cellulaire. Les dispositifs microfluidiques sont devenus des outils incontournables pour effectuer des diagnostics cliniques et thérapeutiques et ouvrent encore de nouvelles perspectives dans de nombreux domaines. Mettant en jeu les propriétés physiques, biologiques ou encore chimiques des cellules, ils constituent des méthodes alternatives prometteuses pour isoler différents types cellulaires.

Ces travaux de thèse ont ainsi consisté en l'élaboration d'une stratégie de tri cellulaire basée sur les propriétés des cellules d'intérêt et au développement de dispositifs microfluidiques adaptés. Cette étude a alors nécessité une approche pluridisciplinaire, associant les domaines de la biologie, de la chimie, de la physique et de l'ingénierie.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La réponse à la problématique de cette étude est divisée entre les quatre chapitres qui constituent ce manuscrit.

Le **Chapitre I** introduit tout d'abord de nombreuses notions associées aux cellules souches avant de se focaliser sur celles qui seront ciblées au cours de cette étude : les cellules souches adipeuses. Afin de déterminer une stratégie d'isolement des ASCs, un état de l'art des techniques d'isolement de cellules utilisées en microfluidique, en particulier des cellules rares, mettra en lumière les nombreuses méthodes disponibles. Seront alors présentées les méthodes actuellement employées pour fabriquer les laboratoires sur puce. Ce chapitre se terminera par la présentation d'une étape cruciale : la détermination d'une propriété intrinsèque des ASCs qui conduira à l'élaboration de notre stratégie de tri finale, adaptée à nos cellules d'intérêt.

Le **Chapitre II** présente le principe de la première étape de tri. Seront également présentés les procédés de fabrication adaptés à notre dispositif ainsi que les échantillons qui seront utilisés tout au long de cette étude.

Le **Chapitre III** présente pour sa part la démarche suivie pour dimensionner les puces microfluidiques ainsi que les résultats associés à ce premier module d'isolement des ASCs. Les dispositifs développés seront dans un premier temps caractérisés et optimisés *via* l'observation du comportement d'échantillons synthétiques idéaux. Une fois validés, ces dispositifs seront exploités pour traiter des échantillons biologiques complexes et pré-isoler les ASCs.

Le **Chapitre IV** présente enfin le principe de la deuxième et dernière méthode sélectionnée. Cette dernière a pour rôle de parfaire l'isolement des ASCs en traitant l'échantillon préalablement soumis à la filtration dans le premier module. Seront alors mis en avant les développements technologiques réalisés pour parvenir à l'obtention d'un « pré-dispositif ».

Chapitre I

Isolement des cellules souches adipeuses : État de l'art et positionnement du problème



Les cellules souches, du fait de leur capacité de différenciation en divers types cellulaires spécialisés (cellules musculaires, cellules cardiaques, etc.), possèdent un fort intérêt pour des applications notamment en médecine.

Très récemment, il a été démontré la présence de grandes quantités de cellules souches adultes dans le tissu adipeux. Ces dernières, nommées cellules souches adipeuses ou ASCs (*Adipose Stem Cells*), possèdent les caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses, à savoir une forte capacité clonogénique et le pouvoir de se différencier en différents types cellulaires à l'état clonal. Elles possèdent de plus de nombreux avantages puisqu'elles résident dans un tissu facilement accessible, elles sont disponibles en grande quantité et leur prélèvement est sans inconvénient majeur pour le donneur. L'intérêt porté aux ASCs s'explique d'une part par leur grand potentiel en médecine régénératrice mais pas seulement. En effet, il semble que ces cellules aient la capacité de migrer hors du tissu adipeux et qu'elles soient fortement liées à des mécanismes biologiques complexes encore mal compris.

Actuellement, les outils disponibles ne permettent, que très partiellement, de comprendre ces mécanismes car ils ne sont pas assez performants pour trier et isoler les populations cellulaires les plus faiblement représentées dans les milieux biologiques. L'utilisation de dispositifs microfluidiques prend alors tout son sens puisqu'ils ouvrent la voie aux études de la cellule unique.

Après une présentation générale des cellules souches, ce chapitre se focalisera sur les cellules souches d'intérêt : les cellules souches adipeuses. S'ensuivront un état de l'art des techniques disponibles pour parvenir à l'isolement cellulaire et un état de l'art des techniques actuellement employées pour fabriquer les puces microfluidiques. Ce chapitre présentera alors l'étude de l'une des propriétés intrinsèques des ASCs (leur diamètre), qui sera déterminante dans le choix d'une stratégie d'isolement des cellules d'intérêt. Pour finir, ce chapitre présentera les objectifs de cette étude.

I.1 Les cellules souches

I.1.1 Qu'appelle-t-on cellule souche ?

Les cellules souches sont des cellules non spécialisées qui n'ont pas de facultés physiologiques particulières et n'ont pas de tâche spécifique comme par exemple les cellules épithéliales qui protègent les organes ou encore les globules rouges qui transportent l'oxygène. Elles disposent cependant de la faculté de renouveler les cellules vieillissantes ou présentant des lésions en se différenciant en cellules spécialisées. Ces cellules sont indispensables à l'autorenouvellement de l'organisme car elles sont les seules à pouvoir se maintenir indéfiniment dans l'organisme par prolifération ou division asymétrique et à produire des cellules spécialisées.



CHAPITRE I

Les cellules souches se renouvellent par diverses divisions et multiplications et donnent naissance à des cellules filles. Certaines cellules filles restent à l'état de cellule souche tandis que les autres commencent le processus de différenciation. Les cellules entrant dans ce processus peuvent soit être classées selon leur capacité de différenciation soit être classées selon le moment de l'apparition de la cellule au cours du développement de l'organisme.

Les premières cellules souches qui apparaissent sont **les cellules souches totipotentes**. Ces cellules peuvent se différencier en tout type de cellule spécialisée et ainsi former un organisme vivant entier. Elles se rencontrent depuis le stade d'ovule fécondé jusqu'au stade de morula, soit du premier au quatrième jour de l'embryogénèse.

Viennent ensuite **les cellules souches pluripotentes**. Filles des cellules totipotentes, elles se rencontrent au stade embryonnaire blastocyste. Ces cellules ont déjà subi une première différenciation et peuvent générer les cellules des trois lignées germinales : endodermique, mésodermique et ectodermique. Ces cellules ne génèrent cependant pas les cellules du trophoctoderme qui forment les tissus extra-embryonnaires à l'origine du placenta. A elles seules, elles peuvent ainsi conduire à la formation d'un être entier sans toutefois lui fournir un environnement viable.

Les cellules souches multipotentes ont quant à elles la capacité de se différencier en différents types de cellules mais sont dites déterminées. Leur différenciation dépend de leur lignée : elles se différencient soit en cellules endodermiques, soit en cellules mésodermiques, soit en cellules ectodermiques.

Il existe enfin **les cellules souches unipotentes**. Ces cellules ne peuvent se différencier qu'en un seul type cellulaire mais conservent leur capacité d'autorenouvellement.

Le classement des cellules souches au cours du développement d'un organisme est détaillé en Figure I- 1.

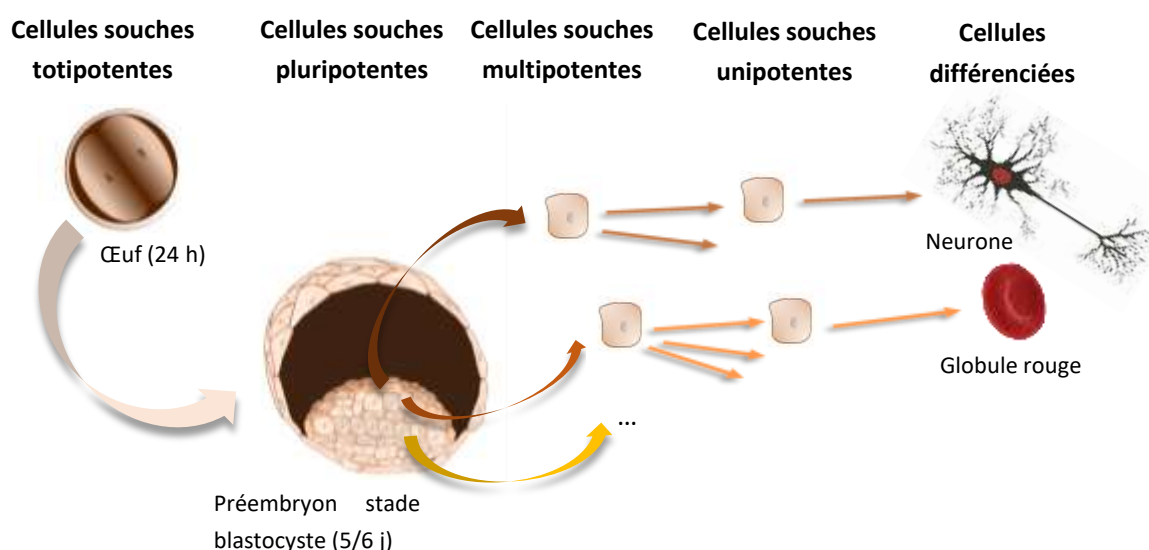


Figure I- 1 : Différents types de cellules souches qui existent au cours du développement de l'organisme



I.1.2 Origine des cellules souches

Les cellules souches peuvent être distinguées *via* leur capacité de différenciation mais peuvent également l'être *via* leur origine (embryonnaire, fœtale, adulte, amniotique ou induite).

Les cellules souches embryonnaires ou ES (*Embryonic Stem*) ont été mises en évidence en 1981 chez la souris, grâce aux travaux de Martin Evans et Matthew Kaufman¹, ainsi que ceux de Gail Martin². Chez l'Homme, ces cellules ont été mises en évidence par James Alexander Thomson, Joseph Itskovitz-Eldor et Benjamin Reubinoff en 1998³.

Les cellules souches embryonnaires se rencontrent dès le stade de morula précoce et jusqu'au stade de blastocyste. Ce sont des cellules pluripotentes : elles sont à l'origine des trois feuillets embryonnaires et peuvent se transformer en n'importe quel type cellulaire. Cette capacité de différenciation en tout type de cellules intéresse les scientifiques qui souhaitent parvenir à reconstituer tissus et organes défaillants. Le prélèvement de ces cellules nécessite néanmoins la destruction de l'embryon, ce qui soulève de nombreux problèmes éthiques.

Les cellules souches fœtales apparaissent à un stade plus avancé (fœtus de 5 à 9 semaines). Ce sont des cellules multipotentes et comme toute cellule multipotente, elles sont déjà engagées dans un programme de différenciation. Le prélèvement de cellules souches sur des fœtus issus d'avortements soulève lui aussi des problèmes éthiques et légaux.

Les cellules souches adultes ou somatiques se retrouvent chez l'individu après la naissance. Elles se trouvent dans des endroits restreints, des niches, et sont régulées pour ne produire que les cellules nécessaires au maintien d'un organisme fonctionnel en permettant l'homéostasie et la réparation des tissus tout en maintenant en même temps un réservoir de cellules souches.

Les cellules souches adultes se rencontrent notamment dans les tissus et organes tels que la peau, l'intestin, la moelle osseuse, les dents et le tissu adipeux. Elles sont dénommées selon leur tissu d'origine : cellules souches mésenchymateuses, cellules souches hématopoïétiques, cellules souches endothéliales, cellules souches du tissu adipeux, etc. Leur capacité de différenciation est moindre que celui des cellules souches embryonnaires ou fœtales : elles sont multipotentes. Leur rôle est plus limité mais essentiel : régénérer et réparer.

Les cellules souches pluripotentes induites (IPs) ont les mêmes propriétés de différenciation que les cellules souches embryonnaires mais elles sont le fruit d'une reprogrammation génétique de cellules adultes différenciées. Le Professeur Yamanaka, prix Nobel de médecine (2012), et son équipe ont montré, d'abord sur cellules différenciées adultes de souris (2006)⁴ puis sur cellules adultes différenciées humaines (2007)⁵, qu'il est possible d'obtenir des cellules retrouvant les propriétés des cellules souches embryonnaires (pluripotence et



autorenouvellement). La pluripotence induite consiste en la reprogrammation de cellules différenciées en cellules IPs en réactivant les gènes associés au stade embryonnaire (stade de pluripotence). Les gènes associés à la spécialisation sont réprimés ; la cellule se « dédifférencie ». Depuis 2007, des centaines de lignées de cellules IPs ont été obtenues à partir de presque tous les types cellulaires adultes capables de se multiplier.

I.1.3 Intérêts et enjeux des cellules souches

L'engouement pour les cellules souches provient de leurs capacités de différenciation et d'autorenouvellement (détaillé en **I.1.1**). Ces cellules sont aujourd'hui utilisées dans de nombreuses thérapies cellulaires, les plus courantes étant la greffe de moelle osseuse (exemple historique de thérapie cellulaire) et la greffe de peau. D'autres thérapies existent mais en sont encore au stade expérimental.

De manière générale, leur potentiel et l'espoir qu'elles génèrent sont immenses mais de nombreuses questions se posent toutefois. L'une d'entre elles concerne les propriétés des cellules une fois injectées dans le corps du receveur. Existe-t-il un ou plusieurs risque(s) lié(s) à l'injection ? Il en existe effectivement : les cellules souches embryonnaires, par exemple, possèdent des propriétés tumorigènes et induisent la formation, au niveau de la zone d'injection, de tumeurs particulières appelées tératomes. Ces tumeurs peuvent être bénignes (dans ce cas, toutes les cellules souches sont différenciées) ou malignes (dans ce cas, des cellules souches restent indifférenciées et prolifèrent de manière incontrôlée). Il existe également la question de la compatibilité immunologique entre les cellules greffées et le receveur. Différents types de cellules (ou lignées cellulaires) sont utilisés en thérapie cellulaire. Les lignées cellulaires peuvent être xénogéniques, c'est-à-dire provenant d'une espèce différente. Elles peuvent également être allogéniques et provenir d'un organisme différent mais de la même espèce. Elles peuvent encore être issues de lignées immortalisées ou enfin être autologues et provenir du même organisme. Les cellules principalement utilisées sont les cellules autologues et allogéniques.

Le rejet du greffon est une cause d'échec importante lors des thérapies cellulaires. Ce rejet peut être diminué par le choix d'un donneur présentant la meilleure compatibilité possible accompagné d'un traitement antirejet. Reste enfin à vérifier la fonction assurée par les cellules différenciées. Ces dernières doivent assurer les fonctions de leurs homologues naturels.

La recherche sur les cellules souches, et plus particulièrement les cellules souches embryonnaires, soulève de nombreuses questions d'éthique et présente des enjeux aussi bien sociaux que légaux. Tous les partisans, aussi bien pour que contre l'utilisation des cellules souches embryonnaires, s'accordent sur le fait que les traitements avec de telles cellules ont pour finalité de protéger la vie humaine. Les opinions divergent au moment de définir le statut



d'un embryon : à quel stade est-il possible d'affirmer qu'un embryon est un être vivant ? Ce statut est débattu dans de nombreux pays et les législations diffèrent d'un pays à l'autre.

Les réticences éthiques sont beaucoup moins présentes dans le cas des cellules souches adultes. Les techniques de récolte et les lieux d'obtention de ces cellules souches ne constituent pas une contrainte. Les procédures de prélèvement, de test et d'application sont codifiées et l'utilisation des cellules souches adultes relèvent légalement du don d'un adulte informé et consentant. Reste néanmoins, comme dans beaucoup d'autres domaines de recherche, la question de l'application industrielle de ces recherches.

I.2 Focalisation sur les cellules souches adipeuses (ASCs)

Les travaux présentés dans ce manuscrit se focalisent sur les cellules souches adipeuses qui ont été présentées dès 2001 par Zuk *et al.*⁶. Depuis, de nombreuses études se sont attachées à déterminer les mécanismes biologiques associés à ces cellules. Les méthodes d'isolement existant actuellement ne permettent pas de comprendre complètement les mécanismes de déplacement de ces cellules et constituent un frein dans la compréhension des mécanismes biologiques dans leur ensemble.

I.2.1 Localisation des ASCs

Le tissu adipeux a jusqu'à très récemment été considéré uniquement comme une zone de stockage de lipides. Il s'avère que le tissu adipeux est un organe complexe qui joue non seulement un rôle dans le stockage et la mobilisation de lipides mais qui joue également le rôle d'organe endocrinien en produisant de nombreux facteurs bioactifs (comme des adipokines) qui modulent certains processus métaboliques⁷.

Il existe deux types de tissus adipeux : le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun, respectivement *White Adipose Tissue* (WAT) et *Brown Adipose Tissue* (BAT). Les deux tissus ont des fonctions bien distinctes.

Le tissu adipeux brun, constitué d'adipocytes bien particuliers, est reconnaissable à sa couleur brune. Cette dernière est conférée par la présence, dans les adipocytes, d'un nombre important de mitochondries contenant des cytochromes qui permettent d'assurer une fonction oxydative. Les adipocytes bruns contiennent également de nombreux grains de glycogène, glucide qui permet le stockage de l'énergie chimique et la libération rapide de glucose. Ils contiennent enfin plusieurs gouttelettes lipidiques (les adipocytes bruns peuvent être qualifiés de cellules multiloculaires) dans lesquelles sont stockés les triglycérides (acides gras), ce qui est schématisé en Figure I- 2. Le rôle des adipocytes bruns est la conversion de l'énergie libérée par l'oxydation des acides gras en chaleur. Le positionnement de ce tissu est



en cohérence avec sa fonction : que ce soit chez l'homme ou chez les animaux, il est localisé à proximité des gros vaisseaux pour une diffusion optimale de la chaleur. Les connaissances sur ce tissu restent toutefois limitées car il était considéré, jusqu'à de récentes études⁸⁻¹⁰, comme étant absent chez l'Homme (disparition supposée après la période néonatale).

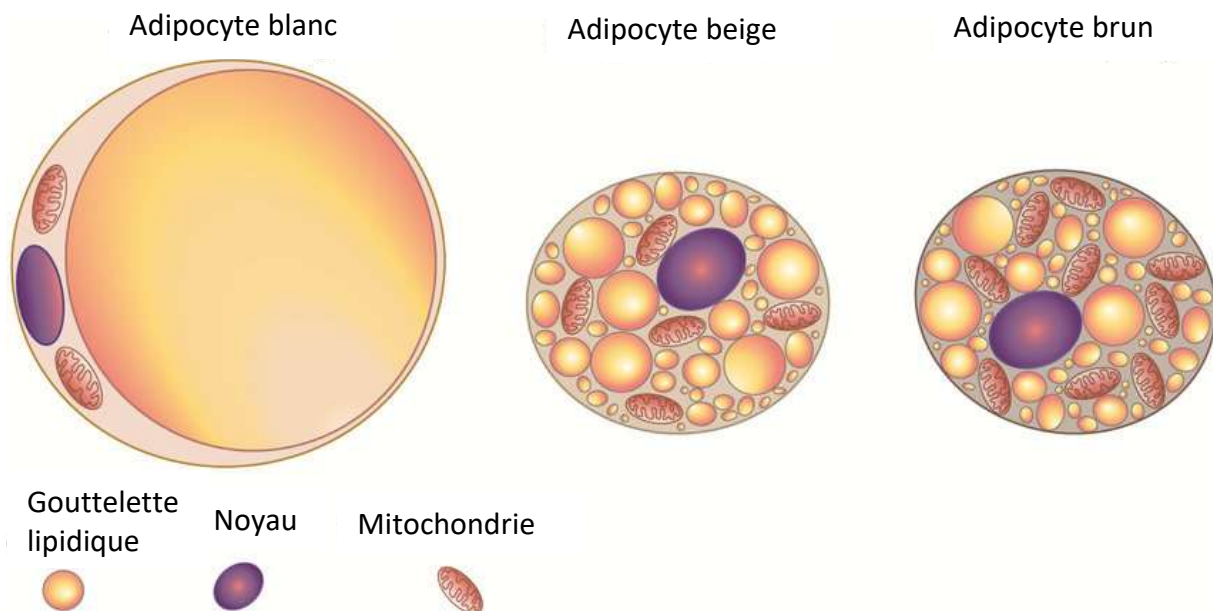


Figure I- 2 : Représentation des différents types d'adipocytes. Les adipocytes blancs (à gauche) présentent peu de mitochondries et sont constitués principalement de lipides, les adipocytes beiges (au milieu) tout comme les adipocytes bruns (à droite) présentent plusieurs petites gouttelettes lipidiques ainsi que de nombreuses mitochondries¹¹

Le tissu adipeux blanc est pour sa part mieux connu que le tissu adipeux brun et est fortement représenté dans le corps humain. A lui seul, il représente entre 15 et 20 % du poids d'un homme mince et entre 20 et 25 % du poids d'une femme mince^{8,12}. D'un point de vue qualitatif, le tissu adipeux blanc remplit deux fonctions principales. Dans un premier temps, il stocke des lipides, gérant ainsi les réserves énergétiques de l'organisme selon les besoins et les disponibilités. Dans un second temps, il synthétise et sécrète des hormones : adipokines et cytokines, faisant de lui un organe endocrinien¹³. D'un point de vue tissulaire, plusieurs dépôts (tissu adipeux sous-cutané, tissu adipeux viscéral, tissu adipeux de soutien (orbites, paumes des mains, plantes des pieds et autour des articulations) et tissu adipeux de la moelle osseuse), dont les fonctions et proportions diffèrent, coexistent. Le tissu adipeux sous-cutané a par exemple pour fonction d'isoler thermiquement et d'amortir les chocs du fait du stockage massif des graisses du corps (environ 80 % des graisses). Il représente un réservoir sain de lipides, contrairement au tissu adipeux viscéral où l'accumulation de lipides est fortement associée aux anomalies métaboliques et cardiovasculaires. Les caractéristiques lipolytiques, sécrétoires et de synthèse des triglycérides varient pour chaque dépôt, de même que les



caractéristiques des cellules : taille, nombre et expression des gènes. Les facteurs physiologiques comme l'âge, le sexe, la corpulence, etc. d'un individu sont également des facteurs jouant sur les propriétés des cellules¹⁴. Les tissus présentent ainsi de nombreuses différences mais, de manière générale, leur composition reste la même.

Adipocytes et cellules constituant la Fraction du Stroma Vasculaire (*Stromal Vascular Fraction* ou SVF) se retrouvent dans tous les tissus adipeux. Contrairement aux adipocytes bruns, les adipocytes blancs ne possèdent qu'une gouttelette de lipides et possèdent très peu de mitochondries. Une particularité des adipocytes blancs à souligner est leur plasticité : certains peuvent se différencier en adipocytes beiges. Ces derniers ont les mêmes caractéristiques que les adipocytes bruns mais ne sont pas issus des mêmes mécanismes. Plusieurs études ont rapporté la présence d'adipocytes « bruns » au sein même de certains dépôts de tissu adipeux blanc^{15,16}. La Fraction du Stroma Vasculaire est quant à elle constituée de plusieurs types cellulaires : fibroblastes, cellules immunitaires, cellules endothéliales, pré-adipocytes et cellules progénitrices/cellules souches.

Le tissu adipeux est ainsi un organe complexe, source de cellules au fort potentiel : les cellules souches adipeuses. Originaires du tissu adipeux, ces cellules semblent ne pas s'y cantonner et migrent vers le système lymphatique¹⁷.

Principalement constitué de vaisseaux lymphatiques et d'organes lymphoïdes, il contribue, entre autres, à la circulation de nutriments (graisses, fer, glucose, électrolytes, enzymes, hormones) et s'adapte pour apporter une réponse immunitaire efficace. Toutes ces fonctions sont assurées grâce à la circulation d'un liquide laiteux, la lymphe, qui véhicule de nombreuses protéines ainsi que des globules blancs.

Les globules blancs ne semblent pas être les seuls capables de se déplacer dans le système lymphatique. Une étude réalisée par Ortega *et al.*¹⁷ a montré que les ASCs pouvaient effectivement circuler dans le système lymphatique. Que ce soit *ex vivo* ou *in vivo*, il semble que les ASCs soient attirées et migrent vers les ganglions lymphatiques activés, zones engagées dans la défense immunitaire. Les cellules souches natives migrent ainsi du tissu adipeux blanc vers le système lymphatique et sont capables d'envahir les nœuds lymphatiques.

La perspective de la migration des cellules souches adipeuses vers d'autres tissus que le tissu adipeux les rend extrêmement attrayantes. En effet, ces cellules possédaient déjà un attrait pour une application en médecine régénératrice. Désormais, il semble qu'elles aient plusieurs facettes et puissent constituer un biomarqueur associé à des mécanismes biologiques non encore expliqués.



1.2.2 Intérêts et enjeux des ASCs

Comme évoqué précédemment, l'usage des ASCs ouvre de nombreuses perspectives dans le domaine de la médecine régénératrice mais pas seulement. De récentes études ont montré leur capacité de migration hors du tissu adipeux au cours de mécanismes biologiques comme celui lié au diabète de type 2. Se pose alors la question de savoir si, en plus d'être d'excellentes candidates pour la régénération tissulaire, ces cellules pourraient constituer un biomarqueur.

1.2.2.1 Médecine régénératrice

La réparation du corps humain est une problématique existant depuis des centaines d'années. Avec les greffes d'organes, cette idée de réparation du corps humain ne semble pas si éloignée mais n'est pas totalement atteinte. Le rejet du greffon (possible malgré les avancées en immunosuppresseurs) et la limite du nombre d'organes disponibles rendent cette méthode peu attrayante. Pour pallier ces problèmes, plusieurs solutions existent comme l'utilisation de xénogreffes (greffon provenant d'une autre espèce). La xénogreffe permet de pallier le problème du nombre d'organes disponibles mais engendre, en contrepartie, de nouveaux inconvénients, liés à des problèmes immunologiques (rejets très nombreux) qui rendent cette solution bien moins attrayante. L'utilisation de cellules souches embryonnaires permettrait quant à elle d'éviter les problèmes de rejet du greffon. Ces cellules souches sont vectrices de beaucoup d'espoirs mais, comme évoqué précédemment, les risques d'apparition de tératomes ajoutés aux débats autour des questions d'éthique n'ont encore mené à aucun accord quant au statut de l'embryon ou bien sur l'usage qui peut en être fait. L'idéal semble être de reconstruire un tissu à partir des cellules d'un même individu (ce qui n'implique ni rejet, ni utilisation de cellules souches embryonnaires) et de recourir ainsi à une thérapie cellulaire.

La médecine régénératrice par thérapie cellulaire commence en 1963 lorsque McCulloch et Till¹⁸ démontrent qu'un tissu endommagé peut être réparé grâce à l'utilisation de cellules souches issues de la moelle osseuse (BMMSCs pour *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*). Cette découverte a mené à de nombreuses études et la transplantation de cellules souches hématopoïétiques s'est imposée comme méthode de référence pour le traitement de patients atteints de leucémie ou du cancer du sang. Par la suite, de nouvelles cellules souches issues de divers tissus ont été rencontrées et ont été utilisées dans différentes applications cliniques : traitement des brûlures, greffe osseuse ou encore réparation de la cornée. Ces cellules possèdent de nombreux atouts : production de facteurs de croissance qui permettent de favoriser la viabilité et la prolifération des cellules ou encore l'angiogenèse, régulation de l'apoptose, activité anti-inflammatoire, etc.



Désormais, de toutes les Cellules Souches Mésenchymateuses, CSMs, les ASCs semblent être les meilleures candidates pour les thérapies cellulaires. Elles se trouvent en abondance dans le tissu adipeux : par exemple, pour la même quantité de cellules prélevées dans la moelle osseuse et dans le tissu adipeux, le nombre de cellules souches prélevées dans le tissu adipeux est 500 fois supérieur à celui du nombre de cellules souches prélevées dans la moelle osseuse¹⁹. De plus, du fait de leur localisation, le prélèvement des ASCs engendre peu d'inconfort et de dommages tissulaires chez le patient. Ces cellules semblent également vieillir moins vite que les cellules souches de la moelle osseuse¹⁹⁻²¹. Certaines études tendent aussi à montrer que l'âge du donneur n'influence pas les propriétés des ASCs contrairement aux BMMSCs²⁰. Les ASCs présentent par ailleurs d'importants avantages puisqu'elles sont pro-angiogéniques^a, anti-apoptotiques²², anti-inflammatoires^{23,24}, immunomodulatrices²⁵ et empêchent la formation de fibroses²⁴. Les ASCs sont en plus de cela capables de se différencier en types cellulaires des différentes lignées germinales (se référer partie I.1.1) et peuvent ainsi devenir des cellules adipeuses, du cartilage, osseuses (lignée mésodermique). De très nombreux essais cliniques in vitro et in vivo, impliquant les ASCs, ont enfin été réalisés sur des animaux et/ou des humains. Ces essais portent entre autres sur la régénération des os, la reconstruction mammaire, la régénération cardiovasculaire et du myocarde et montrent des résultats prometteurs bien qu'en étant, pour la plupart, encore au stade expérimental.

I.2.2.2 Vers la découverte d'un biomarqueur ?

Bien que très éloigné du contexte de la médecine régénératrice, le contexte du désordre métabolique et en particulier du diabète implique de manière inattendue les cellules souches adipeuses.

Le diabète est une maladie chronique caractérisée par un taux important de sucre dans le sang (hyperglycémie). D'ordinaire, le sucre, grâce à l'insuline produite par le pancréas, est déplacé depuis la circulation sanguine vers les muscles, le tissu adipeux, etc. Dans le cas de patients atteints de diabète, le sucre reste dans la circulation sanguine, ce qui peut être dû au fait que le pancréas ne produit pas assez d'insuline ou bien que les cellules ne répondent pas correctement à l'insuline ou bien les deux. Plus particulièrement, dans le cas du diabète de type I, qui touche environ 6 % des diabétiques, le corps produit peu voire pas du tout d'insuline. Dans le cas du diabète de type II (DT2), qui touche 92 % des diabétiques, les patients sont insulino-résistants : le corps ne réagit plus correctement à l'insuline perturbant alors le fonctionnement du pancréas qui ne produit plus assez d'insuline.

Cette maladie est extrêmement grave car elle cause dysfonctionnements et défaillances d'organes. Le diabète multiplie par 2 ou 3 le risque chez l'adulte de développer des accidents

^a **Angiogenèse** : Processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants



cardiaques ou vasculaires cérébraux²⁶, est associé à la neuropathie qui peut conduire à des amputations, peut conduire à la cécité, etc. Parmi les organes impactés, le foie est celui qui entraîne le plus de complications : les risques de cirrhoses, de fibroses²⁷ ou de cancers augmentent fortement chez les patients atteints du DT2. Cette maladie est d'autant plus grave qu'elle est en pleine progression, ce qui est confirmé par les données rassemblées par l'OMS. En effet, ces dernières indiquent que le diabète est en pleine progression et qu'il touchera près de 511 millions de personnes dans le monde d'ici 2030 alors qu'il en touchait 422 millions en 2014 et qu'il n'en touchait que 108 millions en 1980. L'OMS prévoit d'ailleurs que cette maladie devienne la 7^{ème} cause de décès d'ici 2030 dans le monde. Il apparaît alors indispensable de comprendre plus précisément les mécanismes associés au diabète pour prévenir, effectuer des diagnostics précoces de cette maladie et enrayer un tel phénomène.

De nombreux travaux ont porté sur la compréhension des mécanismes associés au diabète et ont montré que la présence de lipides ectopiques dans de nombreux tissus comme le foie, le poumon ou encore les muscles squelettiques a un impact néfaste sur le métabolisme²⁸⁻³¹. Le dépôt lipidique ectopique est ainsi désormais associé à des désordres métaboliques tels que le diabète de type 2²⁹.

C'est dans ce contexte que s'est positionnée l'étude réalisée par Girousse *et al.*³². Cette étude prouve que, dans le cas de souris soumises à un régime alimentaire riche en graisses, le tissu adipeux sous-cutané (ScAT) est capable de libérer des progéniteurs adipeux, autrement dit, les cellules souches adipeuses, qui migrent vers le muscle pour former des adipocytes ectopiques. Pour prouver cela, deux types d'expériences ont été menées en parallèle. Dans un premier temps, les chercheurs ont activé la migration des progéniteurs adipeux depuis le ScAT en ciblant pharmacologiquement le système qui maintient ancrées les cellules dans le tissu adipeux. La libération des progéniteurs a conduit à la formation d'adipocytes ectopiques dans le tissu musculaire squelettique. En parallèle, les chercheurs ont empêché la migration des progéniteurs adipeux depuis le ScAT en utilisant un traitement antidiabétique qui empêche les progéniteurs de se détacher du tissu adipeux et qui limite leurs capacités migratoires (principe schématisé en Figure I- 3). Cette étude montre ainsi qu'il existe une migration des progéniteurs des adipocytes vers les muscles squelettiques. Bien que les mécanismes associés à cette migration soient encore inconnus, cette étude ouvre la perspective de considérer les progéniteurs des adipocytes comme des biomarqueurs des maladies métaboliques dont le DT2.

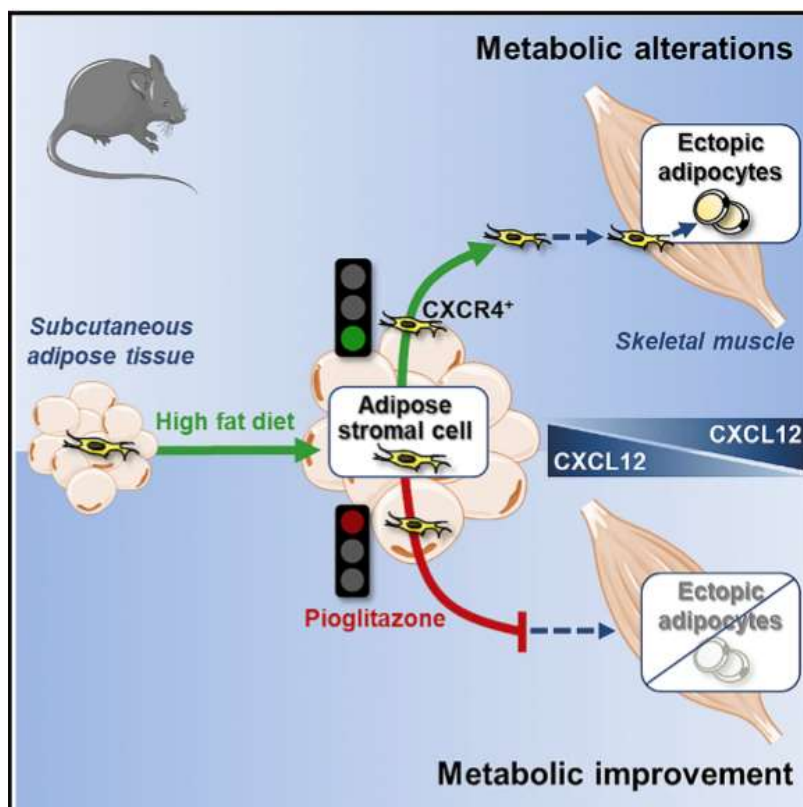


Figure I- 3 : Schématisation de l'expérience menée par Grousse *et al.* pour prouver la migration de progéniteurs adipeux depuis le ScAT pour former un dépôt lipidique ectopique dans le tissu musculaire squelettique chez des souris soumises à un régime alimentaire riche³²

De nombreuses questions restent ainsi en suspens : les ASCs circulent-elles dans la lymphe seulement ? Circulent-elles dans le sang ? Par quels mécanismes ?

Quels que soient ces mécanismes, la preuve de la migration des ASCs est un élément clé pour la suite de l'étude puisqu'elle ouvre la perspective de la circulation des cellules souches dans la circulation sanguine.

I.2.3 Les ASCs circulent-elles dans le sang ?

Comme évoqué précédemment, les mécanismes de migration des ASCs ne sont pas connus et leur circulation dans le sang est remise en question. En effet, diverses études affirment que les cellules souches adipeuses sont présentes dans le sang périphérique^{b 33-38} tandis que d'autres le réfutent, remettant ainsi en doute leur présence dans le sang périphérique³⁸⁻⁴¹. D'autres études font quant à elles état d'une circulation des ASCs en très faible proportion dans des conditions particulières : cancer, blessure, hypoxie^{42,43}.

^b **Sang périphérique** : Sang situé hors des organes qui synthétisent le sang, soit hors de la moelle osseuse.



Dans le cas où cette hypothèse s'avèrerait exacte, signifiant que les ASCs circulent bien dans le sang, elles se retrouveraient dans un milieu totalement différent de leur milieu d'origine (le tissu adipeux). Elles se mélangeraient alors aux nombreux éléments composant le sang. Ce dernier est composé à 55 % de plasma et 45 % de cellules dont 44 % de globules rouges et moins de 1 % de plaquettes et globules blancs ; tous les éléments figurés du sang sont rassemblés dans le Tableau I- 1.

CELLULE	DIMENSIONS	QUANTITE (CELLULES PAR ML DE SANG)	CARACTERISTIQUES	FONCTION
GLOBULES ROUGES (ERYTHROCYTES OU HEMATIES)	 Epaisseur : 2 μm Diamètre : 7 μm	4 à 6.10^9	- Anucléés - Biconcaves - Couleur rouge (présence d'hémoglobine)	Transporteur de gaz (O_2 et CO_2)
GLOBULES BLANCS (LEUCOCYTES)		$< 1.10^7$		
GRANULOCYTES	 8 à 14 μm	50 à 75 %	Polynucléaires	Défense immunitaire
LYMPHOCYTES	 7 à 13 μm	25 à 40 %	Noyau unique sphérique	Défense immunitaire
MONOCYTES	 15 à 25 μm	2 à 8 %	Noyau unique non sphérique	Transformation en macrophage : défense immunitaire
PLAQUETTES (THROMBOCYTES)	 2 à 4 μm	Jusqu'à 4.10^8	Anucléés	Coagulation

Tableau I- 1 : Eléments figurés du sang et caractéristiques des cellules humaines

En clinique comme dans les laboratoires de recherche, différentes méthodes sont actuellement employées pour isoler et caractériser ces cellules. Les paragraphes suivants font état de ces diverses méthodes.



I.2.4 Méthodes actuelles de séparation

Actuellement, différentes méthodes d'isolement et de caractérisation des cellules souches adipeuses existent. Ces démarches n'ont pas vocation à démontrer la présence des ASCs dans le sang et sont utilisées afin d'extraire les cellules du tissu adipeux dans le but de les réutiliser lors d'une opération chirurgicale ou tout simplement de les étudier. Cette partie présente ces méthodes.

I.2.4.1 Critère de séparation

Il n'est à ce jour pas encore évident de distinguer, à partir d'un échantillon biologique complexe, les différents types cellulaires selon leurs propriétés morphologiques et/ou fonctionnelles. Cependant, les cellules ont la propriété d'exprimer à leur surface un grand nombre de molécules pouvant être utilisées comme marqueurs pour leur identification. Dans ce cas, la méthode est appelée « identification immunophénotypique ».

Rappelons que la membrane d'une cellule est constituée d'une double couche phospholipidique dans laquelle s'insèrent, de manière asymétrique et inhomogène, des protéines membranaires et autres structures, comme présenté en Figure I- 4. Les protéines membranaires ont des rôles variés : fonctions structurales, activités enzymatiques, moteurs moléculaires, etc. Elles peuvent également avoir des fonctions spécifiques comme les glycoprotéines qui jouent un rôle dans la reconnaissance intercellulaire. Une certaine catégorie de glycoprotéines, les clusters de différenciation, sera plus particulièrement présentée dans cette partie.

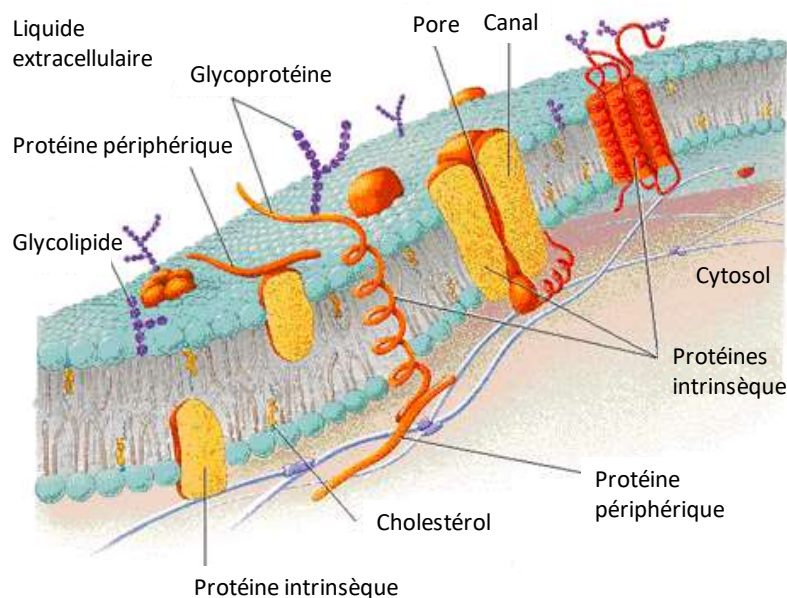


Figure I- 4 : Illustration de la structure de la membrane cellulaire⁴⁴



De l'anglais *cluster of differentiation* (CD), les clusters ou classes de différenciation ont été introduits lors de la première conférence internationale, en 1982 à Paris, sur les antigènes pour la différenciation des leucocytes humains (*Human Leukocyte Differentiation Antigens*)⁴⁵. Ce système de différenciation avait, à ce moment, pour but de classer les différents anticorps monoclonaux destinés contre les épitopes^c des leucocytes. Depuis, les CD sont utilisés pour tous les types cellulaires.

Les populations de cellules sont désignées par la combinaison d'un CD et d'un symbole « + » ou « - » indiquant si les cellules possèdent ou non l'épitope visé. Par exemple, « CD45+, CD31- » : la cellule exprime le CD45 mais pas le CD31.

I.2.4.2 Isolement

Alors que la méthode de prélèvement du tissu adipeux met d'accord tous les scientifiques, le protocole d'isolement, pour sa part, divise. A ce jour, il n'existe pas de protocole standard pour isoler les ASCs. Toutefois, la méthode décrite par Zuk *et al.*⁶, basée sur la digestion enzymatique, est la plus utilisée. Le protocole développé implique le rinçage du tissu adipeux fraîchement aspiré (par liposuccion) dans du PBS (*Phosphate Buffer Saline*) stérile, suivi d'une digestion enzymatique (avec de la collagénase) et d'une élimination des globules rouges (lyse cellulaire). C'est sur cette méthode qu'est basé le protocole d'isolement des ASCs utilisé au STROMA^{lab}^{17,32} et dont les étapes sont schématisées en Figure I- 5. Bien qu'efficace, cette méthode est complexe, coûteuse, chronophage et présente plusieurs inconvénients. En effet, elle nécessite des produits qui peuvent altérer la viabilité des cellules (notamment la collagénase), qui peuvent impliquer des inflammations (réponse du complément – détail **p32** – par action de la collagénase) et qui nécessite également une greffe xénogénique (les produits utilisés proviennent d'animaux). La digestion enzymatique semble ainsi être plus adaptée à des essais en laboratoire qu'à des essais cliniques bien que des essais cliniques aient été effectués en suivant ce protocole⁴⁶.

Des alternatives à la digestion enzymatique, plus adaptées aux applications cliniques et n'impliquant pas l'utilisation de la collagénase, existent. Ces alternatives, basées sur des propriétés mécaniques, sont la décantation (sédimentation du fait de la gravité), la centrifugation et la filtration⁴⁷.

Quelle que soit la méthode employée, les temps d'isolement sont relativement longs. Raposio *et al.*⁴⁸ font état d'une méthode d'isolement considérée rapide et testée en clinique, lors d'une reconstruction de tissu humain. L'isolement d'ASCs s'est fait à partir de 100 ml de

^c **Épitope** = Aussi appelé déterminant antigénique, l'épitope correspond à la partie du gène reconnue par le système immunitaire.



tissu adipeux, obtenu à partir de lipoaspiration, en 80 minutes minimum (maximum en 2 h) pour une durée totale de l'opération de 2 h (dans le cas où aucun problème ne survient durant les différentes étapes de l'opération).

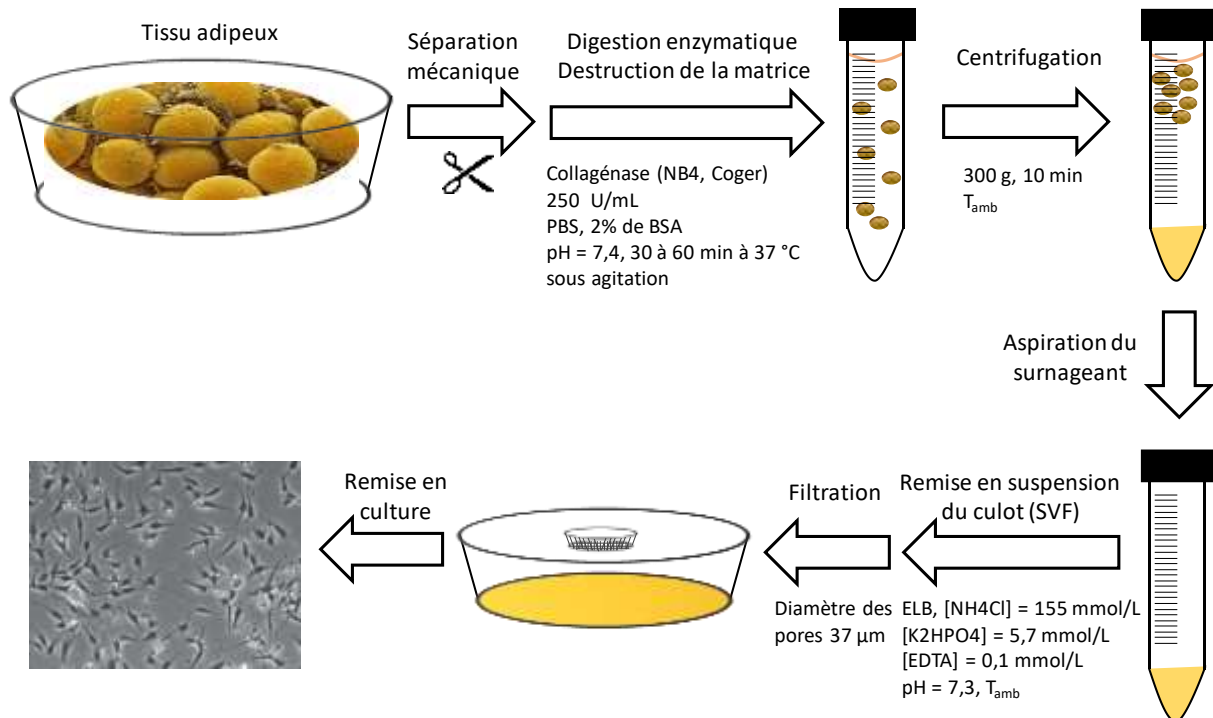


Figure I- 5 : Protocole d'isolement des ASCs – Le tissu adipeux collecté est découpé mécaniquement puis digéré dans de la collagénase pour supprimer la matrice extracellulaire et libérer les cellules. Une centrifugation permet ensuite de séparer les adipocytes de tous les autres types cellulaires qui se rassemblent dans le culot. Ce dernier correspond à la SVF (Fraction Stroma Vasculaire ou *Stromal Vascular Fraction*) qui est composée d'ASCs, de cellules épithéliales et de cellules hématopoïétiques. L'aspiration du surnageant permet d'isoler le culot contenant la SVF. Les érythrocytes sont ensuite éliminés par remise en suspension du culot dans un tampon de lyse des globules rouges. L'échantillon est enfin filtré avant d'être remis en culture ou réinjecté³²

Bien que plusieurs méthodes d'isolement existent et qu'elles soient déjà utilisées dans des applications cliniques, il semble que des progrès peuvent et doivent être faits pour isoler de manière efficiente (plus rapide, moins coûteuse, sans produit impactant la viabilité cellulaire, etc.) les cellules souches du tissu adipeux.

I.2.4.3 Caractérisation et purification

La cytométrie en flux est une technique de comptage, de tri et de caractérisation de particules en suspension dans un fluide passant devant un faisceau lumineux (laser ou lampe à arc). Les applications de cette technique sont nombreuses : diagnostic et suivi thérapeutique de différentes affections, détection de cellules pathologiques, suivi du cycle cellulaire, etc. Plus



CHAPITRE I

précisément, cette méthode permet d'analyser individuellement chaque cellule contenue dans un échantillon biologique complexe, d'en déterminer les caractéristiques physiques et propriétés fluorescentes et de les séparer. La cytométrie en flux est très largement utilisée dans les laboratoires de recherche pour séparer les populations de cellules et en déterminer les propriétés.

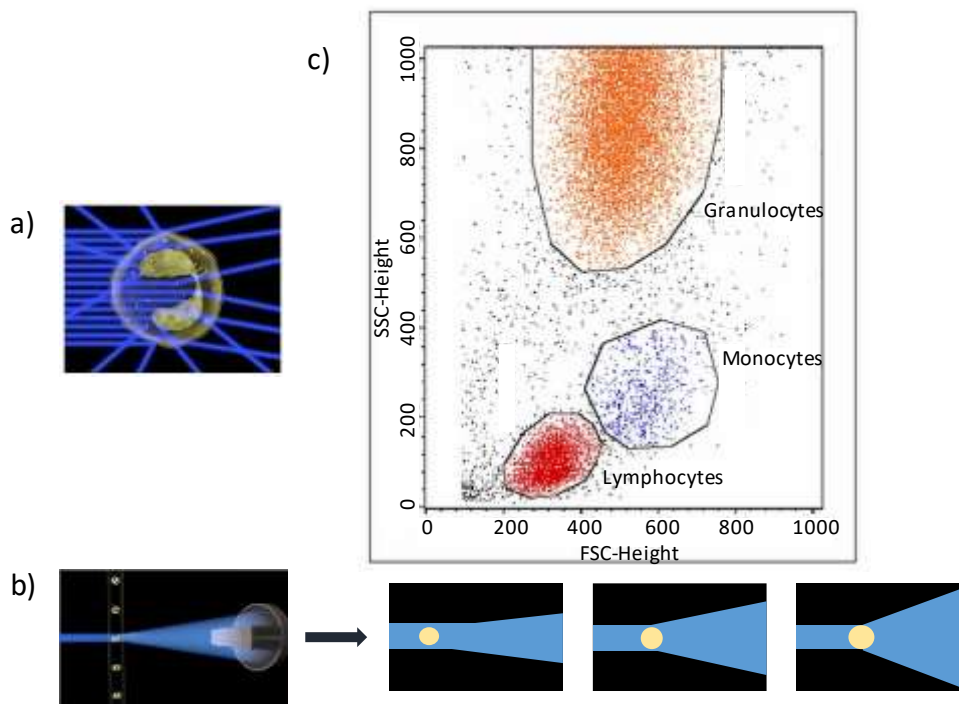


Figure I- 6 : Résultat d'une analyse d'un échantillon sanguin (globules rouges lysés, seuls les globules blancs restent) par cytométrie en flux (FACS) - a) Schématisation de la caractérisation de la granularité d'une cellule par le *Side Scatter* - b) Schématisation de la caractérisation de la taille des cellules par le *Forward Scatter*, déterminée en fonction de la diffusion de la lumière - c) Graphique obtenu après analyse FACS : en axe des abscisses, le *Forward Scatter* et en ordonnée, le *Side Scatter*. Les différentes populations sont rassemblées selon leurs propriétés de taille et de granularité. Trois populations de globules blancs : les lymphocytes (en rouge), les monocytes (en bleu) et les granulocytes (en orange) sont distinctes sur ce graphique

Le cytomètre comporte une chambre de flux éclairée par un rayon laser devant lequel les cellules passent une à une. Il est possible de mesurer directement et sans marquage deux caractéristiques des cellules :

- La taille : lorsqu'une cellule passe devant le laser, la lumière diffuse. La diffusion frontale du faisceau incident indique la taille de la cellule. Plus la cellule est grosse, plus la diffusion du rayon, dans son axe, est grande (Figure I- 6- c). Ce paramètre est analysé par le *Forward Scatter* (FSC).



- La granularité : la diffusion latérale indique la granularité de la cellule. Plus une cellule est complexe, granuleuse, plus la diffraction du rayon observée latéralement est grande (Figure I- 6- b). Ce paramètre est analysé par le *Side Scatter* (SSC).

La caractérisation des cellules peut être rendue plus précise *via* l'utilisation de marqueurs fluorescents (nécessite de recourir au FACS : *Fluorescent Activated Cell Sorter*). Les marqueurs fluorescents sont alors fixés à des anticorps (le plus souvent monoclonaux) qui vont se lier aux antigènes qu'ils ciblent.

Toutes les données lumineuses sont alors transformées en données numériques grâce à des photodiodes (FSC) et des photomultiplicateurs (SSC). L'afficheur numérique produit un graphique avec les caractéristiques choisies. Il est possible, par exemple, d'afficher la granularité en fonction de la taille (Figure I- 6- c), chaque point correspondant à un événement cellulaire.

Il est ainsi possible de caractériser et isoler les ASCs grâce au FACS et ce, en marquant les différents types cellulaires *via* des anticorps rattachés à une molécule fluorescente. Dans le cas spécifique des ASCs, cette méthode présente des limites dans le sens où des éléments autres que des ASCs peuvent être ciblés. En effet, les ASCs ne présentant pas d'antigène spécifique, les antigènes ciblés sur ces cellules pourront correspondre à ceux d'autres types cellulaires.

De manière générale, cette technique offre la possibilité d'analyser un grand nombre de cellules en un temps relativement court (au minimum 900 éléments par seconde), conférant à la technique une robustesse statistique intéressante. Cependant, cet outil possède de nombreux inconvénients. Très coûteuse et imposante, la machine peut générer des ensembles de données complexes, de nombreuses difficultés de manipulation peuvent survenir entraînant la nécessité de faire appel à un personnel qualifié. Les volumes traités étant très faibles, l'isolement de cellules à des fins chirurgicales (réinjections de cellules par exemple) apparaît impossible. De plus, utiliser cet outil pour isoler les ASCs à partir du sang n'est pas réaliste car ce sont des événements rares. En effet, le marquage de toutes les cellules (globules rouges, globules blancs, etc.) est très coûteux et surtout, n'est pas garanti. Il existe également le risque que des cellules autres que les ASCs mais présentant l'antigène ciblé soient considérées comme des ASCs, ce qui fausserait les conclusions sur la composition de l'échantillon d'intérêt. Enfin, l'inconvénient majeur réside dans le fait que les cellules doivent être marquées pour être triées, en faisant alors un outil destiné à la détection plutôt qu'à l'isolement pour une future utilisation.



1.2.5 Résumé et objectifs liés aux cellules souches adipeuses

En plus d'être apte à stocker de l'énergie, le tissu adipeux possède d'autres qualités. Il est désormais connu pour participer à un réseau complexe d'interactions entre les systèmes endocrinien, nerveux et cardiovasculaire et est également connu pour être une source riche de cellules souches multipotentes : les cellules souches adipeuses (ASCs). Ces dernières sont des cellules souches présentes au stade adulte, localisées, en abondance, dans le tissu adipeux. Les ASCs sont devenues populaires dans les thérapies cellulaires du fait de leur capacité de différenciation, de leur haute capacité à proliférer, de leur faible immunogénicité, de leur localisation (faciles à obtenir *via* un prélèvement peu invasif) et surtout de par leur activité de sécrétion.

Plusieurs travaux montrent que des progéniteurs adipeux (ASCs) migrent depuis le tissu adipeux sous-cutané (ScAT) vers d'autres tissus comme le tissu musculaire squelettique et participent au développement d'adipocytes ectopiques, à l'origine de l'apparition de désordres métaboliques comme le DT2. Le tissu adipeux et en particulier les ASCs semblent donc être au cœur de nombreux mécanismes et ouvrent des perspectives prometteuses pour le diagnostic voire le pronostic de nombreux désordres métaboliques.

Un obstacle persiste toutefois. Bien que la circulation des ASCs ait été démontrée dans la lymphe, leur mode de migration dans les tissus reste encore mal compris. L'objectif de cette étude est donc de **développer un dispositif capable de déterminer si les ASCs circulent effectivement dans le sang. Ce dispositif devra ainsi être capable de collecter des cellules rares et ce, dans le but final de réaliser des diagnostics voire des pronostics du diabète de type 2.** L'objectif subsidiaire est d'obtenir des cellules viables, dont les propriétés fonctionnelles n'ont pas été impactées afin de pouvoir les utiliser dans le cadre de la régénération des tissus.

Comme présenté dans cette première partie, les méthodes actuellement utilisées pour isoler les ASCs, aussi bien dans les salles d'opérations qu'en laboratoire de recherche, présentent de nombreux inconvénients. Ces méthodes impliquent des temps d'isolement longs, sont laborieuses, ne conduisent pas à l'obtention d'un échantillon pur (ASCs mélangées à d'autres types cellulaires) et peuvent affecter l'intégrité et les propriétés des cellules d'intérêt.

La suite de cette thèse présente la stratégie que nous avons adoptée afin d'isoler les ASCs tout en faisant appel aux outils microfluidiques adaptés pour l'isolement de cellules. Il est important de préciser à ce stade que les propriétés physiques des ASCs sont méconnues mais que l'hypothèse d'un diamètre compris entre 30 et 40 μm est faite. De plus, les propriétés biologiques ne permettent pas de distinguer les ASCs des autres types cellulaires (aucun marqueur membranaire spécifique). C'est dans ce contexte que nous avons établi notre stratégie de tri.



I.3 La microfluidique au service du tri cellulaire

La microfluidique, science se situant à la croisée de nombreux domaines : physique, chimie, ingénierie et biologie, se base sur l'étude des fluides à l'échelle micrométrique. Le contrôle des fluides à cette échelle offre la possibilité de travailler plus vite, avec des dispositifs moins volumineux, moins coûteux et dans un environnement plus propre et sûr. Les systèmes microfluidiques qui en découlent, constitués de nombreux éléments miniaturisés, permettent d'étudier et d'analyser des échantillons chimiques et biologiques.

En biologie, en particulier, ces outils permettent de réaliser des expériences à l'échelle de la cellule, de comprendre les interactions entre les différents éléments du corps (entre les cellules, entre les cellules et leur environnement, etc.), de réduire les volumes utilisés, d'améliorer la précision et la rapidité des diagnostics, etc. Ces outils ouvrent ainsi de grandes perspectives dans l'étude des cellules souches adipeuses : l'isolement de ces cellules quel que soit leur milieu biologique d'origine et la démonstration de leur présence dans le sang semblent être à portée de main.

Les méthodes qui existent pour isoler les cellules sont nombreuses, variées et se basent sur différents critères (biologiques, physiques, chimiques, etc.). Nous avons choisi d'orienter notre étude autour de méthodes de séparation de cellules rares, cas le plus critique pour l'isolement de cellules souches adipeuses. Nous avons plus particulièrement pris appui sur les travaux réalisés autour des cellules tumorales cancéreuses (CTCs). Brièvement, ces cellules constituent des biomarqueurs des cancers et sont des cellules rares puisque présentes en très faible proportion dans le sang.

Les méthodes détaillées dans le paragraphe suivant se basent ainsi sur les travaux réalisés pour isoler les CTCs⁴⁹ et sont classées selon le principe d'isolement : physique ou biologique.

I.3.1 Méthodes sans marquage

Les méthodes de séparation basées sur les propriétés physiques peuvent être divisées en deux catégories : les méthodes actives et les méthodes passives. Les méthodes actives nécessitent l'utilisation d'un champ extérieur alors que les méthodes passives ne dépendent que des propriétés intrinsèques des éléments étudiés.

I.3.1.1 Méthodes actives

Application d'un champ électrique

La diélectrophorèse (DEP) est une technique qui se réfère à l'application d'un champ électrique non uniforme sur des particules non nécessairement chargées. Ces dernières se



polarisent, impliquant alors un déplacement de charges en leur sein (principe détaillé en Figure I- 7).

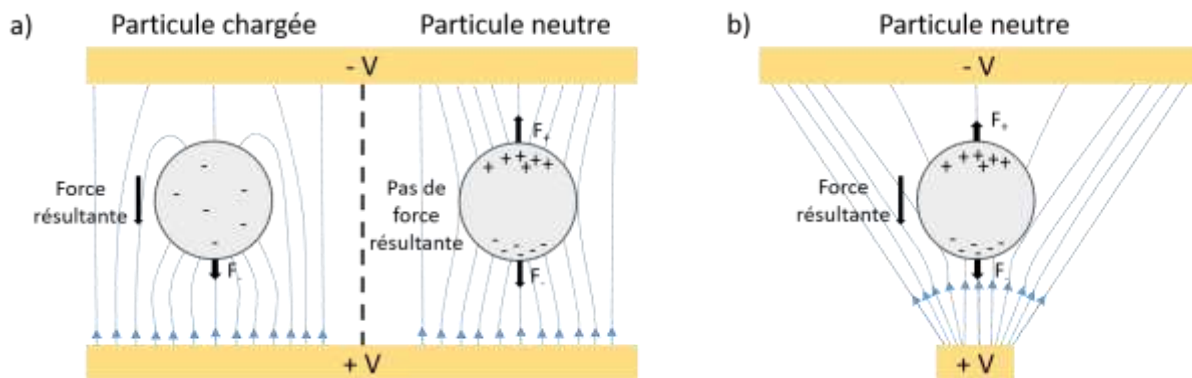


Figure I- 7 : Principe de la diélectrophorèse. Les lignes bleues représentent les lignes de champ électrique – a) A gauche : placée dans un champ électrique uniforme, une particule chargée migre vers l'électrode de signe opposé. Ce phénomène est appelé l'électrophorèse. A droite : une particule neutre et non polarisable ne subit aucunement l'influence du champ électrique – b) Dans un champ électrique non uniforme, une particule neutre mais polarisable voit apparaître en son sein un moment dipolaire. La particule devient un dipôle et une force est appliquée sur les charges de part et d'autre de la particule. L'intensité du champ électrique, plus forte du côté de la petite électrode, fait migrer la particule vers cette même électrode. Ce phénomène est typique de la diélectrophorèse

En fonction des propriétés des particules et du fluide dans lequel elles sont en suspension, les particules se déplacent vers les régions où le champ électrique est élevé ou faible. Dans le cas où la particule est plus conductrice que le milieu externe, le moment dipolaire résultant provoque une force vers les régions de champ électrique élevé. Ce comportement est connu sous le nom de DEP positive. Au contraire, dans le cas où la particule est moins conductrice que son milieu de suspension, la force dipolaire est dirigée vers les régions de champ faible. Ce comportement est connu sous le nom de DEP négative.

Dans le cas des CTCs, les cellules ont des propriétés de taille (ce sont globalement de grosses cellules) et diélectriques bien distinctes des autres cellules du sang. Dans ce cas, la séparation par diélectrophorèse est une méthode de séparation relativement efficace.

Acoustique

L'acousto-fluidique permet la manipulation, le tri et le mélange des fluides et des particules sans contact et sans marquage *via* des ondes acoustiques. Le plus souvent, les ondes acoustiques utilisées sont générées par des transducteurs piézoélectriques et sont stationnaires. L'acousto-fluidique prend alors le nom d'acoustophorèse. Cette dernière est notamment utilisée dans le tri des cellules sans que la viabilité des cellules ne soit



impactée^{50,51}. Cette méthode souffre néanmoins du manque de différence de propriétés acoustiques des cellules sanguines, ce qui limite l'usage de l'acoustophorèse pour l'isolement des cellules rares (notamment les CTCs) à partir d'échantillons sanguins complets.

I.3.1.2 Méthodes passives

Filtration

La filtration est la méthode la plus simple pour séparer des particules en fonction de leur taille et/ou de leur capacité à se déformer. Différents types de systèmes sont connus : à membrane, à barrage, à piliers ou à flux tangentiel⁵² et sont présentés en Figure I- 8.

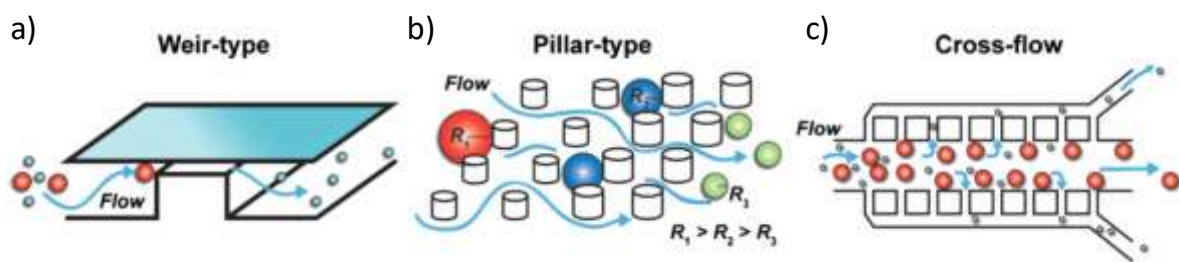


Figure I- 8 : Différents types de filtration - a) Filtre type barrage : seules les petites particules passent la marche - b) Filtre type piliers : filtration en plusieurs étapes du fait d'une augmentation de la taille des plots. Les grosses particules (en rouge) sont bloquées par les premiers plots (les plus petits) et seules les plus petites particules (en vert) parviennent à s'échapper du réseau de plots - c) Filtre de type filtration tangentielle (cross-flow) : les petites particules sont aspirées par le flux latéral tandis que les plus grosses continuent dans le canal principal³⁹

L'inconvénient majeur de la filtration est l'accumulation de particules sur le filtre qui réduit l'efficacité de séparation. La filtration à flux tangentiel (Figure I- 8- c) est la méthode qui permet d'éviter le mieux les problèmes d'encrassement ou de bouchon que connaissent les systèmes à membranes, à barrages ou à piliers. Cette méthode consiste à faire circuler un échantillon de manière orthogonale au filtre. Les petites particules passent *via* les pores du filtre tandis que les grosses continuent de circuler dans la canalisation.

Deterministic Lateral Displacement (DLD)

La DLD permet de séparer les particules selon leur taille mais aussi selon leurs propriétés mécaniques (déformabilité). Les petites particules sont séparées des plus grosses grâce à l'utilisation de bifurcations successives du flux laminaire autour d'un réseau de micropiliers orientés dans une direction particulière et régulière (Figure I- 9- a). Cette méthode a été introduite par Huang *et al.*⁵³. Depuis, de nombreuses études ont été menées et ont abouti à l'émergence de plusieurs formes de piliers afin d'optimiser les performances de tri du dispositif (Figure I- 9- b).



De récentes études ont montré que les propriétés d'asymétrie du réseau de micropiliers conduit vers la séparation de trois types de particules : les petites qui suivent la trajectoire en zigzag, les grosses qui sont déviées selon l'angle de migration et les particules de taille intermédiaire qui suivent un chemin intermédiaire, qualifié de *mixed motion* (Figure I- 9- c)⁵⁴. Vernekar *et al.*⁵⁵ ont par la suite montré que l'anisotropie induite par les piliers dépend de la forme de ces derniers.

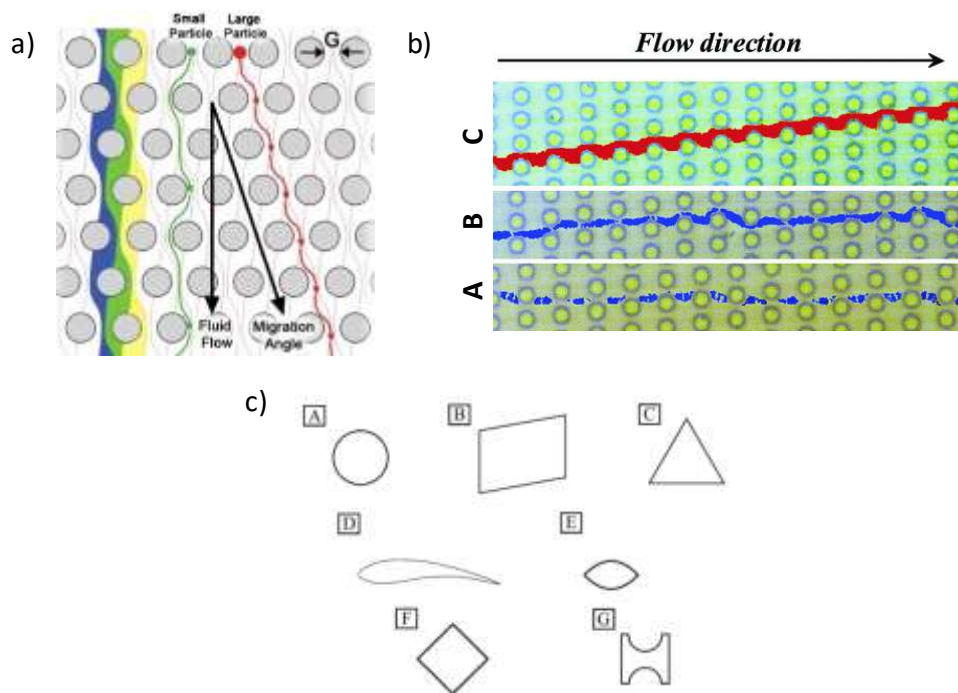


Figure I- 9 : Principe de la DLD (*Deterministic Lateral Displacement*) – a) Principe de la séparation : les particules rouges sont déplacées du fait de la géométrie des plots tandis que les particules vertes suivent les lignes de courant – b) Plusieurs mouvements de particules peuvent avoir lieu dans le dispositif : **A** mouvement en zigzag, **B** mouvement intermédiaire et **C** mouvement typique de la DLD⁵⁴ – c) Différentes formes de plots permettent d'adapter le dispositif aux propriétés morphologiques et mécaniques des particules traitées⁵⁵

L'inconvénient de cette méthode réside dans la structure du dispositif. La présence du réseau de plots peut entraîner la formation de bulles ce qui, à terme, peut dégrader les performances du dispositif. Aussi, ce dispositif peut voir apparaître des bouchons surtout dans le cas d'échantillons sanguins réels.

Méthodes inertielles

- ***Dean flow fractionation***

Lorsqu'un fluide est injecté dans un dispositif dont les canaux présentent des courbures, des vortex de Dean apparaissent. Ces derniers impliquent le mouvement des plus grosses particules d'un échantillon vers la paroi interne et le mouvement des plus petites particules



d'un échantillon vers la paroi externe (Figure I- 10- a). Cette méthode est très attrayante pour l'isolement de populations de cellules dont le diamètre se démarque des autres types cellulaires. Si nous reprenons l'exemple des CTCs, le diamètre des cellules ne permet pas de les séparer de tous les types cellulaires mais un prétraitement de l'échantillon est néanmoins possible : les dispositifs sont souvent dimensionnés pour éliminer les globules rouges.

- **Microvortex**

Cette technique implique l'usage de microvortex formés par une succession de contractions-expansions dans un canal microfluidique. Cette succession de contractions-expansions induit l'apparition d'un flux s'apparentant au flux de Dean. Lorsque le fluide pénètre dans l'expansion, la direction du flux est perpendiculaire à la direction du flux principal, entraînant l'apparition d'un flux local secondaire et d'une force de trainée ($F_D \propto a$)⁵⁶. Cette force est opposée à la force de portance totale (somme des forces induites par la présence des parois et par le gradient de cisaillement ; *wall-induced force* et *shear gradient force*) qui représente l'état d'équilibre des particules/cellules ($F_L \propto a^4$)⁵⁷. Les grosses particules sont principalement influencées par la force de portance et migrent dans les expansions tandis que les petites particules sont principalement influencées par la force de trainée (ou *Dean drag*) et restent dans le flux principal (Figure I- 10- b).

Cette méthode est utilisée pour isoler les CTCs les plus grosses. L'inconvénient majeur de la séparation par microvortex réside dans le fait que seules les plus grosses particules sont conservées impliquant une perte d'information puisque les petites particules restent dans l'échantillon et ne sont pas triées.

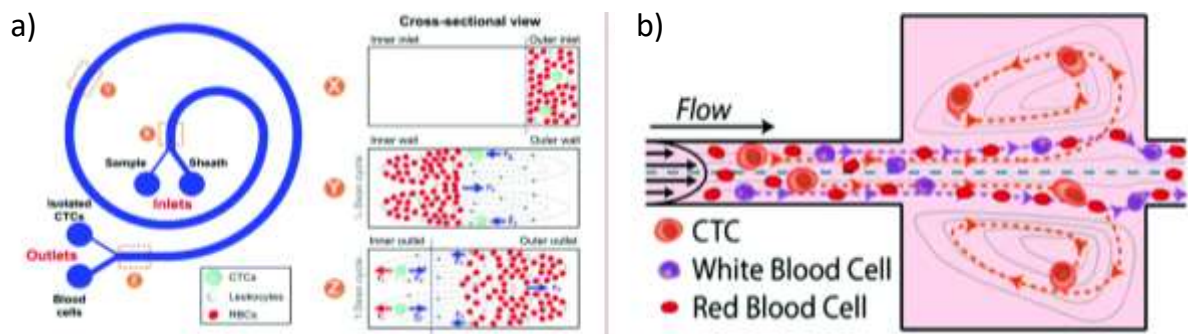


Figure I- 10 : Méthodes inertielles⁴⁹ – a) *Dean Flow Fractionation*⁵⁸ – b) *Microvortex*⁵⁹

Séparation hydrophorétique

Cette méthode permet de séparer les particules selon leur taille. Les dispositifs pour la séparation hydrophorétique sont constitués de canaux fluidiques qui comprennent des expansions et des contractions, autrement nommées rainures, placées en haut et/ou en bas des canaux. Leur présence et leur caractère anisotrope (obliques par rapport au flux entrant)



impliquent l'apparition d'un flux secondaire, rotationnel qui joue un rôle dans la séparation par taille de particules (principe détaillé en Figure I- 11). Cette même séparation est également contrôlée par le rapport entre le diamètre de la particule et la hauteur de la canalisation principale (rainure non prise en compte) H_g ($H_g = H_{\max} - H_{\text{expansion}}$). Dans le cas où ce rapport est supérieur à 0,5 ($H_g > 0,5$), les particules ne subissent pas l'influence des rainures et suivent le flux initial. Les particules pour lesquelles le rapport est inférieur à 0,5 ($H_g < 0,5$) sont quant à elles influencées par le flux et suivent plusieurs cycles : elles migrent dans la rainure puis sont déviées puis redescendent pour à nouveau migrer dans une rainure, etc.

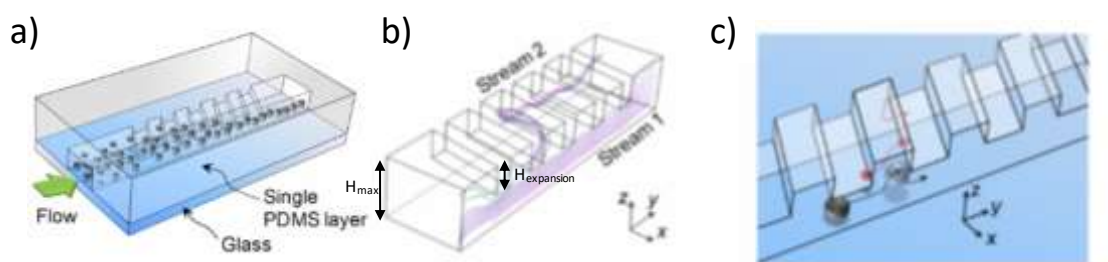


Figure I- 11 : Filtration hydrophorétique de particules micrométriques et submicrométriques par les biais d'obstacles microfluidiques anisotropes - a) Représentation du dispositif réalisé dans du PDMS - b) Simulations du gradient de pression et des lignes de courant dans le dispositif - c) Réarrangement spatial de particules de différentes tailles en fonction des mécanismes liés à l'hydrophorèse⁶⁰

L'inconvénient de cette méthode réside dans l'apparition de bulles dans les rainures lors du remplissage de la puce, difficiles voire impossibles à éliminer.

Densité

La technique la plus simple pour séparer les cellules *via* leur densité est la centrifugation. Cette méthode ne permet toutefois pas de séparer un type de cellule en particulier. En revanche, elle constitue une étape de prétraitement car elle permet de séparer plusieurs types cellulaires. Dans le cas du sang, par exemple, les globules rouges, plus denses, se retrouvent en bas, les globules blancs au milieu et le plasma en haut de l'échantillon.

Afin de séparer plus efficacement les différents types de cellules, des laboratoires sur puce ont été développés. Norouzi *et al.*⁶¹ ont présenté un outil constitué d'un canal dans lequel s'écoulent plusieurs fluides avec des densités différentes (image du dispositif en Figure I- 12- A), créant de ce fait un gradient de densité. Les cellules sont injectées dans le liquide avec la densité la plus faible. Les cellules vont chercher le point isopycnique, c'est-à-dire l'endroit où le gradient de densité leur permet d'être à l'équilibre et ainsi de flotter. Cela implique que les cellules plus denses « coulent » et se déplacent vers le liquide de plus forte densité et les cellules les moins denses « flottent » et persistent dans le fluide le moins dense (schématisation en Figure I- 12- B). L'avantage de cette méthode réside dans le fait que la taille



n'influence en rien le comportement des cellules. Cette méthode implique en contrepartie de connaître la gamme de densité des cellules et implique également le fait que toutes les cellules d'une même population aient la même densité, en faisant ainsi une méthode peu attrayante.

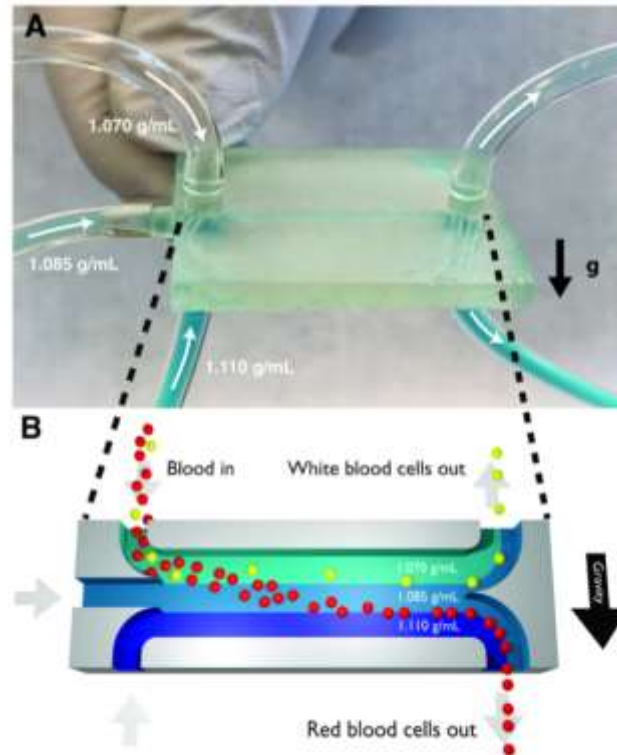


Figure I- 12 : Dispositif réalisé par Norouzi *et al.*⁶¹ et basé sur la séparation par gradient de densité - A Image du dispositif réalisé par impression 3D - B Coupe transverse du montage et illustration du comportement des fluides. 3 fluides de densité différente sont injectés et forment un gradient de densité. L'échantillon, contenant globules rouges et globules blancs, est ensuite injecté dans le fluide ayant la plus faible densité. Les globules rouges, plus denses, rejoignent le liquide de plus forte densité ($d = 1,110$) tandis que les globules blancs rejoignent l'interface entre $d = 1,070$ et $d = 1,085$

Filtration hydrodynamique

La filtration hydrodynamique a été introduite par Yamada et Seki en 2005. Le dispositif, dont le schéma de principe apparaît en Figure I- 13, consiste en un réseau de canalisations latérales reliées à une canalisation principale dans laquelle l'échantillon est injecté. Cette méthode s'apparente à la filtration à flux tangentiel. Yamada et Seki montrent que ce n'est pas la taille du pore (méthode à flux tangentiel) mais plutôt le profil de vitesse qui détermine la taille limite des particules filtrées. La filtration hydrodynamique permet en plus de cela d'éviter les problèmes d'encrassement et de bouchons rencontrés avec l'autre méthode⁶².

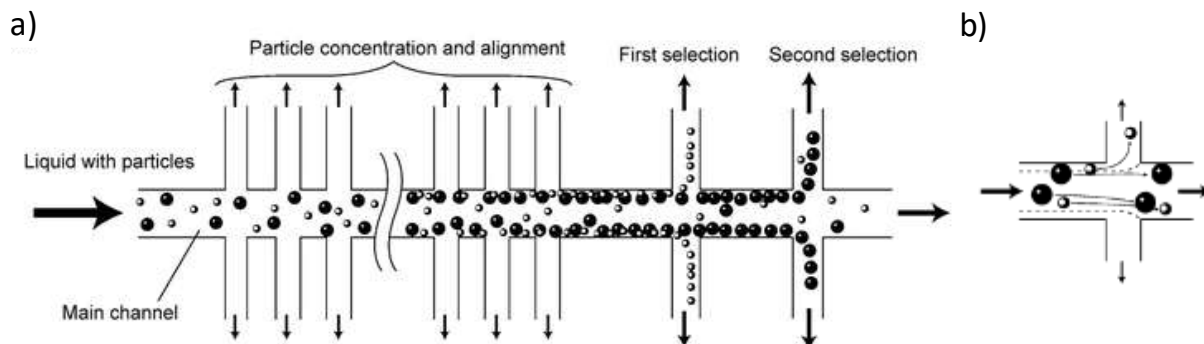


Figure I- 13 : Principe de la filtration hydrodynamique – a) Schéma du dispositif complet - b) Schématisation du comportement des particules : focalisation sur une intersection⁶²

Cette méthode sera plus amplement détaillée dans le **Chapitre III**.

Cette première partie a permis d'introduire les méthodes physiques, actives ou passives, capables d'isoler les cellules d'intérêt. La partie suivante présente les méthodes immunologiques qui peuvent être utilisées seules ou en complément des méthodes précédemment présentées.

I.3.2 Méthodes immunologiques

Les méthodes immunologiques sont basées sur la spécificité des interactions entre les antigènes présents à la surface des membranes des cellules et les anticorps correspondants.

Le premier élément clé de ces méthodes est l'anticorps (noté Ac). Les anticorps, aussi connus sous le nom d'immunoglobulines (notées Ig), sont des protéines produites par les plasmocytes (lymphocytes B au stade final de la différenciation) lorsque le corps subit une agression extérieure (de type bactérie, virus) ou intérieure (de type cellules cancéreuses). Leur rôle est de lutter contre l'intrusion des pathogènes. Ces protéines possèdent trois fonctions principales : se lier à l'antigène, déclencher le système du complément^d et activer la réponse immunitaire.

Lors d'une agression, un grand nombre d'anticorps est produit lors de la réponse immunitaire et tous sont capables de reconnaître, grâce à leur paratope, une zone de la substance exogène : l'épitope ou autrement nommé déterminant antigénique. Tous les anticorps ne possèdent pas le même paratope permettant d'atteindre plus de zones de la substance : la réponse immunitaire est alors qualifiée de polyclonale.

^d **Système du complément** : Groupe de 25 protéines faisant partie de l'immunité innée. Douze d'entre elles jouent un rôle dans l'élimination des pathogènes.



Les antigènes (Ag) sont quant à eux des éléments très variables (nature, caractéristiques, masses moléculaires, conformations très variées) capables d'être reconnus par les anticorps. L'interaction entre un antigène et les anticorps dont les paratopes sont spécifiques des épitopes à sa surface est schématisée en Figure I- 14.

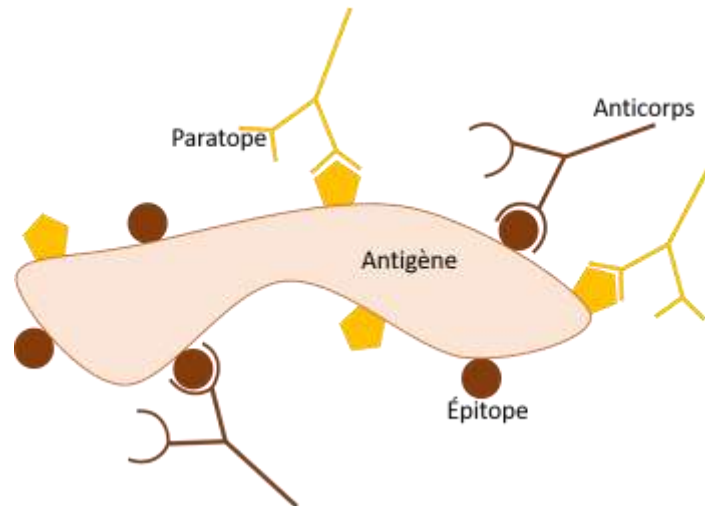


Figure I- 14 : Représentation schématique de la liaison entre les épitopes d'un antigène et les paratopes complémentaires des anticorps spécifiques

I.3.2.1 Structure des anticorps

Il existe 5 catégories d'anticorps, chacune ayant une fonction spécifique. Ces 5 catégories d'anticorps ainsi que leurs fonctions respectives sont détaillées dans le Tableau I- 2.

Les anticorps monoclonaux sont composés de 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes (au minimum 50 kDa) et 2 chaînes légères (22 kDa). Ces deux types de chaînes comprennent une partie constante et une partie variable. La partie constante, commune à tous les anticorps d'une même catégorie, est composée de chaînes carbonées. La partie variable quant à elle contient un paratope spécifique d'un épitope d'un antigène. Les antigènes se lient ainsi aux anticorps qui leur sont spécifiques.

Les anticorps sont au cœur des méthodes de séparation immunologique. Le paragraphe suivant détaille quelques-unes de ces méthodes.



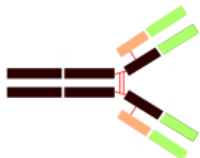
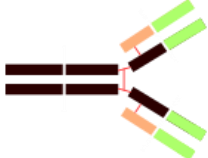
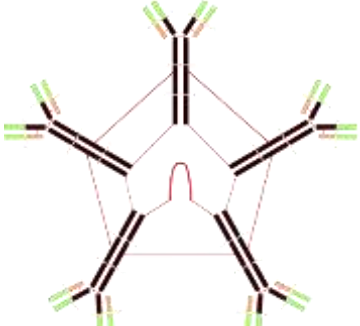
	Schéma	Poids moléculaire	Fonction
IgG (monomère)		150 kDa	✓ Contrôle des infections ✓ Neutralisation des toxines ✓ Opsonisation^e
IgD (monomère)		150 kDa	✓ Différenciation du lymphocyte B
IgE (monomère)		150 kDa	✓ Défense immunitaire contre les parasites et réactions d'hypersensibilité immédiate
IgA (dimère)		150 à 300 kDa	✓ Défense immunitaire contre les toxines et agents infectieux
IgM (pentamère)		900 kDa	✓ Activation du complément ✓ Défense immunitaire contre virus et bactéries

Tableau I- 2 : Schématisation, poids moléculaires et fonctions des différents types d'anticorps

^e **Opsonisation** : Phénomène par lequel un anticorps opsonine, c'est-à-dire se combine à l'antigène d'une cellule cible pour la phagocyter.



I.3.2.2 Méthodes de séparation immunologique

Immunocapture

L'immunocapture est la méthode traditionnelle de séparation immunologique. Le principe repose sur la fixation d'anticorps sur la surface de puits. Cette méthode peut être destinée à la capture et au dosage de protéines (dans ce cas, l'immunocapture devient un immunodosage) ou encore à la capture de cellules pour les détecter voire les séparer des autres cellules présentes dans l'échantillon (principe schématisé en Figure I- 15).

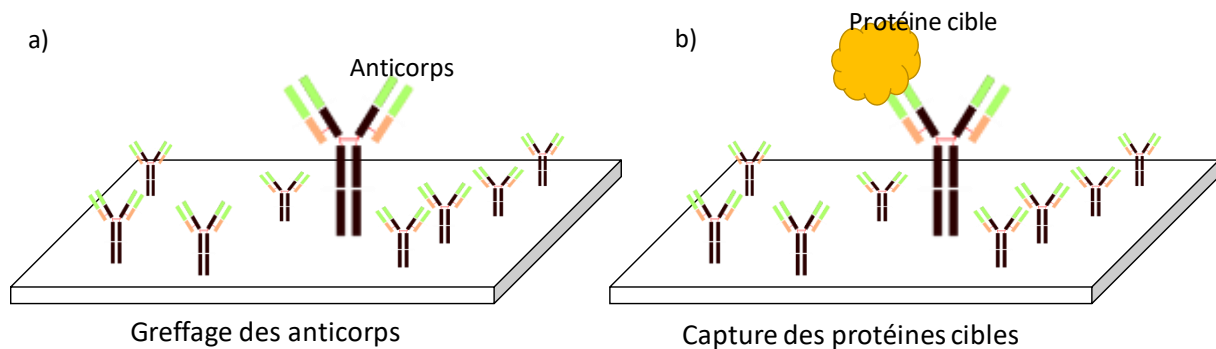


Figure I- 15 : Principe de l'immunocapture – a) Les anticorps sont d'abord fixés sur la surface à fonctionnaliser – b) Attache entre les protéines ciblées et les anticorps spécifiques des protéines cibles

L'immunocapture peut être soit directe soit indirecte. Dans le cas particulier de la capture des cellules, l'immunocapture directe implique que les anticorps fixés soient spécifiques des antigènes des cellules d'intérêt. Dans l'autre cas, les anticorps ciblent toutes les cellules de l'échantillon sauf les cellules d'intérêt. L'immunocapture indirecte présente un avantage certain dans le cas où les cellules cibles n'ont pas d'antigène spécifique connu.

L'immunocapture directe est la méthode de tri, avec marquage, la plus couramment utilisée pour l'isolement des CTCs. Plusieurs anticorps peuvent être utilisés : anti-EpCAM (le plus courant), dirigés contre des marqueurs alternatifs ou encore des combinaisons d'anticorps. L'immunocapture indirecte, moins courante mais toutefois employée, permet d'isoler les CTCs par déplétion des globules blancs : les anticorps utilisés sont les anti-CD45, spécifiques des globules blancs.

Plusieurs formes de tri par immunocapture existent, la forme la plus couramment utilisée étant le réseau de piliers (Figure I- 16). Les micropiliers permettent d'augmenter les surfaces de contact et augmentent par ce fait les probabilités de contact entre cellules et piliers. Les cellules cibles sont ensuite capturées sur les piliers fonctionnalisés avec les anticorps spécifiques de ces mêmes cellules. Bien que cette méthode soit très adaptée à la capture des cellules, le grand nombre de micropiliers rend difficile la libération des cellules capturées.

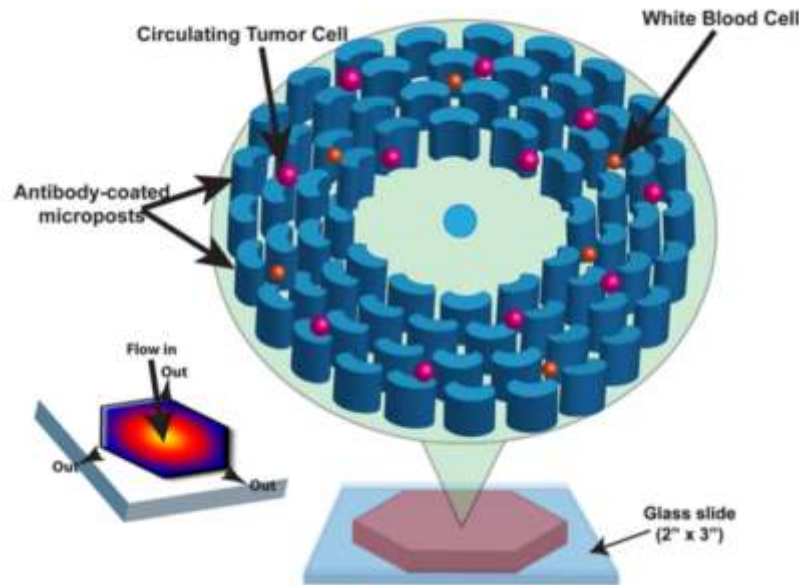


Figure I- 16 : Exemple de séparation par immunocapture directe *via* l'utilisation de micropiliers dans le but d'isoler les CTCs. Les CTCs, représentées en rouges, sont capturées sur les piliers fonctionnalisés avec des anticorps spécifiques (EpCAM)⁶³

Immunomagnétophorèse

La méthode d'immunomagnétophorèse, à l'instar de la méthode par magnétophorèse, nécessite l'usage d'un champ extérieur magnétique pour séparer les particules. Dans le cas de la magnétophorèse, les particules possèdent des propriétés magnétiques intrinsèques qui permettent de les manipuler et de les déplacer *via* un aimant. Lorsque les particules sont très peu sensibles au champ magnétique, ce qui est le cas des cellules, il est nécessaire de recourir à l'immunomagnétophorèse. Cette méthode requiert l'utilisation d'anticorps certes spécifiques des cellules cibles mais surtout liés à des particules magnétiques. De manière générale, le tri par immunomagnétophorèse est basé sur un marquage direct du fait d'une plus grande sélectivité et d'une meilleure spécificité comparé aux méthodes indirectes.

L'immunomagnétophorèse est l'une des premières méthodes développées pour isoler les cellules et fait toujours partie des méthodes les plus utilisées à ce jour. Elle est notamment utilisée pour isoler les CTCs et parmi toutes les techniques connues, le MACS (*Magnetic Activated Cell Sorter*) représente la méthode la plus répandue et même la méthode conventionnelle pour isoler les CTCs.

Cell rolling

Le principe du *cell rolling* est basé sur l'alternance de zones sur lesquelles sont greffées des récepteurs, spécifiques des ligands des cellules cibles, avec des zones passivées (sans récepteur). L'affinité entre récepteur et ligand permet aux cellules d'interagir avec la surface fonctionnalisée (comme schématisé en Figure I- 17- a). Les forces hydrodynamiques



empêchent alors une liaison forte récepteur/ligand et permettent aux cellules de se déplacer, de rouler le long des zones fonctionnalisées (Figure I- 17- b). Les cellules qui ne présentent pas les ligands ciblés ne sont pas influencées par les zones fonctionnalisées et restent dans le flux principal.

Cette méthode est très attrayante puisqu'aucun marquage des cellules n'est requis. La difficulté majeure de cette méthode consiste à trouver l'équilibre entre la force due à l'affinité entre un ligand et son récepteur et les forces hydrodynamiques.

Cette méthode sera plus amplement détaillée au **Chapitre IV**.

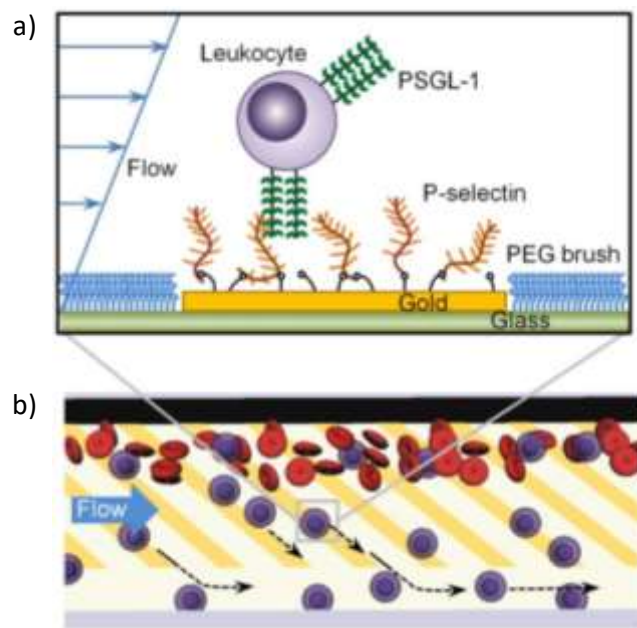


Figure I- 17 : Principe du *cell rolling*⁶⁴ – a) Les ligands des cellules (des leucocytes dans cet exemple) interagissent avec la surface fonctionnalisée (récepteurs spécifiques fixés sur une couche d'or par l'intermédiaire d'une monocouche auto-assemblée) - b) Du fait de l'interaction ligand/récepteur, les cellules roulent sur la surface fonctionnalisée et changent de trajectoire

I.3.3 Combinaison des méthodes

Toutes les méthodes détaillées précédemment présentent différents avantages et inconvénients quant à la séparation et l'isolement des cellules. Le constat est néanmoins le même pour toutes les méthodes : aucune d'entre elles ne parvient à isoler complètement (à 100 %) les cellules ciblées. De ce constat sont nées les techniques d'isolement multi-étapes qui impliquent la combinaison de différentes méthodes. De manière générale, ces dispositifs impliquent la combinaison d'une étape de prétraitement de l'échantillon, souvent sans marquage, et d'une étape de traitement (séparation, détection, etc.), souvent avec marquage.



Dans le cas des CTCs, de nombreux dispositifs multi-étapes ont vu le jour et dépendent des applications requises. En effet, la combinaison d'une étape de prétraitement basée sur des propriétés physiques suivie d'une étape d'isolement impliquant l'immunocapture négative permet d'obtenir des taux de récupération de CTCs extrêmement élevés, ce qui est convenable pour des applications cliniques nécessitant un comptage des CTCs. De même, le prétraitement d'un échantillon *via* une méthode physique, sans marquage, suivi par une immunocapture positive convient à des applications telles que la culture des CTCs. Toutefois, de nombreux progrès restent à faire surtout dans le cas de l'isolement de cellules rares.

1.3.4 Résumé et objectifs liés au développement du dispositif de tri

Les dispositifs microfluidiques sont devenus des outils incontournables pour effectuer des diagnostics cliniques et thérapeutiques et ouvrent encore de nouvelles perspectives dans de nombreux domaines. Ces dispositifs mettent en jeu les propriétés physiques, biologiques ou encore chimiques des cellules et constituent des méthodes alternatives prometteuses pour isoler différents types cellulaires.

Notre objectif sur cette partie est de **développer un outil microfluidique apte à isoler complètement les cellules souches adipeuses à partir du sang et ce, sans affecter leurs propriétés biologiques.**

Pour réaliser de tels dispositifs, plusieurs techniques sont actuellement employées. La prochaine et dernière partie de ce chapitre détaille les méthodes de fabrication des puces microfluidiques.

1.4 Techniques de fabrication des laboratoires sur puce

Dans les années 60, les premiers circuits intégrés et plus particulièrement les microprocesseurs font leur apparition grâce au développement de nouvelles technologies comme la photolithographie. Dans les années 80, de nouveaux dispositifs, les MEMS (*Micro Electro Mechanical Systems*), font intervenir des microéléments mobiles intégrés sur une galette de silicium, réalisés grâce à de nouveaux procédés de gravure du silicium. Les microsystèmes connaissent de nouveaux développements dans les années 90 avec l'avènement de la microfluidique et ouvrent de nouvelles perspectives dans les domaines de la biologie et de la chimie⁶⁵. Les laboratoires sur puce naissent ainsi du besoin d'intégrer et de miniaturiser des étapes d'analyses biologiques et chimiques sur une puce microfluidique.

De nos jours, différents procédés de fabrication sont utilisés pour la réalisation des laboratoires sur puce. Les paragraphes suivants ont pour rôle de présenter l'évolution et plus particulièrement les caractéristiques de certains de ces procédés.



I.4.1 Fabrication par photolithographie (lithographie optique)

Les étapes du procédé de photolithographie commencent par le dessin, sur un logiciel tel que CleWin ou encore AutoCAD, des motifs qui constituent le dispositif. Le dessin est ensuite reporté sur un masque optique qui est soit un film plastique souple soit une plaque de verre. Dans le cas du film plastique, les motifs sont réalisés par impression avec une encre opaque aux UV. Dans le deuxième cas, les motifs sont gravés dans une couche de chrome préalablement déposée sur la plaque de verre.

Une fois les motifs définis, une couche de résine photosensible est déposée à la surface d'un substrat. Cette couche est ensuite pré-recuite, insolée aux UV à travers le masque, recuite puis développée (procédé schématisé en Figure I- 18). Deux résultats, en fonction de la sensibilité de la résine, peuvent être obtenus. Dans le cas des résines positives, la partie exposée à la lumière devient soluble dans le développeur alors que la partie non exposée reste insoluble (Figure I- 18- 3- b). A l'opposé, les résines négatives voient la partie exposée rester insoluble dans le développeur alors que la partie non exposée reste soluble (Figure I- 18- 3- a).

La photolithographie constitue la première étape de bien des techniques de fabrication en microélectronique et en microfluidique.

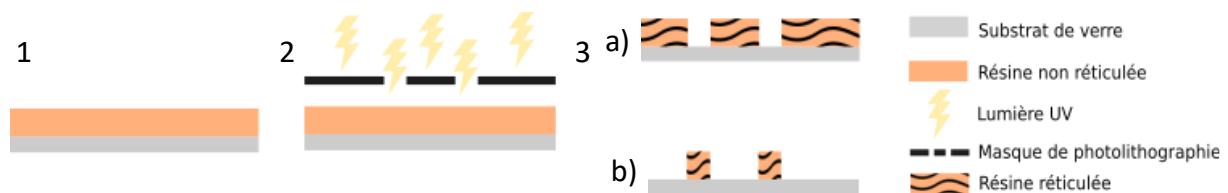


Figure I- 18 : Protocole de fabrication d'une puce microfluidique par photolithographie - 1) Dépôt de la résine - 2) Exposition aux UV : impression des motifs *via* le masque optique - 3) Recuit puis développement a) dans le cas d'une résine négative, la partie non insolée est retirée lors du développement et b) dans le cas d'une résine positive, la partie insolée est retirée lors du développement

I.4.2 Fabrication par lithographie dure

Les premiers laboratoires sur puce ont été réalisés par micro-usinage du silicium grâce aux techniques développées pour la réalisation des microprocesseurs. Leur fabrication requiert l'utilisation d'une première étape de photolithographie qui permet de définir les motifs qui constitueront le dispositif. La particularité de cette technique réside dans le fait que les motifs sont directement réalisés et gravés dans le substrat lui-même.

La gravure du silicium peut se faire par voie sèche ou par voie humide et être isotrope ou anisotrope. Le choix de la réalisation (voie sèche ou humide) et de l'orientation (isotrope ou anisotrope) dépend des géométries désirées. Ces structures n'étant pas fermées, une étape



d'assemblage est requise : le collage entre le silicium gravé et un autre matériau servant de capot. Pour ce faire, différents matériaux et différentes techniques de collage ont été développées⁶⁶.

Bien que possédant certains avantages : le caractère hydrophile du silicium représente un atout pour le remplissage des canaux, les puces microfluidiques réalisées en silicium sont désormais peu nombreuses. Ceci vient du fait que le silicium coûte cher, qu'il n'est optiquement transparent que lorsqu'il est soumis au rayonnement infrarouge et qu'il est très fragile (pouvant facilement se cliver).

I.4.3 Fabrication par lithographie douce

Du fait de sa biocompatibilité, sa facilité de mise en œuvre, sa transparence, son bas coût, etc., le polydiméthylsiloxane (PDMS), est devenu un incontournable dans la fabrication de prototypes de laboratoires sur puce et est un matériau de prédilection pour le moulage de dispositifs fluidiques. La fabrication des puces en PDMS nécessite plusieurs étapes combinant photolithographie et moulage.

Pour réaliser un dispositif, il est nécessaire de fabriquer au préalable un moule. Le PDMS, mélangé à un agent réticulant (pour le durcir), est ensuite coulé dans le moule et placé dans un four. Une fois durci, réticulé, le PDMS est décollé du moule : les microcanaux, initialement en relief sur le moule, sont alors formés, « creusés » dans le PDMS. A ce stade, la puce ne comprend aucune entrée ou sortie fluidique. Ces ouvertures fluidiques sont alors réalisées par perçage du PDMS à l'aide d'une aiguille ou d'un emporte-pièce et sont adaptées à la taille des tubes d'injection. La puce est finalisée par un capotage avec du verre. Le PDMS, avec les microcanaux, et le substrat de verre, qui constitue le capot, sont traités au plasma avant d'être mis en contact pour un scellement définitif de la puce microfluidique. Le procédé de fabrication d'une puce en PDMS est schématisé en Figure I- 19.

Malgré ses avantages, l'utilisation du PDMS semble se limiter à des applications relativement simples et ne semble pas pouvoir mener à la réalisation d'un laboratoire sur puce avec de nombreuses fonctions complexes.

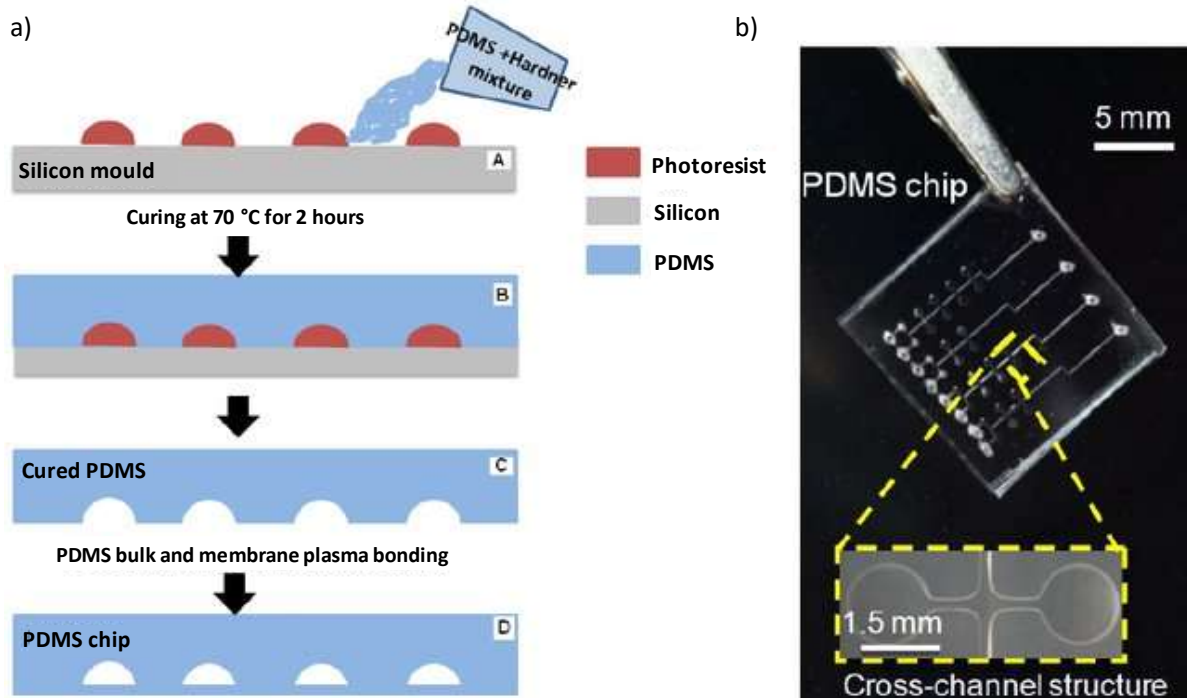


Figure I- 19 : Protocole de fabrication de puces microfluidiques en PDMS – a) Protocole de fabrication d'une puce en PDMS – b) Photo de la puce en PDMS obtenue *via* ce procédé⁶⁷

I.4.4 Fabrication par laminage

Avec l'émergence de nouveaux matériaux, biocompatibles, faciles à utiliser et à mettre en forme, au coût faible et avec bien d'autres avantages, ont émergé de nouvelles techniques de fabrication de puces dont le laminage de films secs de résine photosensible.

Les films photosensibles peuvent être fabriqués à partir de résine liquide ou peuvent être directement achetés dans le commerce. Abgrall *et al.*⁶⁸ sont les premiers à avoir présenté la fabrication d'une puce microfluidique par laminage de films de SU-8 (résine époxy négative, développée par IBM à la fin des années 80). Pour réaliser une telle puce, la SU-8, à l'état liquide, est enduite sur un substrat souple et pré-recuite avant d'être retirée du substrat souple. Un film souple de résine est alors obtenu et peut être laminé sur la surface d'intérêt. La succession de laminages et de mise en forme de la résine par photolithographie permettent d'obtenir des structures 3D (Figure I- 20).

D'autres approches sont basées sur l'utilisation de films secs disponibles dans le commerce comme par exemple celle de Vulto *et al.*⁶⁹ qui ont utilisé les résines Ordyl SY300 (28 μm d'épaisseur) et Ordyl SY550 (54 μm d'épaisseur) pour fabriquer des structures avec des motifs complexes.

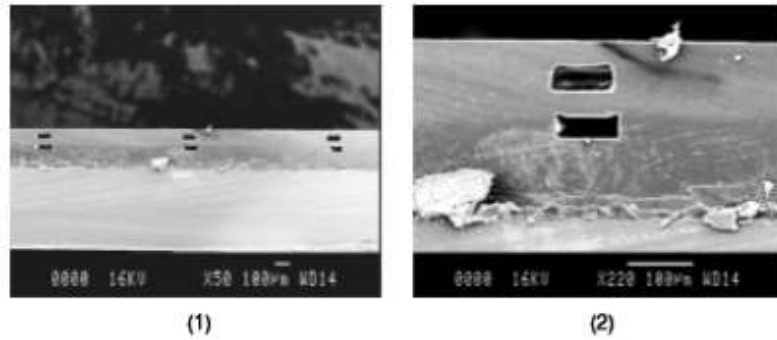


Figure I- 20 : Images MEB de canaux microfluidiques réalisés par laminage de films de SU-8 – (1) Microcanaux de hauteur 35 μm et de largeur 100 μm – (2) Zoom sur ces mêmes canaux⁶⁸

Une étude plus récente réalisée au LAAS-CNRS et publiée par Courson *et al.*⁷⁰ met en lumière une résine époxy photosensible négative : DF-10XX (société EMS) qui se trouve sous forme de film sec et qui présente de nombreux avantages comparé aux différents films utilisés au préalable. Cette résine est peu coûteuse (environ dix fois moins chère que la SU-8), les temps de fabrication sont fortement réduits (diminué d'un facteur trois par rapport à la SU-8), différentes épaisseurs sont disponibles (5 μm , 10 μm , 25 μm , 50 μm et 100 μm) et, combinés aux technologies de laminage et de photolithographie, ces films peuvent conduire à des structures 3D extrêmement complexes (Figure I- 21).

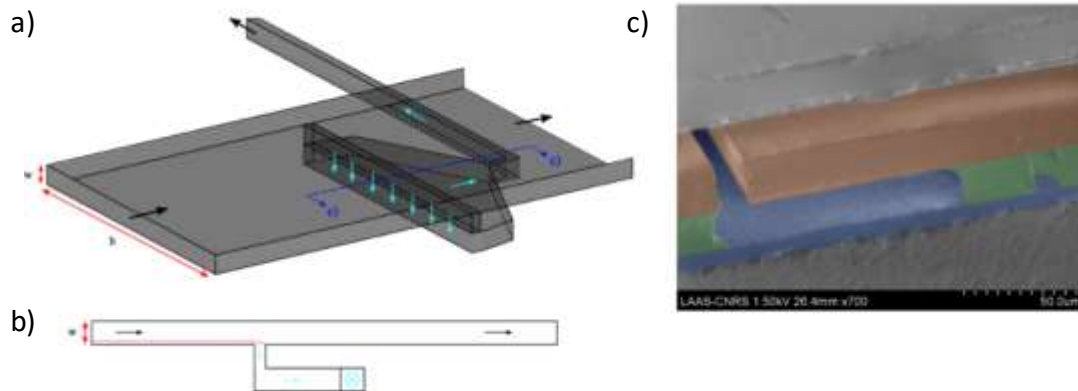


Figure I- 21 : Exemple de réalisation d'une structure 3D par laminage de films secs – a) Schéma 3D de l'architecture du canal microfluidique – b) Coupe 2D du même canal schématisé en a) – c) Image réalisée au MEB d'une puce réalisée selon le design représenté en a), chaque couleur met en avant un niveau de film sec⁷¹

La méthode de fabrication de laboratoires sur puce par méthode de laminage de couches de films secs sera plus amplement développée dans la suite du manuscrit.



I.4.5 Méthode par impression 3D

L'approche la plus récente est la fabrication de laboratoires sur puce par impression 3D. L'impression 3D est une méthode de fabrication additive qui permet de structurer, étape par étape (par superposition de matériau point par point ou couche par couche), des motifs tridimensionnels complexes (exemple de structure 3D complexe en Figure I- 22).

Ces méthodes offrent la possibilité d'un prototypage rapide en mettant à disposition un très large choix de matériaux ; choix bien plus important que celui des résines. Ces méthodes pourraient ainsi devenir incontournables et transformer complètement les méthodes de fabrication et de production actuelles et ce, dans de nombreux domaines : aéronautique, bâtiment, biomédical, etc.

Différentes techniques sont associées à l'impression 3D : structuration par dépôt de fil fondu (FDM), impression par jet d'encre 3D, stéréolithographie, etc. Du fait de sa précision, la méthode d'impression par stéréolithographie est celle qui présente le plus de potentiel pour une application en microfluidique.

A ce jour, les techniques d'impression 3D ne sont pas assez matures pour supplanter les autres méthodes de fabrication. Elles restent en effet limitées par certains verrous technologiques : une faible résolution dans certains cas et l'impossibilité de réaliser des structures avec plusieurs matériaux⁷². Une fois ces verrous débloqués, l'impression 3D pourrait devenir la méthode préférentielle de fabrication dans de nombreux domaines, notamment le domaine médical.

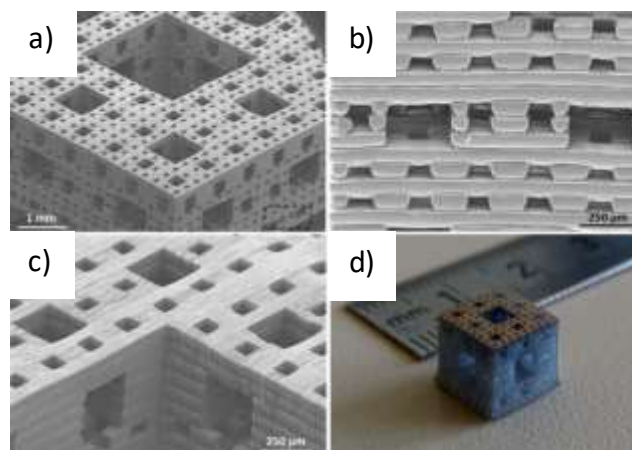


Figure I- 22 : Réalisation par impression 3D d'une éponge de Menger – a) Image MEB de l'architecture – b) Focalisation sur un côté de la structure – c) Focalisation sur le haut de la structure- d) Photographie de la structure finale⁷³



I.4.6 Résumé

De nombreuses méthodes sont au service de la fabrication de laboratoires sur puce fonctionnels et compatibles avec nos applications et nos échantillons. Ces méthodes permettent de travailler avec des matériaux biocompatibles, chimiquement inertes, réutilisables, peu coûteux et ont permis de rendre incontournable l'utilisation des laboratoires sur puce aussi bien dans le milieu académique que dans le milieu industriel.

Parmi les méthodes à ce jour disponibles, le laminage de films secs apparaît comme une méthode très adaptée pour la fabrication de structures complexes. Par la facilité et la rapidité de mise en œuvre, le faible coût des films secs, la résolution qui lui est associée, etc., cette méthode est prometteuse et sera donc utilisée dans ces travaux.

I.5 Positionnement du problème et objectifs de thèse

Comme nous avons pu le voir tout au long de ce chapitre, le choix d'une méthode d'isolement cellulaire se fonde sur les propriétés intrinsèques des cellules. Une étape préliminaire d'identification des caractéristiques des ASCs est donc indispensable. Nous avons vu que la nature des récepteurs membranaires n'est pas discriminante et nous n'avons pas une connaissance précise de leurs propriétés physiques (taille, déformabilité, etc.).

Cette partie présente l'analyse qui nous a permis de définir le diamètre des cellules souches adipeuses. Les résultats alors obtenus ont été déterminants et ont mené à l'élaboration de notre stratégie d'isolement.

I.5.1 Détermination du diamètre des ASCs

Une échelle des diamètres de quelques types cellulaires est proposée en Figure I- 23. La gamme de tailles des différents types cellulaires est assez large : un recouvrement des tailles apparaît notamment entre de nombreux types de cellules. Il semble ainsi difficile de distinguer certains leucocytes des globules rouges ou certains leucocytes d'autres leucocytes. Il en est de même pour les CTCs dont la gamme de taille recouvre celle de certains leucocytes. La question suivante se pose alors : qu'en est-il pour les cellules souches adipeuses ?

L'utilisation de premiers dispositifs microfluidiques, de simples canaux rectangulaires, a dans un premier temps permis d'appréhender le comportement des cellules dans un environnement microfluidique. Ces dispositifs ont plus particulièrement permis de mettre en évidence le fait que les cellules souches adipeuses ont un diamètre variable parfois proche des 10 μm .

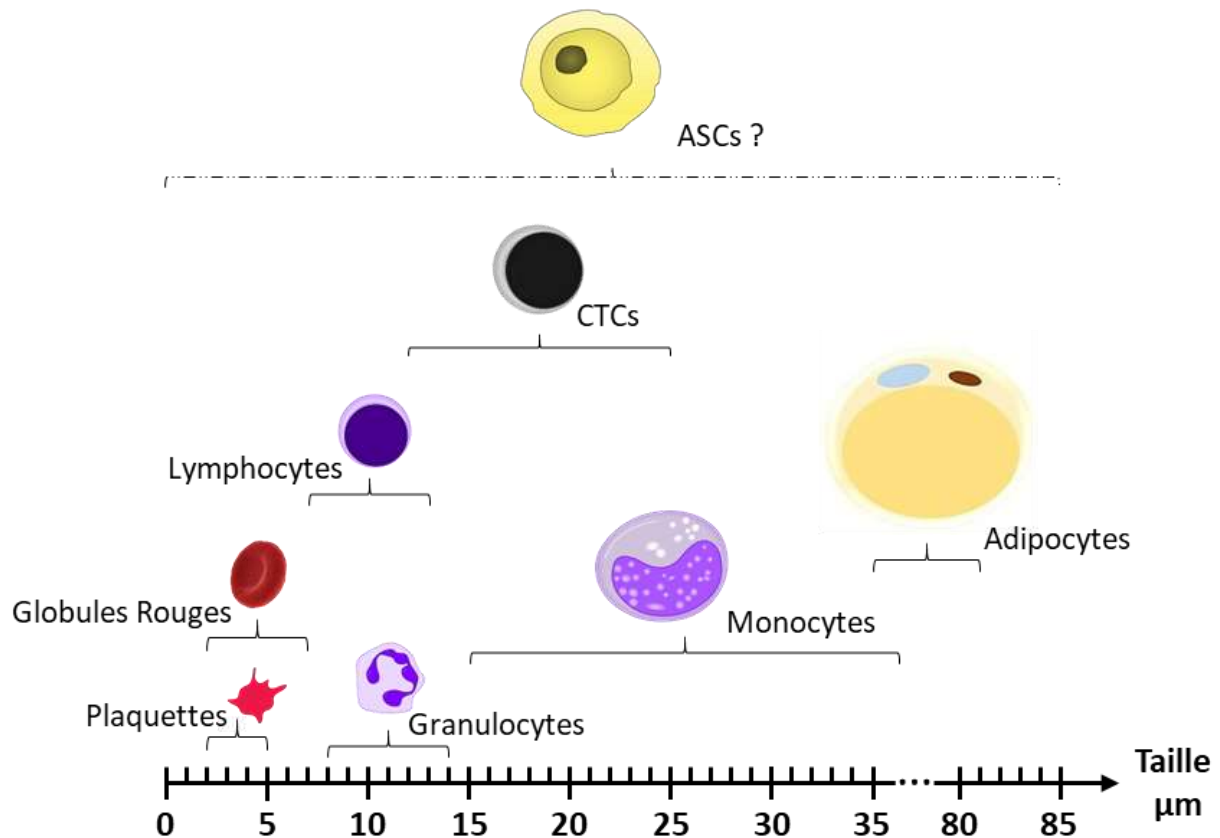


Figure I- 23 : Échelle des tailles des cellules sanguines : plaquettes, globules rouges et globules blancs ainsi que des adipocytes et des cellules tumorales cancéreuses – La question de la place prise par les ASCs dans cette échelle est primordiale pour faire un premier choix dans la stratégie de tri

Afin de déterminer avec précision la gamme de taille de ces cellules, nous avons décidé d'effectuer une mesure du diamètre des cellules par cytométrie en flux ou plus précisément par FACS (méthode détaillée en partie **I.2.4.3**). La calibration de l'appareil a été réalisée à l'aide de billes en polystyrène de différents diamètres (5, 10, 15 et 20 μm). Un échantillon provenant d'un tissu adipeux murin et ne contenant que les cellules de la Fraction Stroma-Vasculaire (SVF) a ensuite été analysé. Cet échantillon contient des globules blancs, des cellules sanguines et des ASCs. Afin de distinguer les différents types de cellules, les lymphocytes et les ASCs ont été marqués avec des anticorps liés à des fluorochromes. Les leucocytes ont ainsi été doublement marqués avec un anticorps anti-CD45 et un anticorps anti-CD31. Les ASCs ont été marquées avec un anticorps anti-Sca1, anticorps dédié aux cellules souches murines. Les autres types cellulaires (notamment les globules rouges) n'ont pas été marqués. Les cellules ont ensuite été placées dans une solution tampon adaptée au FACS (PBS 1x, 2-5 % de BSA, 2mM d'EDTA et 2 mM de NaN_3) avant d'être analysées.

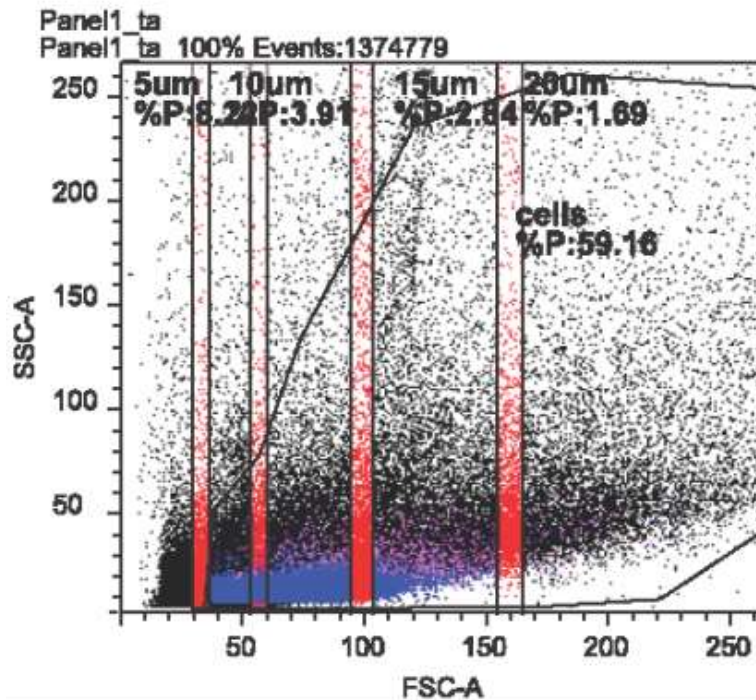


Figure I- 24 : Résultats FACS qui ont permis de faire le choix d'une stratégie de tri des ASCs – Éléments roses = ASCs ; Éléments bleus = lymphocytes ; Éléments rouges = cellules dont le diamètre est égal à celui des billes de calibration (5 μm ou 10 μm ou 15 μm ou 20 μm) ; Éléments noirs = autres leucocytes (monocytes, granulocytes)

Les résultats de l'analyse par FACS sont rassemblés en Figure I- 24. Pour rappel, l'axe des ordonnées correspond à la granularité des cellules tandis que l'axe des abscisses correspond au diamètre des cellules. Nous nous intéresserons seulement à l'axe des abscisses qui fournit plusieurs informations capitales pour la suite de l'étude. Le premier constat pouvant être fait porte sur l'écart entre les différentes colonnes associées aux billes de calibration. Bien que l'écart de taille entre les billes soit constant, leur position sur l'axe des abscisses n'évolue pas de manière linéaire dénotant une certaine dérive de la mesure. Malgré cette dérive, il est possible de comparer les différentes espèces cellulaires et de conclure quant au diamètre des ASCs. Ces dernières sont marquées en rose sur le graphique et se mélangent parfaitement aux autres types cellulaires. Nous remarquons que le nuage de lymphocytes (points bleus) est en partie confondu avec le nuage correspondant aux ASCs (points roses). En plus de se mélanger aux lymphocytes, les ASCs se mélangent, entre autres, aux monocytes et granulocytes (points noirs). Il apparaît enfin sur ce graphique que les ASCs ont une gamme de taille étendue variant de 10 μm à plus de 20 μm .

Ces premiers résultats ont été décisifs pour notre étude puisqu'ils prouvent que notre première hypothèse (diamètre compris entre 30 et 40 μm) n'était pas viable mais surtout que les ASCs se distinguent de certains types cellulaires mais pas de tous.



I.5.2 Bilan et objectifs de la thèse

L'intérêt porté aux cellules souches adipeuses ne cesse de croître du fait de leur capacité à se différencier en différents types cellulaires et de leur fort potentiel pour des applications en médecine régénératrice. Ces cellules sont déjà impliquées dans de nombreuses thérapies cellulaires et montrent des performances de différenciation et d'adaptation exceptionnelles (pour rappel voir partie I.2). En plus de cela, les récents travaux menés au STROMA-lab tendent à montrer que les ASCs sont au cœur de nombreux mécanismes ouvrant des perspectives pour le diagnostic voire le pronostic de nombreux désordres métaboliques comme le diabète de type 2 (DT2). Toutefois, la question de leur mode de migration dans les tissus reste à ce jour sans réponse et constitue un frein pour parvenir au diagnostic des troubles métaboliques.

L'objectif premier de cette thèse naît ainsi de la nécessité **d'isoler les ASCs à partir d'échantillons biologiques complexes, en particulier le sang.**

A ce jour, les méthodes utilisées en clinique lors des opérations ou bien dans les laboratoires de recherche pour isoler ces cellules ne sont pas satisfaisantes car elles sont incapables de démontrer la présence des ASCs dans le sang. De plus, elles impliquent l'utilisation de produits qui impactent les propriétés fonctionnelles et la viabilité des cellules. La microfluidique constitue une alternative prometteuse à ces méthodes.

Afin de répondre à la question de la présence des ASCs dans le sang, ces travaux de thèse s'orientent autour du **développement d'un laboratoire sur puce capable d'isoler, sans les endommager, les cellules souches adipeuses à partir d'échantillons biologiques complexes, en particulier le sang.**

La littérature ne fait état d'aucune étude sur les ASCs en microfluidique mais présente un grand nombre de technologies microfluidiques qui permettent d'identifier, de déplacer, de suivre, de piéger, d'isoler, en bref, de manipuler des cellules présentes en abondance ou au contraire en très faible quantité (cellules rares) dans des milieux complexes. Méthodes passives, actives, avec ou sans marquage immunologique sont proposées. Nous souhaitons privilégier les méthodes passives qui conduisent à des dispositifs en général plus simples d'utilisation et moins coûteux. Bien que réduisant le nombre de possibilités, la restriction à l'utilisation de méthodes passives, avec ou sans marquage immunologique, laisse encore un large choix.

Nous nous sommes alors intéressés aux propriétés intrinsèques des ASCs pour déterminer la meilleure stratégie de tri à adopter. Nos connaissances sur ces propriétés se sont tout d'abord limitées à la certitude que les ASCs ne possèdent pas de marqueur membranaire spécifique et à l'hypothèse d'un diamètre compris entre 30 et 40 μm .



La détermination du diamètre des ASCs a été un élément capital dans le choix de notre stratégie. L'analyse FACS que nous avons réalisée a montré que les ASCs ont un diamètre compris entre 10 et 25 μm et se distinguent ainsi de certains types cellulaires mais pas de tous.

Au vu des propriétés de ces cellules, il nous est donc apparu impossible de faire le choix d'une seule méthode de tri pour isoler les ASCs : **la combinaison de plusieurs critères est indispensable** pour y parvenir. Par ailleurs, nous avons réalisé que nous ne pourrions pas les cibler spécifiquement pour les isoler. Nous avons alors choisi de procéder à l'isolement par déplétion de tous les objets cellulaires autres que les ASCs.

Notre stratégie d'isolement des ASCs se base donc sur un module en deux étapes qui se succèdent et se complètent, basé sur deux propriétés intrinsèques différentes :

ÉTAPE 1

Élimination des cellules de diamètre inférieur à 10 μm . Les ASCs se distinguent nettement, par leur diamètre, des globules rouges, des plaquettes et de la plupart des lymphocytes. Ce module a pour objectif d'éliminer plus de 99 % des cellules sanguines et de donner accès à un échantillon où il ne resterait que les ASCs ainsi que les leucocytes les plus grands. Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser une méthode de filtration hydrodynamique.

ÉTAPE 2

Élimination des cellules hématopoïétiques. L'objectif de ce module est de parfaire l'isolement des ASCs en retirant du milieu, par l'intermédiaire d'interactions antigène/anticorps, les cellules hématopoïétiques qui n'ont pu être filtrées par le premier module. Pour ce faire, nous avons choisi de privilégier une méthode de *cell rolling* qui permet de travailler en flux continu.

Chapitre II

Introduction au module de filtration hydrodynamique



Pour de nombreuses applications aussi bien industrielles que biomédicales, la séparation de cellules ou de particules selon le critère de taille constitue la technique la plus répandue. Comme détaillé dans le précédent chapitre, la séparation par taille peut être réalisée de diverses façons. Parmi les méthodes décrites, la filtration est la technique la plus fréquemment employée et la plus diversifiée : filtration à travers des pores, filtration à piliers, filtration hydrodynamique, etc.

Ce chapitre est tout d'abord consacré à la présentation de la méthode sélectionnée pour isoler les cellules d'intérêt : la filtration hydrodynamique. Ce chapitre présentera ensuite les outils d'observation indispensables à la caractérisation et à la validation de nos puces microfluidiques. S'ensuivra le détail du procédé de fabrication permettant de concevoir les dispositifs adaptés. Enfin, ce chapitre se clôturera par la présentation des échantillons utilisés tout au long de cette étude.

II.1 Prétraitement de l'échantillon par filtration hydrodynamique

II.1.1 Théorie et principe

Un dispositif adapté à la filtration hydrodynamique, méthode introduite par Yamada et Seki en 2005⁶², comprend un canal principal auquel sont connectés plusieurs canaux latéraux. Un schéma d'une portion de ce dispositif est représenté en Figure II- 1.

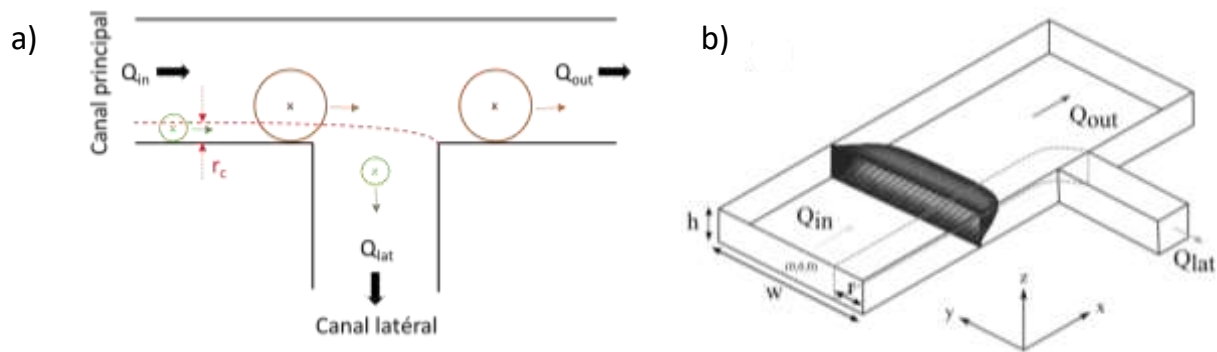


Figure II- 1 : Principe de filtration – a) Représentation d'une portion du dispositif : les particules vertes dont le rayon est inférieur au rayon de coupure sont filtrées dans les canaux latéraux tandis que les grosses particules dont le rayon est supérieur au rayon de coupure continuent dans le canal principal – b) Modélisation du profil de vitesse de l'écoulement⁷⁴

Le fluide est injecté dans le canal principal avec un débit Q_{in} et se divise entre le canal latéral et le reste du canal principal où il s'écoule avec les débits respectifs Q_{lat} et Q_{out} . Le flux étant laminaire, l'ensemble des lignes de courant qui constituent la portion de fluide s'écoulant dans le canal latéral délimite une « surface séparatrice ». Cette dernière est schématisée en pointillés rouges sur la Figure II- 1- a. La distance entre la surface séparatrice et la paroi du

canal principal correspond à un rayon critique (noté r_c en Figure II- 1- a). Toutes les particules dont le centre d'inertie est situé entre la paroi du canal principal et la surface séparatrice sont aspirées dans le canal latéral (particules vertes en Figure II- 1- a) tandis que les autres particules continuent leur progression dans le canal principal (particules marrons en Figure II- 1- a).

Un modèle analytique précis, adapté à nos géométries, a été introduit dans le cadre de travaux antérieurs. Cette partie présente ce modèle ainsi que les équations mises en jeu. Ces dernières permettront de définir avec précision les dimensions à respecter pour parvenir à obtenir un dispositif capable de filtrer les échantillons sanguins et de retirer les éléments de diamètre inférieur à $10\ \mu\text{m}$.

Ce modèle fait intervenir les hypothèses suivantes :

- Écoulement stationnaire, régime permanent
- Liquide Newtonien incompressible
- Régime à faibles vitesses
- Vitesse aux parois nulle

Suivant ces hypothèses et dans le cas d'un écoulement de Poiseuille dans des canaux rectangulaires, l'expression du profil de vitesse peut être déduite (Équation (II- 1)). Les calculs permettant d'obtenir cette expression sont détaillés dans les travaux de thèse de Marc Fouet⁷⁴.

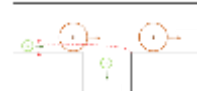
$$v_x(y, z) = \frac{4h^2 \Delta P}{\pi^3 \mu L} \sum_{n=\text{imp}}^{\infty} \frac{1}{n^3} \left[1 - \frac{\cosh\left(\frac{n\pi y}{h}\right)}{\cosh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right)} \right] \sin\left(\frac{n\pi z}{h}\right) \quad (\text{II- 1})$$

Où ΔP correspond à la différence de pression appliquée, μ à la viscosité dynamique, w , h et L correspondent respectivement à la largeur, la hauteur et la longueur du canal considéré et « imp » indique une somme sur les impairs.

L'expression du débit peut alors être déduite en intégrant l'expression du profil de vitesse. Deux cas de figure sont à prendre en considération : le débit dans le canal principal et le débit dans le canal latéral.

Expression du débit dans le canal principal.

Dans le canal principal, l'expression du débit est déterminée en intégrant l'expression de la vitesse sur la section droite du canal (Équation (II- 2)).



$$Q = \int_{y=-\frac{w}{2}}^{\frac{w}{2}} \int_{z=0}^h v_x(y, z) dy dz \quad (\text{II- 2})$$

L'expression du débit dans le canal principal devient alors (Équation (II- 3)) :

$$Q = \frac{h^3 w \Delta P}{12 \mu L_{in}} \left[1 - \sum_{n=imp}^{\infty} \frac{1}{n^5} \frac{192 h}{\pi^5 w} \tanh\left(\frac{n \pi w}{2 h}\right) \right] \quad (\text{II- 3})$$

En utilisant l'analogie entre les phénomènes électriques et les écoulements des fluides, il est possible de déterminer l'expression de la résistance hydrodynamique du canal principal. Ainsi, la loi $\Delta P = Q \cdot R$ (équivalente à $\Delta U = I \cdot R$) permet de parvenir à l'Équation (II- 4).

$$R = \frac{12 \mu L}{h^3 w} \left[1 - \sum_{n=imp}^{\infty} \frac{1}{n^5} \frac{192 h}{\pi^5 w} \tanh\left(\frac{n \pi w}{2 h}\right) \right]^{-1} \quad (\text{II- 4})$$

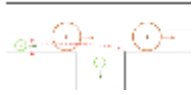
Expression du débit dans le canal latéral.

Dans le canal latéral, la portion de fluide entrante est équivalente à la portion de fluide comprise entre la paroi ($y = -\frac{w}{2}$) et la ligne séparatrice ($y = -\frac{w}{2} + r$). L'intégration de la vitesse entre la paroi et la séparatrice (Équation (II- 5)) permet d'accéder à l'expression du débit dans les canaux latéraux.

$$\int_{y=-\frac{w}{2}}^{-\frac{w}{2}+r} \int_{z=0}^h v_x(y, z) dy dz \quad (\text{II- 5})$$

L'expression du débit dans le canal latéral peut donc être écrite en fonction du rayon critique. Son expression devient (Équation (II- 6)) :

$$Q(r) = \frac{h^3 w \Delta P}{24 \mu L} \frac{r}{w} \left[1 - \sum_{n=imp}^{\infty} \frac{96}{(n \pi)^5} \frac{h}{r} \left[\tanh\left(\frac{n \pi w}{2 h}\right) \left(1 - \cosh\left(\frac{n \pi r}{h}\right)\right) + \sinh\left(\frac{n \pi r}{h}\right) \right] \right] \quad (\text{II- 6})$$



Introduction de l'efficacité.

L'efficacité correspond au rapport du débit dans le canal latéral et du débit dans le canal principal. L'expression de l'efficacité est :

$$Q^*(r) = \frac{r}{2w} \frac{1 - \sum_{n=imp}^{\infty} \frac{96}{(n\pi)^5} \frac{h}{r} \left[\tanh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right) \left(1 - \cosh\left(\frac{n\pi r}{h}\right)\right) + \sinh\left(\frac{n\pi r}{h}\right) \right]}{1 - \sum_{n=imp}^{\infty} \frac{1}{n^5} \frac{192h}{\pi^5 w} \tanh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right)} \quad (II- 7)$$

Dans le cas d'une canalisation rectangulaire de faible rapport d'aspect, le profil de vitesse peut être considéré comme parabolique :

$$v_{para} = \frac{\Delta P}{3\mu L} w^2 \left[1 - \left(\frac{2y}{w} \right)^2 \right] \quad (II- 8)$$

De la même manière que précédemment, l'intégration du profil de vitesse sur la section droite du canal principal mène à l'expression du débit dans ce même canal. L'intégration du profil de vitesse sur la section aspirée par le canal latéral mène quant à elle à l'expression du débit dans le canal latéral. Le ratio des deux mène alors à l'expression de l'efficacité (Équation (II- 9)) :

$$Q^*_{para} = \left(\frac{r}{w} \right)^2 \left(3 - \left(\frac{2r}{w} \right) \right) \quad (II- 9)$$

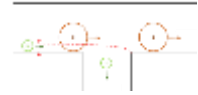
Il apparait ainsi que Q^*_{para} ne dépend que du rayon critique et de la largeur de la canalisation principale. Fixer un rayon critique revient alors à fixer Q^*_{para} .

II.1.2 Dimensionner des puces microfluidiques

Afin de dimensionner les dispositifs de filtration, nous avons choisi de travailler à partir de l'expression simplifiée de l'efficacité Q^*_{para} indiquée en Équation (II- 9), la différence avec le modèle exact étant négligeable.

Le processus de dimensionnement débute par le choix d'un rayon de coupure r et des paramètres suivants :

- La hauteur et la largeur des canaux principal et latéraux
- Le nombre de canalisations latérales
- La distance centre à centre entre les canaux latéraux
- La longueur du canal principal



Une fois ces paramètres fixés, le dimensionnement des puces se poursuit par le calcul des longueurs des canalisations latérales. En effet, la hauteur et la longueur étant fixées, c'est la longueur qui permet d'adapter la résistance hydrodynamique des canalisations latérales et ainsi de respecter le rayon critique choisi. Pour réaliser la démonstration du calcul, nous nous focaliserons sur une intersection entre le canal principal et un canal latéral (illustration en Figure II- 2).

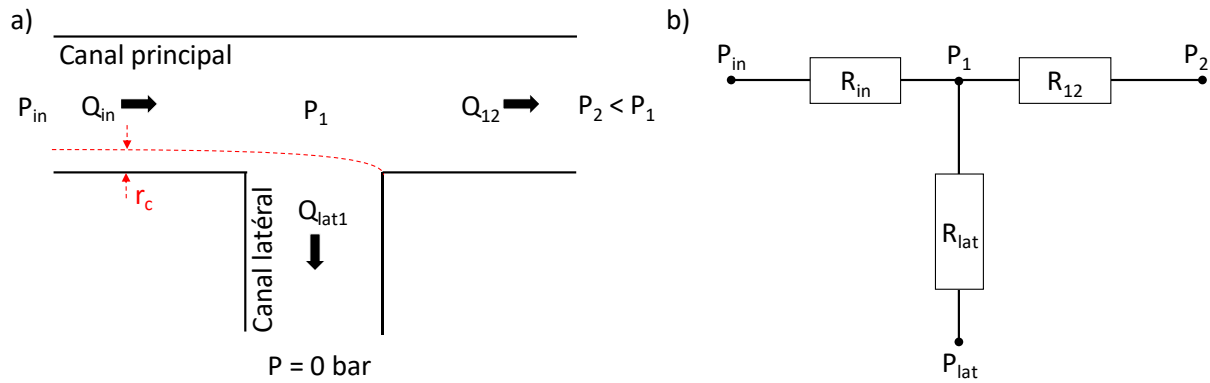


Figure II- 2 : a) Intersection simple où l'échantillon, injecté à une pression P_{in} , ressort en sortie latérale à un débit Q_{lat} et en sortie principale à un débit Q_{12} – b) Schéma électrique équivalent de l'intersection

Pour commencer, le fait de fixer le rayon critique permet de fixer la valeur de Q^*_{para} . Ce faisant, il est possible d'accéder aux valeurs des pressions, débits et résistances hydrodynamiques en tout point du dispositif.

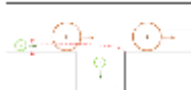
Il est tout d'abord aisé d'accéder à la valeur du débit dans le canal principal. En effet, l'approximation présentée en Équation (II- 10) peut être faite donnant ainsi accès à la valeur de la résistance R_{in} .

$$R_{in} = \frac{12\mu L_{in}}{wh^3(1 - 0,63 \frac{h}{w})} \quad (II- 10)$$

Le débit étant proportionnellement lié à la différence de pression par la relation $\Delta P = Q^*R$ (analogie entre un circuit électrique et un fluide en mouvement), il est possible de déterminer la valeur du débit d'entrée Q_{in} . Cette relation donne également accès à la valeur de la pression à l'intersection des canaux, notée P_1 en Figure II- 2- a. Le débit dans le canal latéral peut alors être déduit grâce à l'Équation (II- 11).

$$Q^*_{para} = \frac{Q_{lat}}{Q_{in}} \quad (II- 11)$$

De même que précédemment, il est possible d'accéder à la valeur de la résistance hydrodynamique du canal latéral par la relation $P_1 - P_{lat} = Q_{lat} * R_{lat}$. P_{lat} étant égale à la



pression atmosphérique, la relation se simplifie et devient $P_1 = Q_{lat} * R_{lat}$. La valeur de la longueur du canal latéral est alors déduite de l'Équation (II- 12), adaptée de l'Équation (II- 10).

$$L_{lat} = \frac{wh^3(1 - 0,63 \frac{h}{w})}{12\mu R_H} \quad (II- 12)$$

Cette démarche peut être généralisée à plusieurs canaux latéraux. La loi de conservation de la matière écrite à chaque embranchement $Q_i = Q_{lat,i} + Q_{i+1}$ permet d'obtenir l'expression générale du débit d'entrée (dans le canal principal) indiquée en Équation (II- 13), avec n correspondant au numéro de l'embranchement considéré.

$$Q_n = Q_{in}(1 - Q_{para}^*)^n \quad (II- 13)$$

Une fois ces deux paramètres (n et Q_{para}^*) définis, il est possible de suivre la démarche précédemment décrite pour calculer la pression à chaque embranchement et en déduire la résistance hydrodynamique et donc la longueur de chaque canalisation latérale.

L'étape suivant le dimensionnement des canaux microfluidiques consiste en la fabrication des puces microfluidiques. La partie suivante a ainsi pour objectif de présenter le procédé de fabrication des puces.

II.2 Microfabrication des dispositifs

Avant de développer le procédé de fabrication, nous présenterons les outils à disposition et qui imposent certaines contraintes pour le dimensionnement des puces. Ces contraintes ont à leur tour imposé certains choix techniques qui seront intégrés dans le procédé de fabrication final des puces microfluidiques.

II.2.1 Contraintes liées aux outils d'observation

Dans de nombreuses applications en microfluidique, l'utilisation de la fluorescence permet, entre autres, la détection de phénomènes physiques et/ou biologiques, le tri cellulaire et la caractérisation des dispositifs. L'avantage d'utiliser la fluorescence est qu'elle permet de visualiser des objets qui, observés en lumière blanche, ne peuvent être distingués et ce, par manque de contraste. Elle est ainsi très utile pour l'observation de cellules biologiques qui sont pour la plupart transparentes : seuls les globules rouges sont opaques du fait de la présence d'hémoglobine.



La visualisation des expériences en fluorescence nécessite une microscopie et des outils adaptés. Les expériences menées ont ainsi impliqué l'utilisation d'un microscope inversé (Zeiss) équipé de plusieurs jeux de filtres (sous forme de cubes) qui sont adaptés aux fluorochromes utilisés. Les cubes sont composés de trois éléments : deux filtres (excitation et émission) et un miroir dichroïque. Le filtre d'excitation permet la sélection des radiations absorbées par le fluorochrome tandis que le filtre d'émission ne laisse passer par transmission que les radiations émises par l'objet. Le miroir dichroïque réfléchit vers l'échantillon les radiations que ce dernier peut absorber et ne laisse passer par transmission (vers la caméra ou l'oculaire) que les radiations émises par l'échantillon. Il est possible de rencontrer des cubes qui permettent des observations multicolores rendant possible la visualisation simultanée de plusieurs fluorophores.

Pour nos expériences, nous avons utilisé le microscope inversé en association avec une source froide (LED) de lumière (Andor Lumencor) et une caméra Andor (sCMOS) elle-même connectée à un ordinateur pour la visualisation et le traitement d'images. En plus de cela, un générateur de pression (Fluigent MFCS EZ) a permis l'injection des divers échantillons. Le schéma du montage final est présenté en Figure II- 3.

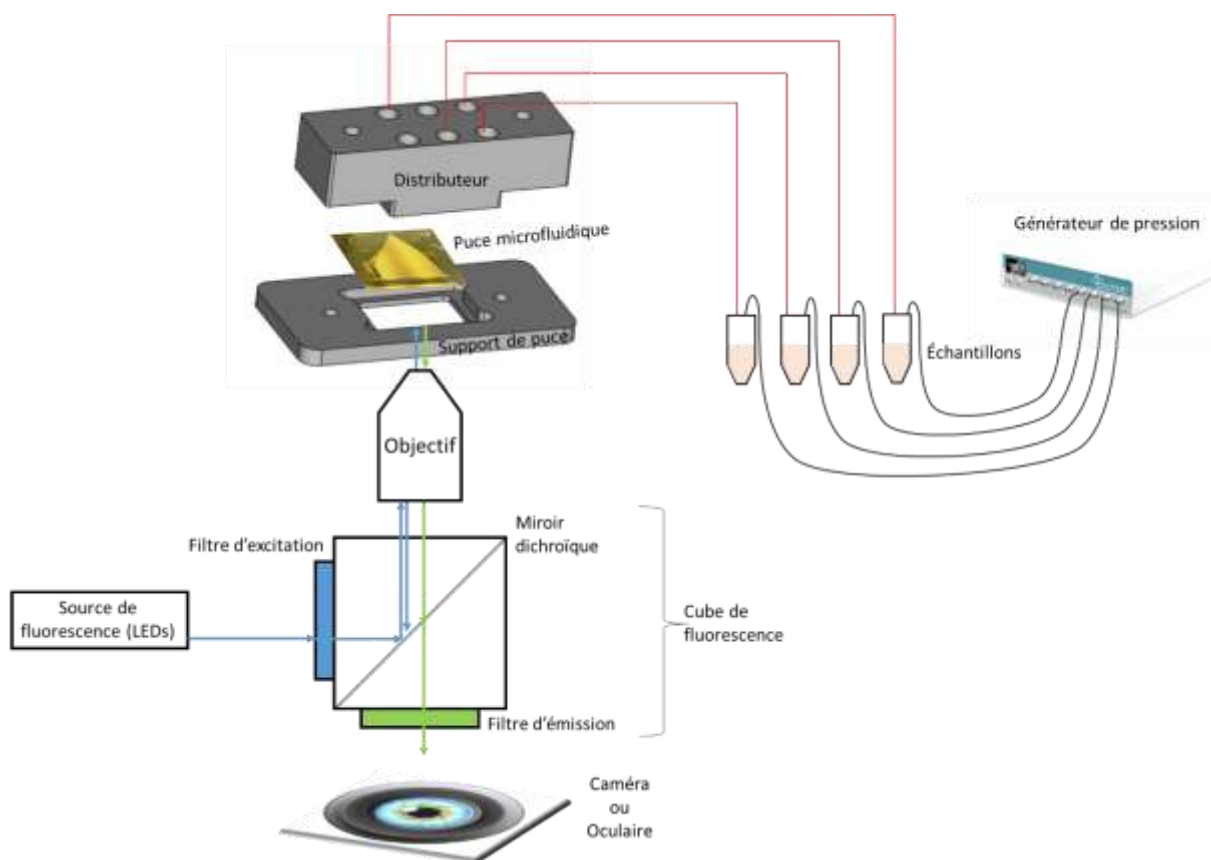


Figure II- 3 : Dispositif final permettant l'observation en lumière blanche ou en lumière fluorescente des puces microfluidiques

Les puces sont placées sur un support de puce constitué d'un support métallique et d'un distributeur représenté en Figure II- 4. Ce distributeur est notamment constitué de six ouvertures fluidiques qui rendent possible l'injection des fluides dans les puces. Afin d'éviter les fuites, six joints accompagnent les entrées fluidiques.

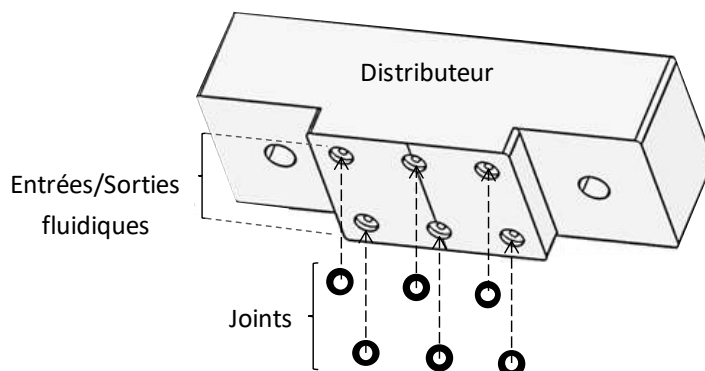


Figure II- 4 : Schématisation du distributeur comprenant 6 ouvertures fluidiques et les joints permettant de conserver l'étanchéité du système

La partie suivante présente les développements technologiques réalisés pour fabriquer des puces microfluidiques fiables et reproductibles.

II.2.2 Fabrication des dispositifs microfluidiques par laminages successifs de films secs de résine

Un procédé de fabrication de puces microfluidiques a retenu l'attention des chercheurs du LAAS : le laminage successif de couches de films secs. Du fait des avantages que ce procédé confère : gain de temps de fabrication, coût de réalisation plus faible qu'avec des procédés impliquant les résines classiques (par exemple SU-8), etc., nous l'avons choisi pour réaliser nos dispositifs.

Le choix du substrat est également essentiel pour le développement du procédé. Dans notre cas, le substrat utilisé est un wafer de verre AF-32 de 4'' fourni par la société Schott. Le choix du verre s'est imposé de par la nécessité d'observer les expériences avec un microscope optique.

Le LAAS disposant d'une forte expertise dans la fabrication de puces microfluidiques par laminage de films secs de résine^{70,74,75}, nous avons fait le choix de fabriquer nos puces microfluidiques par laminage de films secs de résine époxy négative DF-10XX, issus du commerce (société EMS). Plusieurs épaisseurs de films sont disponibles : 5 μm (DF-1005), 20 μm (DF-1020), 25 μm (DF-1025), 50 μm (DF-1050) et 100 μm (DF-10100).

Les premiers dispositifs ont été développés et fabriqués selon le procédé détaillé dans le Tableau II- 1 et schématisé en Figure II- 5.

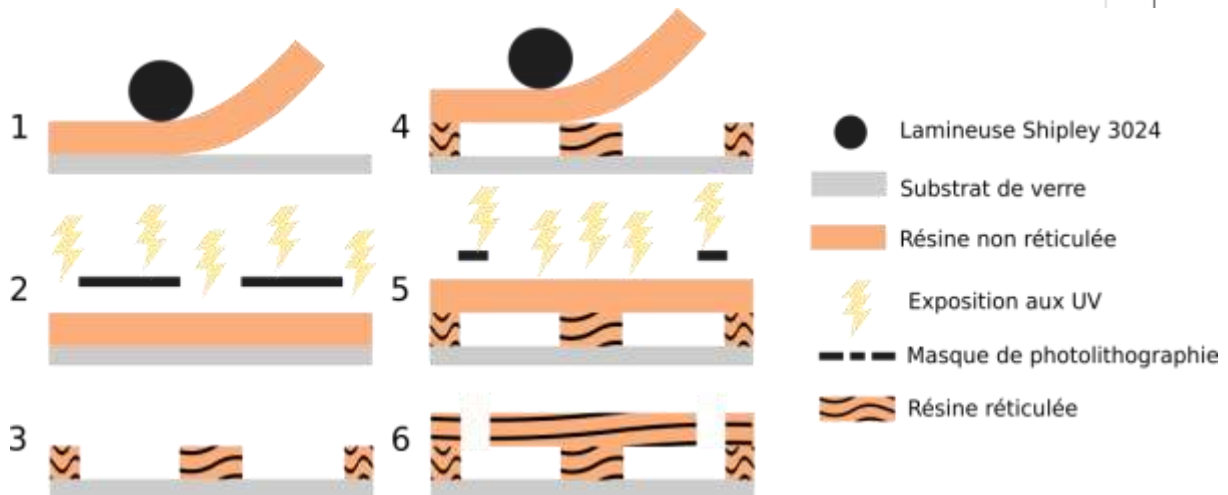
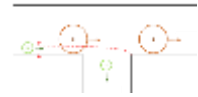


Figure II- 5 : Schéma rassemblant les étapes du procédé de fabrication des puces par laminages successifs de films secs de résine sur un substrat en verre

Les canaux microfluidiques sont entièrement réalisés avec les films secs DF-1005 et DF-1020. Une première couche de DF-1005 est laminée à chaud (lamineuse Shipley 3024) sur un substrat en verre (Schott AF-32, 4'', 500 μm d'épaisseur) préalablement activé par un plasma O_2 afin de faciliter l'accroche entre la résine et le substrat (Tableau II- 1 – étapes 1 et 2 ; Figure II- 5 – étape 1). La résine est ensuite totalement insolée puis recuite : le premier niveau, dit « pleine plaque » et sans motif, est alors créé. Avant laminage d'un autre niveau de DF, un traitement plasma O_2 est réalisé. Ce dernier a pour rôle d'activer la première couche de résine présente sur le substrat et de permettre l'adhérence entre les deux couches de résine. Les couches suivantes, dans lesquelles doivent être imprimés les canaux microfluidiques, sont laminées puis traitées par photolithographie (Tableau II- 1 – étapes 3 à 6 ; Figure II- 5 – étapes 2 et 3). Les alignements et insolations sont effectués sur une machine d'alignement (SUSS MicroTec MA6). Les temps d'insolation, de recuit (ou PEB pour *Post Exposure Bake*) et de développement dépendent des épaisseurs de résine traitées ainsi que des dimensions des motifs. Pour rappel, dans le cas des films secs DF-10XX, les zones insolées réticulent, à l'inverse des zones non insolées qui sont dissoutes dans le développeur, faisant apparaître les canaux microfluidiques. Une fois les canaux microfluidiques créés, il ne reste plus qu'à fermer la structure et faire apparaître les entrées et sorties microfluidiques. Pour ce faire, le wafer sur lequel les motifs microfluidiques ont été réalisés est activé par un plasma O_2 avant d'être clos par laminage d'une ultime couche de résine (Tableau II- 1 – étapes 7 à 9 ; Figure II- 5 – étapes 4 à 6). Viennent ensuite les étapes de photolithographie : alignement, insolation, recuit et développement, adaptés à l'épaisseur de résine utilisée. Ces étapes mènent à l'apparition des ouvertures fluidiques. Une fois le procédé de fabrication terminé, le wafer de 4'', pouvant contenir jusqu'à 18 puces, est découpé par une scie à lame diamantée.

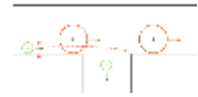


Niveau	Étape	Paramètres
Couche pleine plaque	1	Nettoyage substrat verre : Bain $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ (5 min) suivi par un Plasma O_2 , 800 W, 5 min
	2	Dépôt de résine : Laminage de film DF-1005, 2,5 bars, $T = 100^\circ\text{C}$, $v = 0,5 \text{ m/min}$
	3	Photolithographie : ○ Insolation MA-6, 20 mW/cm^2, hard contact, 8,8 s ○ PEB 3 min, 100°C (plaque chauffante)
Montage de la fluidique	4	Fonctionnalisation de surface : Plasma O_2 , 200 W, 2 min
	5	Dépôt de résine : 2 laminages de film DF-1020, 2,5 bars, $T = 100^\circ\text{C}$, $v = 0,5 \text{ m/min}$
	6	Photolithographie : ○ Insolation MA-6, 20 mW/cm^2, hard contact, 13,2 s ○ PEB, 5 min 30 s, 100°C ○ Développement Cyclohexanone 7 min et rinçage à l'isopropanol (IPA)
Capotage avec DF	7	Fonctionnalisation de surface : Plasma O_2 , 200 W, 2 min
	8	Dépôt de résine : Laminage à 45° (pour éviter l'effondrement de la résine dans les canaux) film DF-1020, 2 bars, $T = 65^\circ\text{C}$, $v = 1 \text{ m/min}$
	9	Photolithographie : ○ Insolation MA-6, 20 mW/cm^2, hard contact, 12 s ○ Recuit avec rampe de température, palier à 100°C, 6 min ○ Développement dans un bain de Cyclohexanone, 7 min, et rinçage à l'IPA

Tableau II- 1 : Détail des différentes étapes du procédé de fabrication des puces par laminages successifs de films secs de résine sur un substrat en verre

Parmi les étapes détaillées précédemment, certaines comportent des risques. Nous nous attarderons sur le fluage de la résine qui conduit à « l'effondrement » de la structure, surtout dans les canaux microfluidiques les plus larges, ce qui est schématisé en Figure II- 6- a et imagé en Figure II- 6- b. Ce phénomène a été rencontré à de nombreuses reprises lors de la fabrication des puces et a constitué un défi technique. Le fluage peut apparaître à certaines étapes du procédé et en particulier lors du laminage ou du recuit (PEB).

Dans le cas du laminage, plusieurs paramètres interviennent et sont susceptibles d'influer sur le comportement d'une résine non réticulée et pouvant facilement être modélisée : température des rouleaux, pression appliquée et vitesse de laminage. Lors de la mise en température, la résine non insolée est rendue moins visqueuse, ce qui lui permet de « couler »



et créer un effondrement dans les canaux. A cela peuvent s'ajouter une pression non adaptée qui « imprimerait » la résine visqueuse dans les canaux (à l'image d'un *hot embossing*) ainsi qu'une vitesse de rouleau non adaptée qui accentuerait les inconvénients causés par les deux autres paramètres. L'adaptation des conditions de laminage est ainsi capitale pour continuer le procédé et atteindre les étapes de fabrication suivantes.

Lors du PEB, celui-ci intervenant après insolation, la température et le temps de recuit influent sur le comportement de la résine insolée (réticulée) mais également sur le comportement de la résine non insolée (non réticulée). Les travaux précédents⁷⁴ ont permis de pallier les problèmes liés au fluage de la résine non insolée (qui créait des bouchons dans les canaux fluidiques) en insérant des piliers de soutien (Figure II- 6- b). Cette solution se limite toutefois aux entrées et sorties fluidiques : intégrer des piliers dans les structures fluidiques pourrait modifier la résistance hydraulique de notre canalisation, ce qui n'est pas souhaitable. Nous avons ainsi cherché à optimiser les paramètres de capotage pour obtenir des structures fonctionnelles (sans effondrement) et ce, quelles que soient les dimensions des canaux.

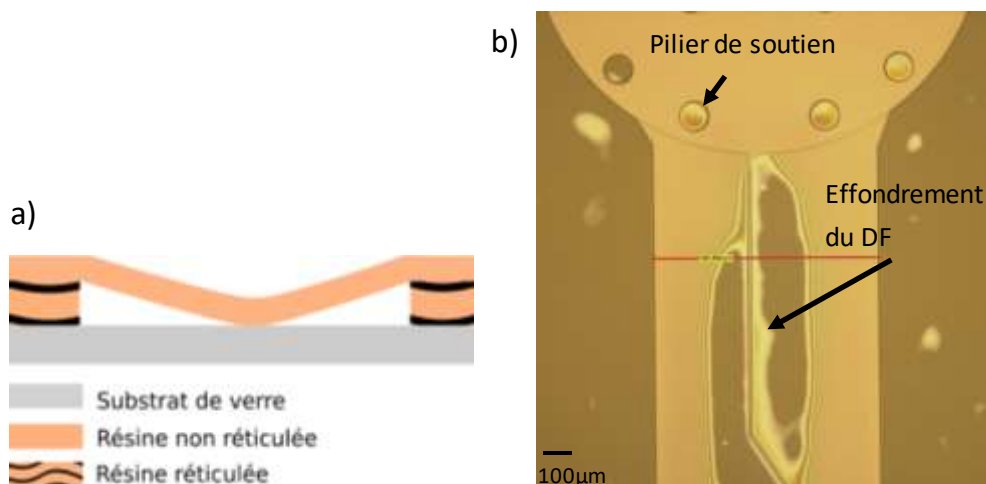


Figure II- 6 : Effondrement du capot réalisé en film sec – a) Schéma de l'effondrement du film sec dans le canal microfluidique – b) Image au microscope optique de l'effondrement du capot en film sec d'épaisseur 20 µm dans un canal microfluidique de hauteur égale à 5 µm et largeur égale à 400 µm

Plusieurs essais ont été réalisés pour éviter l'effondrement de la résine et plusieurs paramètres ont été modifiés : température des rouleaux, vitesse de laminage, pression exercée lors du laminage, rampe de température et changement d'épaisseur des films secs (5 µm, 20 µm et 50 µm).

Les premiers essais ont porté sur le laminage de films secs d'épaisseur 20 µm. La pression des rouleaux a ainsi été réduite de 100 °C jusqu'à 60 °C et la vitesse de laminage a été augmentée jusqu'à 2 m/min. Ces changements ont eu pour but de réduire le temps de chauffe de la résine qui, de ce fait, a moins de temps pour monter en température et donc moins de temps pour

devenir visqueuse et se déformer. Il s'est avéré que la résine se déforme déjà lors de cette étape mais ne s'effondre pas. L'effondrement a lieu au cours d'une des étapes suivantes. Cette modification de paramètre est donc insuffisante. Les tests ont alors porté sur les temps et températures de recuit. Suite à l'insolation, les wafers ont été recuits soit sur une plaque chauffante à température fixe soit sur une plaque chauffante à température variable et programmable. L'objectif de cette étape est alors de faire réticuler la résine sans la rendre trop visqueuse. Le recuit jusqu'alors effectué était effectué sur plaque chauffante à température fixée à 100 °C. Ce recuit est plus brutal qu'un recuit avec une rampe de température : dans le premier cas, la résine devient visqueuse plus vite qu'elle ne réticule. Pour pallier ce problème, nous avons appliqué une rampe de température. La température a initialement été imposée à 65 °C puis augmentée (par pas de 10 °C/min) jusqu'à la température pallier de 100 °C avant d'être réduite jusqu'à 25 °C (par pas de 5 °C/min). Malgré la rampe de température, il s'est avéré que la résine s'effondre dans les canaux microfluidiques.

Les essais ont enfin porté sur l'utilisation de résines de différente épaisseur pour réaliser le capot : 5 µm, 20 µm et 50 µm. Ce changement d'épaisseur permet de jouer sur la rigidité de cette dernière couche de résine. Nous avons ainsi joué sur les mêmes paramètres que ceux évoqués auparavant (pression des rouleaux, température de recuit, etc.). Il est alors apparu que, quels qu'aient été les paramètres appliqués, rien n'a permis d'empêcher l'effondrement de la résine dans les canaux microfluidiques les plus larges.

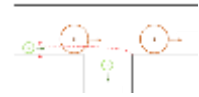
Afin de contourner cette difficulté, nous avons développé une autre méthode.

Cette nouvelle méthode consiste en un capotage de la structure avec un deuxième substrat en verre sur lequel une couche de résine a été laminée. Le wafer final comprend les structures fluidiques réalisées en résine prises en sandwich entre les deux wafers de verre. Le tout est scellé dans une machine initialement destinée à la nano impression (la Nanonex) et qui permet à la fois, d'appliquer une pression, une température et d'insoler.

Le fait d'utiliser un deuxième wafer en verre pour le scellement définitif des structures implique une étape supplémentaire et indispensable : la création des entrées et sorties fluidiques dans un capot en verre pour permettre l'injection et la récupération des différents échantillons.

II.2.3 Optimisation du procédé de fabrication : fermeture des structures fluidiques par un capot en verre

La première option qui s'offrait à nous était de réaliser le perçage du wafer avec une sableuse. Cette méthode nécessite une protection préalable du wafer pour éviter que les grains de sable n'endommagent le verre. Un film sec de résine photosensible PH-2040 (Photec PH-2000



Series) est laminé sur les deux faces d'un substrat en verre (Schott, 4'', 500 μm d'épaisseur). L'une des deux faces est ensuite insolée à travers un masque de photolithographie, ce qui permet d'imprimer les motifs des ouvertures fluidiques dans la résine. Une fois les motifs imprimés, le wafer est percé à la sableuse (hors de la salle blanche) puis nettoyé en salle blanche (retrait de la résine PH-2040 dans un bain d'acétone et nettoyage dans un bain contenant le mélange $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$) avant d'être caractérisé au microscope optique.

Les résultats, tant au niveau des dimensions que de l'aspect du wafer, correspondent à nos attentes. Les surfaces sont nettes (avec peu d'impacts) et le contour des trous présente peu d'éclats de verre (Figure II- 7- a). De plus, taille de buse (0,46 mm), pression (2 bars) et temps de sablage (3 secondes) ont été adaptés pour obtenir le diamètre souhaité, soit 800 μm .

Le sablage présente toutefois certaines limites. Tout d'abord, il conduit à l'obtention d'un trou conique et non pas cylindrique. Le diamètre du trou en face avant (première face en contact avec le sable) est de 730 μm alors que le trou en face arrière (sortie de sable) est de 800 μm (Figure II- 7- a et Figure II- 7- b). De manière générale, nous avons constaté une augmentation inéluctable de 9 % du diamètre, ce qui correspond à un angle de perçage de 4°. Ce paramètre ne représente pas un inconvénient mais il a été pris en compte lors de la fabrication. En effet, la face dont le diamètre est le plus élevé a été toujours orientée vers les joints tandis que l'autre face a toujours été orientée vers la résine. Dans le premier cas, l'étanchéité est conservée ; dans le deuxième cas, cela permet d'éviter que le trou ne soit plus gros que l'entrée fluidique réalisée dans la résine.

L'inconvénient majeur du perçage par sablage est lié au manque de précision sur le positionnement des trous. En effet, le sablage est une méthode manuelle, contrôlée en intégralité par l'utilisateur, ce qui implique que la résolution de positionnement est liée à la résolution de l'œil humain. A cela, s'ajoute la difficulté de voir les trous dans un appareil massif non adapté à une observation minutieuse. Or, pour notre application (en particulier pour la filtration hydrodynamique) nous avons besoin d'une haute précision (résolution maximale de 100 μm) dans le positionnement des ouvertures fluidiques. Cette précision ne peut pas être atteinte par la méthode de sablage, ce qui conduit généralement à l'obtention de dispositifs inutilisables du fait d'un mauvais positionnement des ouvertures fluidiques (Figure II- 7- c et Figure II- 7- d).

La précision étant un point essentiel pour obtenir des dispositifs fonctionnels, nous nous sommes tournés vers une autre méthode de perçage de verre : le perçage par laser UV (351 nm) nano seconde, qui a été réalisé à l'IEMN (Institut d'Electronique et de Microélectronique Nanotechnologie). Une fois récupérés, les wafers percés ont été nettoyés en salle blanche (bain d'isopropanol puis nettoyage piranha) avant d'être caractérisés par microscopie optique.

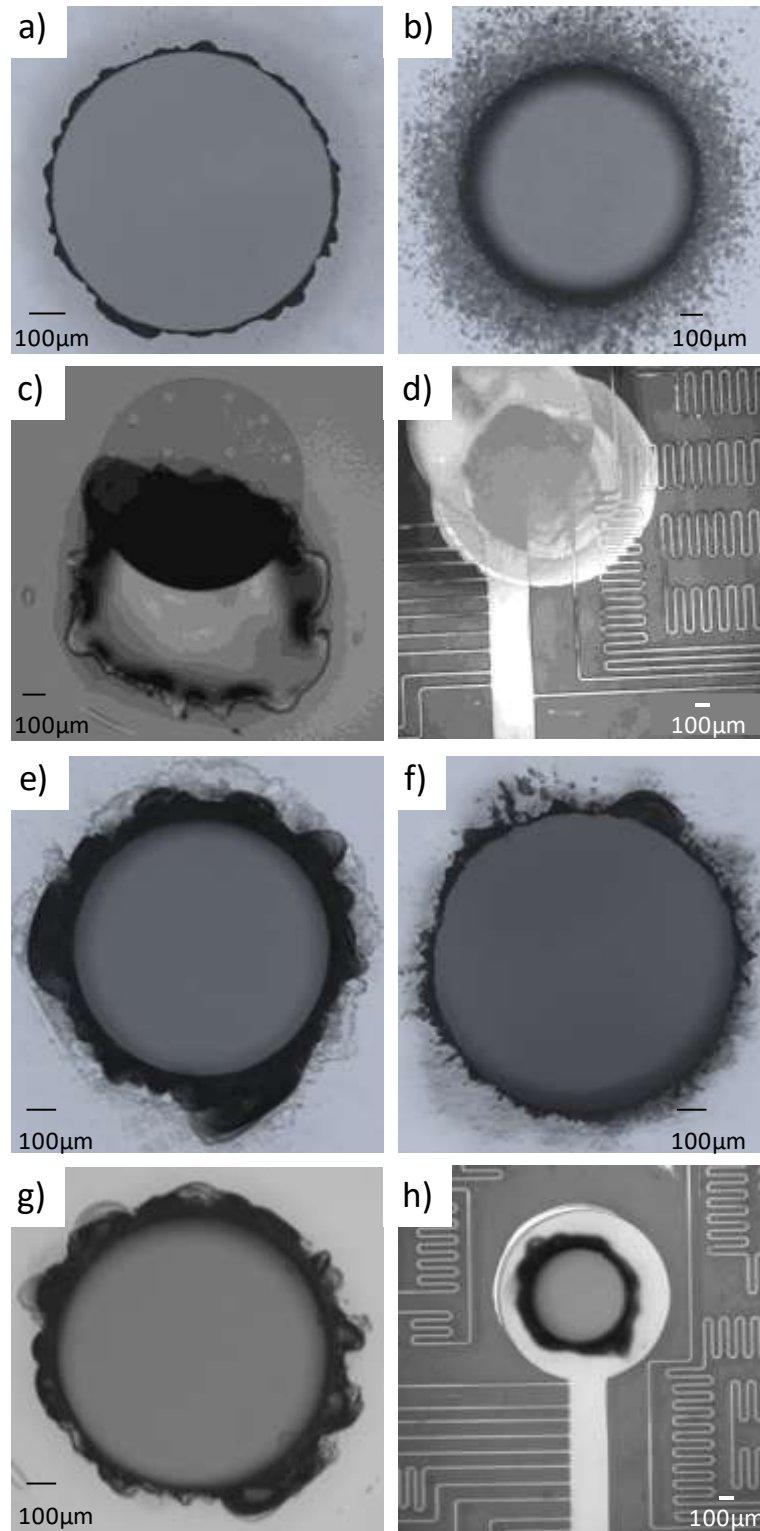
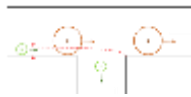


Figure II- 7 : Comparaison des deux méthodes de perçage du verre – a) et b) Perçage à la sableuse : face arrière (a) et face avant (b) – c) et d) Images prises au microscope optique après laminage et exposition aux UV du premier niveau de résine : décalage visible entre le trou réalisé dans le verre et le trou réalisé dans la résine (c) qui rend inutilisable la puce alors fabriquée (d) – e) et f) Perçage au laser UV nano seconde : face arrière (e) et face avant (f) – g) et h) Images prises au microscope optique après laminage et exposition aux UV du premier niveau de résine : parfaite superposition du trou réalisé dans le verre (g) et du trou réalisé dans la résine (h) qui permet d’obtenir des puces viables



A la différence des perçages réalisés au sablage, le contour des trous réalisés au laser nano seconde présente des imperfections aussi bien sur la face avant du wafer, première face atteinte par le laser (Figure II- 7- f) que sur la face arrière (Figure II- 7- e). Ces imperfections, correspondant à des éclats de verre, génèrent par la suite des défauts dans la résine (la résine ne peut adhérer sur les zones d'éclats) qui peuvent engendrer des problèmes lors de l'utilisation du dispositif du fait d'un arrachement de la résine. Cela sera plus amplement détaillé dans le chapitre suivant. Toutefois, les dimensions des trous réalisés correspondent à nos attentes. En effet, nous avons constaté que le diamètre est très proche des 800 μm attendus. Toutefois, il est important de prendre en considération les défauts de contour (éclats de verre) : le diamètre réel du trou peut atteindre dans ce cas les 900 μm . Le fait que le diamètre soit plus important n'a pas représenté un inconvénient mais il a été pris en compte lors de la fabrication. En complément, tout comme les trous obtenus après sablage, les trous obtenus par perçage laser ne sont pas cylindriques mais coniques : l'angle de perçage est d'environ 4°.

Bien que cette méthode présente un certain nombre d'inconvénients, elle présente un atout majeur qui est la précision du positionnement des trous. Grâce à cette méthode, les trous sont positionnés avec une précision de 80 μm , ce qui convient parfaitement pour la réalisation de nos dispositifs (Figure II- 7- g et Figure II- 7- h). Étant donné que la précision de positionnement des ouvertures fluidiques était notre critère essentiel quant au choix d'une méthode de perçage, nous avons donc choisi de faire percer nos wafers au laser UV (351 nm) nano seconde.

Les contraintes et axes d'amélioration évoqués précédemment ont conduit à l'établissement d'un procédé de fabrication fiable et reproductible aussi bien pour les puces dédiées à la filtration hydrodynamique que pour les puces dédiées à l'exclusion immunologique (protocole adapté détaillé au **Chapitre IV**).

II.2.4 Procédé de fabrication final

La difficulté majeure liée à la fabrication des modules pour la filtration hydrodynamique réside dans l'alignement des motifs et plus précisément, dans l'alignement des ouvertures fluidiques : les trous réalisés dans le verre et ceux imprimés dans la résine doivent être alignés (rappel du problème d'alignement en Figure II- 7). Suite à la fabrication de quelques dispositifs défectueux, en raison d'un mauvais alignement des entrées et sorties fluidiques, nous avons choisi de renverser la fabrication, c'est-à-dire de réaliser les canaux sur le wafer percé puis de capoter avec un wafer non percé.

Les étapes du nouveau procédé de fabrication sont schématisées en Figure II- 8- a et détaillées dans le Tableau II- 2. La dernière étape consiste en la découpe du wafer par une scie à lame diamantée. Nous obtenons alors des puces individuelles, comme l'illustre la Figure II- 8- b.

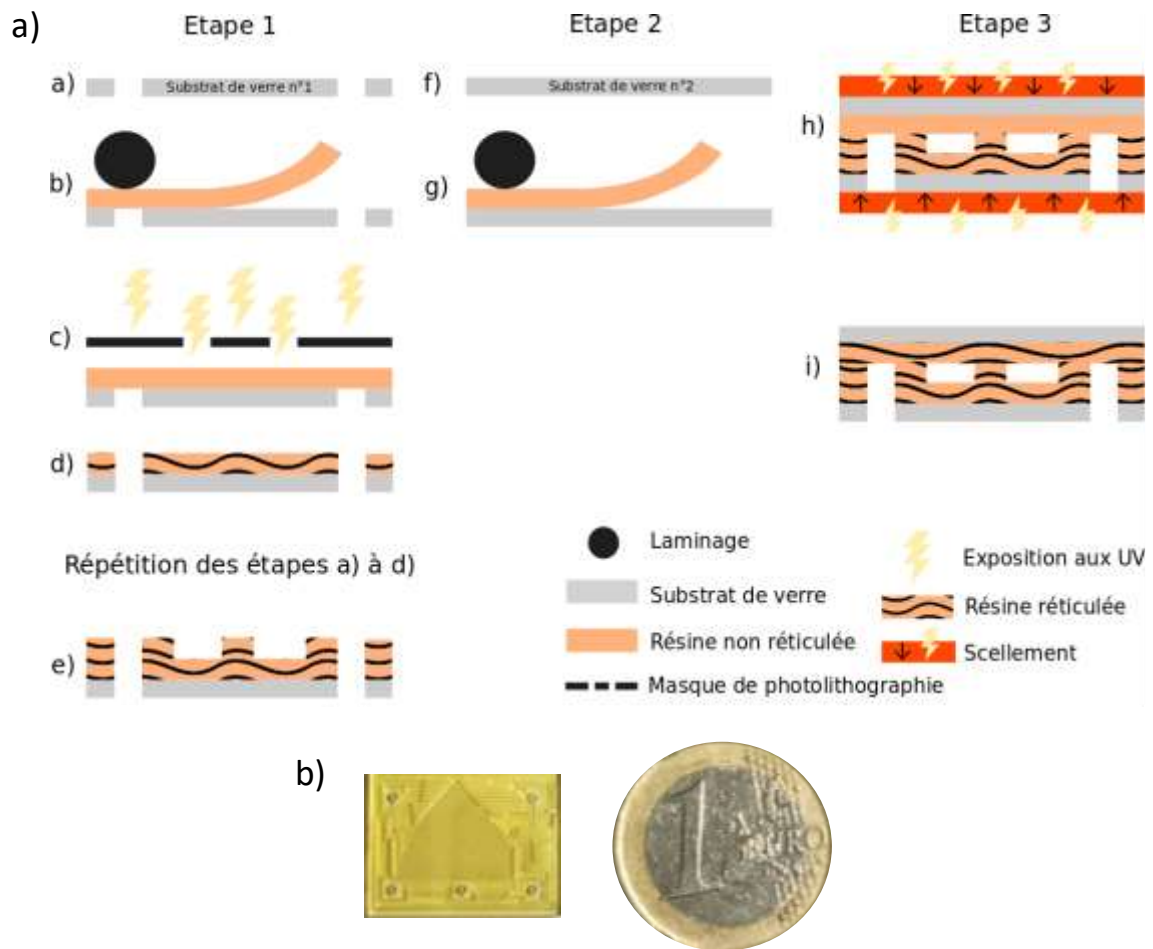
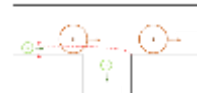


Figure II- 8 : a) Schématisation du procédé de fabrication final en trois étapes – la première étape correspond à la réalisation des canaux microfluidiques sur un wafer en verre AF-32 percé par laser UV nano seconde – la deuxième étape correspond à la préparation du second wafer en verre AF-32 qui sert de capot aux structures fluidiques – la troisième et dernière étape vise au scellement des deux wafers en verre pour constituer les puces finales – b) Image de la puce terminée et comparaison à une pièce de monnaie de 1€



Niveau	Étape	Paramètres
Couche pleine plaque	a	Nettoyage substrat verre percé : Bain $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ (5 min) suivi par un Plasma O_2 , 800 W, 5 min
	b	Dépôt de résine : Laminage de film DF-1005, 2,5 bars, $T = 100^\circ\text{C}$, $v = 0,5 \text{ m/min}$
		Photolithographie :
	c et d	○ Insolation (MA-6), 20 mW/cm^2, hard contact, 8,8 s ○ PEB 3 min, 100°C (plaque chauffante)
Montage de la fluidique	-	Fonctionnalisation de surface : Plasma O_2 , 200 W, 2 min
	-	Dépôt de résine : 2 laminages de film DF-1020, 2,5 bars, $T = 100^\circ\text{C}$, $v = 0,5 \text{ m/min}$
		Photolithographie :
	f	○ Insolation MA-6, 20 mW/cm^2, hard contact, 13,2 s ○ PEB 5 min 30 s, 100°C ○ Développement dans un bain de Cyclohexanone, 7 min, et rinçage à l'IPA
Alternative au capotage DF : le capotage verre	g	Nettoyage du 2^{ème} substrat en verre (pleine plaque) : Bain $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ (5 min) suivi par un Plasma O_2 , 800 W, 5 min
	h	Dépôt de résine : Laminage du film DF-1005, 2,5 bars, $T = 110^\circ\text{C}$, $v = 0,5 \text{ m/min}$. Si les ouvertures fluidiques sont toujours bouchées par le film DF, percer avec une aiguille
		Fonctionnalisation de surface du 1^{er} substrat en verre (substrat percé) comportant les microcanaux :
	-	Plasma O_2 , 200 W, 2 min, cage de Faraday ATTENTION : utiliser la cage de Faraday pour éviter une trop forte attaque de la résine qui entraîne une trop forte rugosité
	i	Scellement : Fermeture de la fluidique via capotage Nanonex ○ Pression ($30 \text{ PSI} \Leftrightarrow 2 \text{ bars}$) + T° ($85^\circ\text{C} \Leftrightarrow 65^\circ\text{C}$ réels) ○ Pression ($60 \text{ PSI} \Leftrightarrow 4 \text{ bars}$) + T° ($120^\circ\text{C} \Leftrightarrow 100^\circ\text{C}$ réels) + UV (365 nm) $\Leftrightarrow$ réticulation de la résine via rampe de température

Tableau II- 2 : Procédé de fabrication détaillé des dispositifs destinés à la filtration hydrodynamique

Nous pouvons facilement et dès la première étape du procédé aligner les ouvertures fluidiques du verre et de la résine (comme schématisé en Figure II- 8- a- étape d).

Les puces pour la filtration hydrodynamique ont par la suite toutes été fabriquées selon ce principe de fabrication inversée. Ce procédé débute par le nettoyage et l'activation d'un wafer de verre percé (piranha suivi d'un plasma O_2). Une première couche de résine de 5 μm d'épaisseur (DF-1005) est ensuite laminée avant d'être structurée par photolithographie : les entrées et sorties microfluidiques apparaissent alors, parfaitement alignées à celles du verre. D'autres couches de résine (2 x DF-1020), qui seront structurées par photolithographie pour former les canaux microfluidiques, sont ensuite laminées sur le wafer préalablement activé par plasma O_2 .

Pour fermer la structure, un deuxième wafer en verre (AF32, 4'', 500 μm d'épaisseur, non percé) est nécessaire. Après nettoyage de ce dernier (piranha puis plasma O_2), un film sec de résine (DF-1005) est laminé. En parallèle, le wafer percé sur lequel la structure fluidique a été réalisée est activé par plasma O_2 . Le traitement plasma nécessite l'usage d'une cage de Faraday pour éviter une attaque trop vive de la matière par le plasma. Cela permet de limiter l'apparition de bulles lors de l'étape de scellement. Une fois les deux wafers prêts, les résines sont mises en contact (Figure II- 8- a- étape i) et le wafer final est placé dans la Nanonex. La résine non réticulée est alors plaquée sur les structures microfluidiques, insolée et recuite et se lie à la résine qui constituait les canaux fluidiques, fermant définitivement la structure (Figure II- 8 - a- étape j).

Une caractérisation des structures des canaux a été réalisée après la fabrication de chaque niveau pour contrôler l'aspect de la résine, les dimensions des canaux, etc. Dans un premier temps, la hauteur des canaux a été vérifiée en utilisant un profilomètre mécanique (Tencor P17). Les mesures d'épaisseur ont montré des résultats satisfaisants (avec une variation de $\pm 2 \mu m$) et une bonne reproductibilité. Les observations au microscope optique Leica ont permis de vérifier l'aspect de la résine après développement (restes éventuels de résine, défauts des motifs, etc.) et de vérifier les dimensions et en particulier la largeur des différents canaux. Les Figure II- 9- a et Figure II- 9- b rendent compte du résultat obtenu après structuration des canaux fluidiques : aucun débris de résine n'est visible et la largeur des canaux est homogène sur l'ensemble du wafer. Les observations réalisées au MEB (HELIOS600) ont enfin permis de vérifier l'aspect de la structure des microcanaux fluidiques après capotage. La Figure II- 9- c fait état du résultat : les rectangles visibles, qui correspondent à des canaux latéraux, ont des flancs droits et leurs dimensions sont, une fois encore, reproductibles.

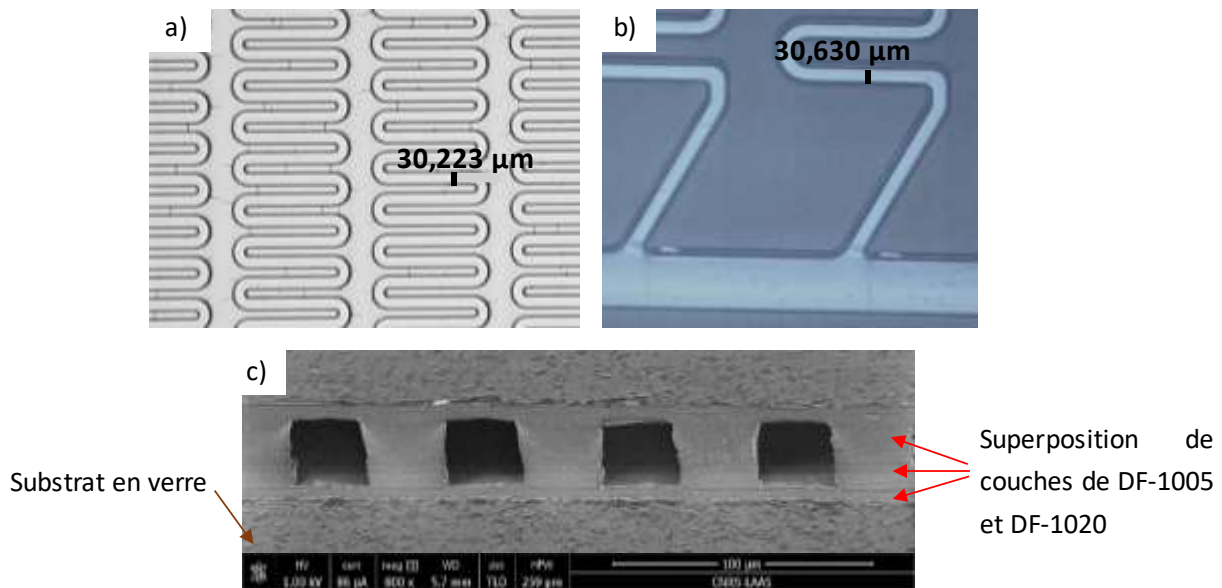
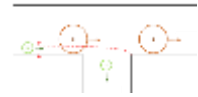


Figure II- 9 : Canaux microfluidiques réalisés par empilement de couches de DF-1005 et DF-1020 – a) et b) Image prises au microscope optique : détermination des largeurs des canaux fluidiques après développement. Les dimensions sont identiques en tout point de la puce – c) Image de la structure après découpe d’une puce prise au MEB HELIOS 600

Toutes ces étapes conduisent ainsi à l’obtention d’un premier module, destiné à la filtration hydrodynamique, fonctionnel.

II.3 Protocoles de préparation d’échantillons

Cette dernière partie a pour but de présenter les échantillons qui ont été utilisés au cours de cette étude.

II.3.1 Préparation des échantillons

Deux catégories d’échantillons nous ont permis de tester, valider et optimiser nos dispositifs. La première catégorie fait intervenir des éléments synthétiques : des billes fluorescentes en polystyrène issues du commerce (ThermoFisher Scientific). Ces dernières ont été employées depuis les premiers essais jusqu’à la validation des dispositifs optimisés. Elles ont également permis de faire l’économie de cellules vivantes.

Deux caractéristiques des billes sont particulièrement intéressantes pour nos applications : leur diamètre fixe et leur capacité à fluorescer. En ce qui concerne le diamètre, un large choix est disponible : allant de quelques nanomètres à quelques centaines de micromètres. Au cours de cette thèse, nous avons fait le choix d’utiliser des billes dont les diamètres étaient compris entre 0,5 et 15 μm et émettant dans les longueurs d’onde du vert (515 nm) et de

l'orange/rouge (605 nm). De manière plus précise, les diamètres 0,5 μm , 1 μm , 2 μm , 5 μm , 10 μm et 15 μm ont été utilisés.

La deuxième catégorie met en jeu des cellules biologiques. Ces dernières sont issues de deux espèces : murine et humaine.

Parmi les cellules mises en jeu, nous évoquerons tout d'abord les ASCs qui sont au cœur de cette étude. Ces cellules ont été extraites au laboratoire STROMA lab à partir de souris sacrifiées (seules des ASCs murines ont été isolées et testées). Le sacrifice des animaux faisant l'objet de nombreuses questions d'éthique et étant très réglementé, l'utilisation de cellules natives (fraîchement extraites de souris et nécessitant alors, pour chaque expérience, le sacrifice d'une souris) a été limitée et réfléchi de telle sorte à éviter le gaspillage de ces cellules.

Une alternative à l'utilisation des ASCs natives consiste en l'utilisation d'ASCs de culture. Le fait de cultiver ces cellules permet de disposer des cellules d'intérêt en continu sur plusieurs semaines et ainsi d'augmenter la fréquence des expériences. Cependant, la culture cellulaire entraîne une modification des caractéristiques des cellules et modifie en particulier leur taille : les cellules cultivées sont plus grosses que les cellules natives. De plus, les cellules souches n'étant de manière générale pas destinées à être cultivées ou tout du moins repiquées un nombre de fois trop élevé, l'utilisation des ASCs cultivées reste limitée.

Dans le but de limiter l'utilisation des ASCs, nous avons fait le choix d'utiliser des cellules qui présentent des propriétés physiques proches des ASCs. Pour cela, nous avons sélectionné les THP-1, lignée cellulaire monocyttaire humaine dérivée d'un patient atteint d'une leucémie monocyttaire aigüe. Possédant un diamètre proche des ASCs, au minimum 13 μm et pouvant atteindre un peu plus de 20 μm , elles semblent adaptées pour remplacer, sur le critère de taille, les ASCs. De plus, leur manipulation est assez aisée et elles sont très résistantes ce qui permet de les conserver de nombreuses semaines (plus longtemps que les ASCs cultivées). Une différence que nous évoquerons ici réside dans le fait que les THP-1, au contraire des ASCs, sont des cellules non-adhérentes (en suspension).

Nous avons ainsi travaillé avec différents échantillons que nous avons nous-mêmes constitués en rassemblant au fur et à mesure différentes populations de cellules jusqu'au test avec du sang complet. Dans un premier temps, nous avons travaillé avec les globules rouges seuls. Ces derniers ont été extraits à partir d'échantillons sanguins humains fournis par l'EFS (Établissement Français du Sang). Afin de les isoler des globules blancs et du plasma, le sang complet a été centrifugé pendant 3 minutes à 1300 rotations par minute (RPM).

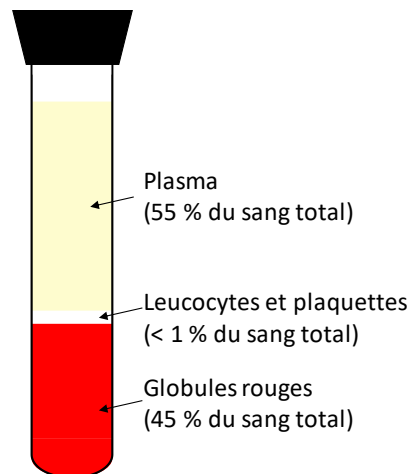
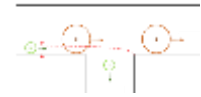


Figure II- 10 : Après centrifugation du sang, les cellules sanguines se répartissent dans trois phases : tout en bas se trouvent les globules rouges, cellules les plus denses ; la deuxième phase est constituée par les globules blancs et plaquettes qui, moins denses que les globules rouges se positionnent au-dessus de ces derniers ; la dernière phase est constituée uniquement par le plasma

Lors de la centrifugation du sang, les globules rouges, plus denses ($d = 1,1$)⁶¹, se placent au fond du tube. Les leucocytes, moins denses ($d = 1,08$), forment une couche intermédiaire entre les globules rouges et le plasma, ce dernier se positionnant en haut du tube (comme illustré en Figure II- 10). Les globules rouges sont prélevés directement au fond du tube et sont ensuite placés dans du PBS 1x (2-5 % de BSA, 2mM d'EDTA et 2 mM de NaN_3 , pH 7,4).

Dans un second temps, nous avons travaillé avec des échantillons plus complexes : mélanges de globules rouges et de THP-1 ou mélanges de globules rouges et d'ASCs. Le prélèvement des globules rouges a été réalisé selon le même protocole que celui décrit précédemment (centrifugation du sang complet, prélèvement des globules rouges et remise en suspension dans du PBS 1x). Les monocytes THP1 ont pour leur part été prélevés dans des flasques de culture. Une fois le milieu retiré après centrifugation (1300 RPM, 3 min), les cellules sont remises en suspension dans du PBS 1x. La préparation des ASCs, cellules adhérentes, implique une étape supplémentaire qui doit permettre de décoller les cellules du substrat (par action de la trypsine). Une fois les cellules décollées, elles sont nettoyées par retrait du milieu contenant la trypsine après centrifugation (1300 RPM, 3 min). Les cellules sont ensuite mises en suspension dans du MACS (mélange d'EDTA, de PBS et de BSA), milieu optimal en terme de pression osmotique.

Les cellules sont conservées séparément dans des tubes Falcon® : le mélange des différentes populations est effectué juste avant le début des expériences.

Le dernier échantillon traité a été le sang complet non dilué. Du sang de souris (extrait au laboratoire STROMA-lab) et du sang humain (provenant de l'EFS) ont ainsi été directement injectés et traités dans les dispositifs.

II.3.2 Marquage cellulaire

Afin d'observer les différents types cellulaires et leur comportement dans les canaux microfluidiques, il est nécessaire d'employer des marqueurs fluorescents. Ces marqueurs peuvent tout d'abord prendre la forme d'anticorps liés à un fluorochrome. Ces anticorps vont cibler les antigènes spécifiques qui leur correspondent et ainsi se greffer sur les protéines membranaires des cellules cibles. Cette méthode, nommée immunomarquage, a été évoquée précédemment (voir **Chapitre I**, partie **I.3.2.2**) et est très utile pour des applications de tri cellulaire (en FACS par exemple). Ces marqueurs peuvent également prendre la forme de molécules qui constituent un colorant fluorescent et qui ont la capacité de pénétrer différentes zones des cellules (noyau, cytoplasme ou membrane).

Les marqueurs biochimiques étant simples à utiliser et peu chers, nous avons décidé de les utiliser pour faciliter nos observations. Ces marqueurs peuvent être classés selon différents critères : localisation dans la cellule, durée de vie, longueurs d'onde d'absorption et d'émission, etc. Certaines contraintes liées à nos outils, à nos dispositifs et à l'application souhaitée nous ont conduits à expérimenter différents marqueurs biochimiques pour déterminer les fluorochromes les plus pertinents pour chacune de nos applications.

Parmi ces contraintes nous pouvons tout d'abord citer l'autofluorescence de la résine que nous utilisons pour fabriquer nos dispositifs⁷⁰. Les courbes rassemblées en Figure II- 11, associées aux spectres d'absorption et d'émission de trois matériaux (SU-8, DF et PDMS), font état de l'autofluorescence de deux de ces matériaux : la SU-8 et le DF, le DF étant le matériau utilisé pour fabriquer nos puces. Il apparaît que le DF auto-fluoresce lorsqu'il est soumis à une longueur d'onde de 470 nm, émettant alors autour des 550 nm (couleur correspondante : le vert).

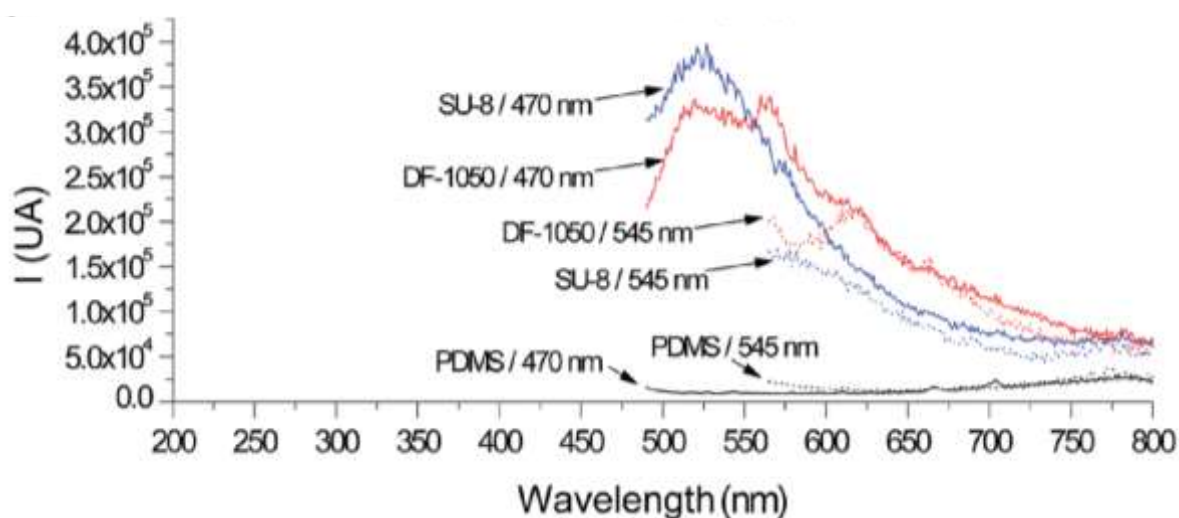


Figure II- 11 : Comparaison des émissions de fluorescence de différents matériaux (le DF, la SU-8 et le PDMS) lorsqu'ils sont soumis à une longueur d'onde d'excitation de 470 ou 545 nm⁷⁰



Le fait d'utiliser ce type de matériau impacte bien évidemment le choix du fluorochrome. Faire le choix d'un fluorochrome ayant des spectres d'absorption et d'émission très proches de ceux de la résine peut mener à des biais. En effet, lors de l'observation, le bruit de fond issu de l'autofluorescence de la résine peut être gênant pour visualiser les phénomènes d'intérêt.

Vient alors le choix du marqueur en fonction de sa localisation dans la cellule. La localisation du fluorochrome dans la cellule n'a pas constitué, dans notre cas, une contrainte. Seul le fait que les globules rouges ne possèdent pas de noyau a dû être pris en compte : des marqueurs cytoplasmiques et membranaires ont alors été employés.

De manière générale, un bon marqueur est un marqueur persistant dans la cellule, facilement détectable, n'influençant pas le métabolisme et la physiologie des cellules, non toxique, facile à utiliser, adapté aux outils disponibles et aux matériaux utilisés et peu cher.

Nous nous sommes alors tournés vers trois fluorochromes : le DAPI (ThermoFisher Scientific), le *CellTracker™ Green CMFDA* (ThermoFisher Scientific) et le PKH26 (Sigma-Aldrich, désormais Merck). Pour une comparaison aisée des domaines de fluorescence de chaque fluorochrome, les spectres d'absorption et d'émission ont été rassemblés en Figure II- 12.

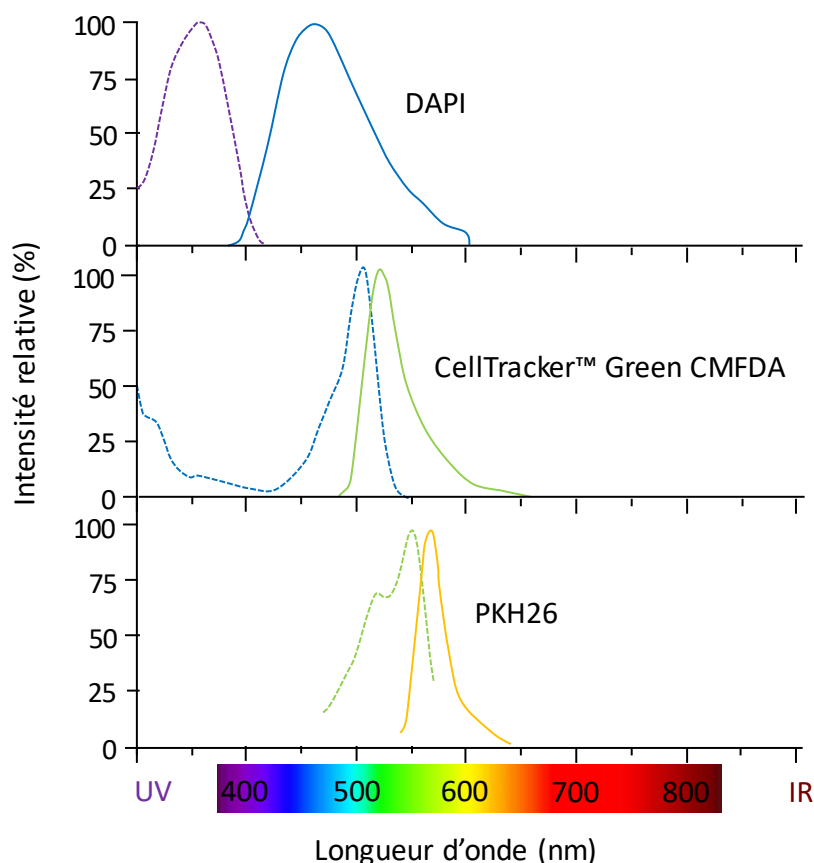


Figure II- 12 : Spectres correspondant aux fluorochromes DAPI, FITC/*Green Cell Tracker* et PKH26. Indication des spectres d'excitation (courbes en pointillés) et d'émission (courbes en trait plein) dans chaque cas

Le **DAPI** est une molécule capable de se fixer sur le **noyau** et se lie plus particulièrement aux bases Adénine et Thymines de l'ADN. Lorsque le DAPI est exposé à une lumière UV (maximum du spectre d'excitation à 350 nm), il émet une fluorescence bleue (maximum du spectre d'émission à 470 nm). Relativement toxique, nous l'avons utilisé, avec parcimonie, pour différencier facilement les globules rouges des globules blancs au sein de nos échantillons.

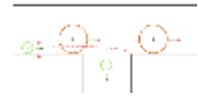
Le **CellTracker™ Green CMFDA** est un marqueur qui se positionne dans le **cytoplasme**. Facile à utiliser, ce marqueur présente une faible toxicité : il n'affecte pas la viabilité ou la prolifération des cellules. Les spectres d'excitation et d'émission se situent dans le vert (maxima à 492 nm pour l'excitation et de 517 nm pour l'émission). Convenable pour des cellules nucléées et anucléées, ce marqueur a été utilisé pour visualiser le déplacement de tous les types cellulaires étudiés lors de cette thèse.

Enfin, le **PKH26** est un marqueur **membranaire** qui, lorsqu'il est sollicité avec une lumière verte (maximum du spectre d'excitation à 551 nm), émet dans le jaune (maximum du spectre d'émission à 567 nm). Ce marqueur est connu pour être utilisé dans le cas du marquage de cellules souches de la moelle osseuse pour l'observation in vitro de leur prolifération, pour le marquage de pré-adipocytes ou encore pour le suivi de cellules souches adipeuses transplantées. Dans le cadre de cette thèse, ce marqueur a été utilisé pour marquer notamment les globules rouges et les monocytes.

II.4 Conclusion

Afin d'éliminer les cellules de diamètre inférieur à 10 μm et ainsi de pré-isoler les cellules d'intérêt, nous avons choisi de recourir à la filtration hydrodynamique. Ce chapitre détaille notamment le principe de la méthode ainsi que les équations associées, ces dernières permettant de dimensionner les canaux microfluidiques adaptés à la taille de filtration souhaitée.

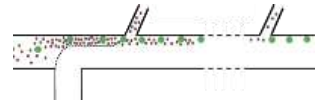
Ce chapitre a également permis de détailler le procédé de fabrication des puces microfluidiques. Ce dernier est basé sur le laminage de films secs de résine époxy de la série DF-10XX. De nombreuses difficultés ont été rencontrées dont notamment l'effondrement presque systématique du capot en résine dans les structures microfluidiques. Pour pallier ce problème, un protocole optimisé a été développé. Ce dernier intègre le capotage de la structure par un substrat en verre. La structure finale correspond alors à un sandwich de résine compris entre deux substrats en verre dont l'un d'eux est percé pour permettre l'injection des fluides. Les problèmes d'alignement des ouvertures fluidiques ont également pu être résolus en inversant la fabrication. La dernière étape n'est alors plus le capotage par le wafer percé mais le capotage par le wafer entier, ce qui n'implique aucune contrainte technique (notamment sur l'alignement).



Pour finir, ce chapitre a permis d'introduire les échantillons qui seront utilisés tout au long de cette étude et qui permettront la caractérisation, l'optimisation et la validation des dispositifs microfluidiques. Parmi ces échantillons deux familles se distinguent : les échantillons synthétiques et les échantillons biologiques. Les échantillons synthétiques et fluorescents ont pour rôle la validation rapide des dispositifs tandis que les échantillons biologiques, aussi bien marqués en fluorescence que non marqués, permettront de conclure quant à l'efficacité de nos dispositifs pour l'isolement des cellules d'intérêt.

Chapitre III

Préconcentration de cellules souches adipeuses circulantes par filtration hydrodynamique



Ce chapitre présente les développements réalisés pour parvenir à l'obtention d'un dispositif opérationnel. Ainsi, le principe de fonctionnement sera tout d'abord validé grâce à l'utilisation d'échantillons synthétiques avant que la filtration ne soit testée sur des échantillons biologiques.

III.1 Développement d'un dispositif fonctionnel et vérification du principe de fonctionnement

Le diamètre des ASCs désormais connu, l'objectif de ce dispositif est clair : éliminer les cellules dont le diamètre est inférieur à $10\ \mu\text{m}$ (globules rouges, plaquettes, lymphocytes).

Ces travaux ont été réalisés avec l'aide de trois étudiants : Mathias Bouguelmouna, étudiant en M2 à l'Université Paul Sabatier III, Mélanie Mariotte, étudiante en M2 à la Faculté des Sciences et Techniques de Limoges et Rémi Roux, étudiant de deuxième année à l'ENSEEIH.

III.1.1 Première version du dispositif

Comme évoqué en partie II.1.2, le design des puces microfluidiques commence par le choix de certaines dimensions. Ont ainsi été imposés le fait de travailler en 2D (tous les canaux sont réalisés dans le même niveau de résine) ainsi que le fait de travailler avec un support de puce aux dimensions figées (largeur et longueur de puce ainsi que position des entrées et sorties fluidiques). De plus, pour des raisons techniques, une marge (distance entre un canal et le bord de la puce en verre) doit être respectée pour éviter que les canaux ne soient ouverts lors de la découpe du wafer. Ces contraintes permettent de définir un espace de travail dans lequel les canaux devront être contenus.

Le choix de la largeur, tout comme le choix de la hauteur des canaux ont été effectués en fonction des possibilités de fabrication ainsi que des dimensions des objets traités. Les cellules ayant un diamètre compris entre 4 et $25\ \mu\text{m}$, nous avons fait le choix d'une hauteur des canaux égale à $40\ \mu\text{m}$ et d'une largeur des canaux latéraux égale à $40\ \mu\text{m}$ soit au moins quatre fois la dimension des objets qui entrent dans ces mêmes canaux.

Ces choix étant faits, un premier dispositif a été réalisé. Le design de cette première version de puce est schématisé en Figure III- 1. Il comprend un canal principal connecté à 20 canaux latéraux de différentes longueurs et orthogonaux au canal principal. Une entrée et deux sorties permettent d'injecter ou recueillir les échantillons. La sortie principale, notée S_p , a pour rôle de recueillir les particules dont le diamètre est supérieur à $10\ \mu\text{m}$ tandis que la sortie connectée aux canaux latéraux, notée S_{lat} , a pour rôle de recueillir les particules de diamètre inférieur à $10\ \mu\text{m}$. Toutes les caractéristiques de ce design sont rassemblées dans le Tableau III- 1.

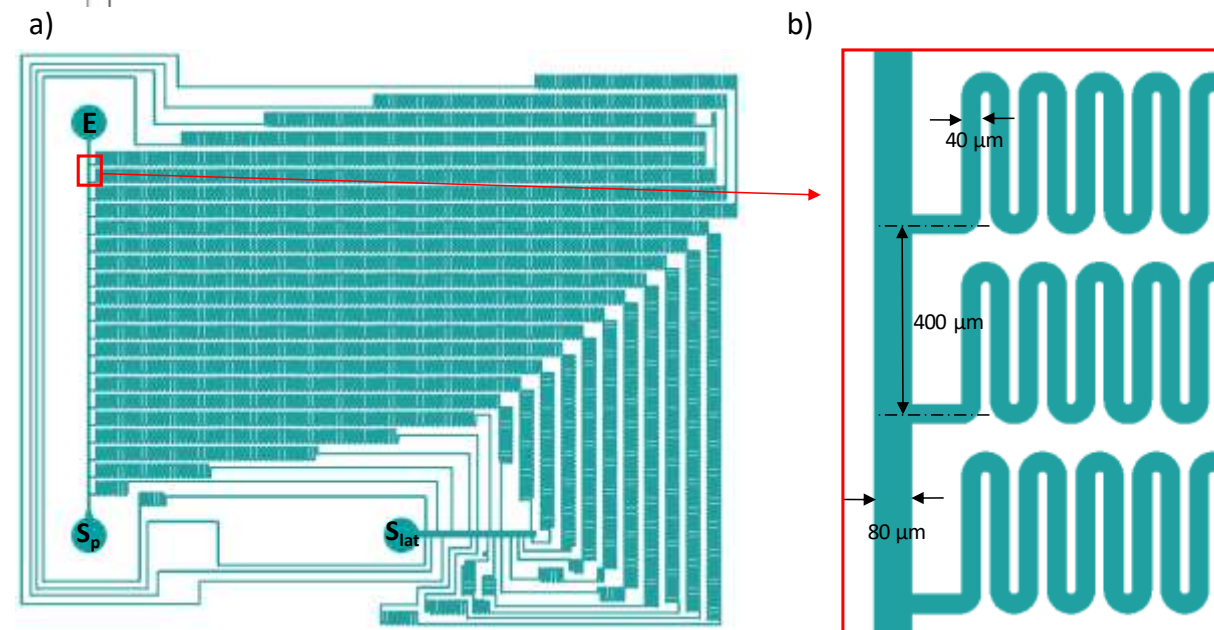


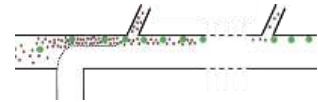
Figure III- 1 : Schéma du premier design (réalisé avec le logiciel CleWin5) des puces destinées à éliminer les particules de diamètre inférieur à $10\text{ }\mu\text{m}$ – a) Schéma complet du design : il comporte un canal principal connecté à une entrée (notée E) et une sortie principale (notée S_p) récoltant les particules de diamètre supérieur à $10\text{ }\mu\text{m}$. 20 canaux latéraux sont rattachés au canal principal et sont reliés à une sortie latérale (notée S_{lat}) récoltant les particules de diamètre inférieur à $10\text{ }\mu\text{m}$ – b) Zoom sur une portion du design : les canaux latéraux sont rattachés orthogonalement au canal principal ; indication des largeurs des canaux principal et latéraux et de la distance entre les canaux latéraux (distance centre à centre)

Dimension	
Rayon critique (μm)	5
Nombre de canaux latéraux	20
Largeur du canal principal (μm)	80
Largeur des canaux latéraux (μm)	40
Hauteur du canal principal et des canaux latéraux (μm)	40
Longueur du canal principal (mm)	17,768
Distance entre les canaux latéraux (μm)	400

Tableau III- 1 : Paramètres fixés pour réaliser les dispositifs dédiés à la filtration hydrodynamique

Ce dispositif a pu être dimensionné grâce aux calculs présentés au Chapitre II, partie II.1.2. Ces derniers donnent notamment accès aux débits dans chacun des canaux latéraux, ce qui permet de déterminer à l'avance quels seront les volumes obtenus après la filtration.

Nous avons choisi de présenter les résultats obtenus pour une pression d'entrée égale à 950 mbar et une viscosité dynamique de $1\text{ Pa}\cdot\text{s}$ (viscosité dynamique de l'eau), cette pression ayant été utilisée lors d'expériences présentées dans la suite du chapitre.



Les longueurs des canalisations secondaires ainsi que les débits correspondants sont rassemblés dans le Tableau III- 2. Il est important de préciser que le canal numéro 1 correspond au premier canal filtrant les particules, soit le canal le plus proche de l'entrée. Cela sera valable pour tous les autres dispositifs présentés dans la suite de ce chapitre.

N°	L (mm)	Débit (μL/s)	N°	L (mm)	Débit (μL/s)	N°	L (mm)	Débit (μL/s)	N°	L (mm)	Débit (μL/s)
1	173,921	$2,51.10^{-2}$	6	134,823	$2,37.10^{-2}$	11	93,454	$2,24.10^{-2}$	16	49,682	$2,12.10^{-2}$
2	166,277	$2,48.10^{-2}$	7	126,735	$2,35.10^{-2}$	12	84,896	$2,22.10^{-2}$	17	40,627	$2,10.10^{-2}$
3	158,546	$2,46.10^{-2}$	8	118,555	$2,32.10^{-2}$	13	76,241	$2,19.10^{-2}$	18	31,469	$2,07.10^{-2}$
4	150,728	$2,43.10^{-2}$	9	110,283	$2,30.10^{-2}$	14	67,488	$2,17.10^{-2}$	19	22,207	$2,05.10^{-2}$
5	142,820	$2,40.10^{-2}$	10	101,916	$2,27.10^{-2}$	15	58,635	$2,15.10^{-2}$	20	12,840	$2,03.10^{-2}$

Tableau III- 2 : Longueur des 20 canalisations latérales et débits associés dans le cas d'une pression d'entrée fixée à 950 mbar et d'une viscosité dynamique de fluide de 1.10^{-3} Pa.s

Il apparait que le débit total théorique dans les canalisations latérales est de $4,52.10^{-1}$ μL/s soit 27,1 μL/min. Le débit théorique en sortie principale est quant à lui de 1,78 μL/s soit 107 μL/min. Les volumes alors obtenus, que ce soit en sortie latérale ou en sortie principale, sont parfaitement exploitables.

Suite à leur dimensionnement, les puces ont été fabriquées selon le protocole détaillé au Chapitre II, partie II.2.4. Elles ont ensuite été caractérisées afin de valider, dans un premier temps, le principe de fonctionnement puis d'extraire des informations sur le tri des échantillons d'intérêt.

III.1.2 Caractérisation, optimisation et validation des dispositifs

La caractérisation des dispositifs a été réalisée dans un premier temps avec des échantillons synthétiques, c'est-à-dire contenant des billes en polystyrène fluorescentes et de diamètre connu (voir détail des échantillons au Chapitre II, partie II.3.1). Le fait d'utiliser ces objets permet de faire l'économie de cellules biologiques mais permet surtout de travailler avec des objets idéaux : aux dimensions connues, rigides (non déformables) et faciles à observer.

Dès les premières expériences, nous avons cherché à vérifier que le rayon critique du dispositif soit bien celui attendu : soit 5 μm. Pour ce faire, des solutions de PBS 1x contenant des billes fluorescentes calibrées (5 μm de diamètre) ont été injectées. Le rayon de ces billes étant bien inférieur au rayon critique, il était attendu que ces billes soient facilement filtrées, aspirées par les canaux latéraux et ce, quelle que soit la pression appliquée en entrée. Dès les premiers essais, il a pu être établi que peu de billes étaient aspirées dans les canaux latéraux et que la

pression avait un effet sur la filtration. En effet, plus la pression en entrée était augmentée, moins les particules parvenaient à entrer dans les canaux latéraux, ce qui n'est pas en corrélation avec les Équations (II- 7) et (II- 9), celles-ci démontrant que l'efficacité de filtration est indépendante des pressions appliquées.

Afin d'affiner l'analyse et de comprendre le ou les phénomène(s) à l'origine de ce défaut de fonctionnement, des solutions de PBS 1x contenant des billes de diamètre égal à $0,5\ \mu\text{m}$ ont été injectées. Ces expériences ont mis en évidence l'existence d'une perturbation en entrée de canal latéral, de forme s'apparentant à une spirale, empêchant les particules, notamment les plus grosses, d'entrer dans les canaux latéraux (phénomène visible en Figure III- 2).

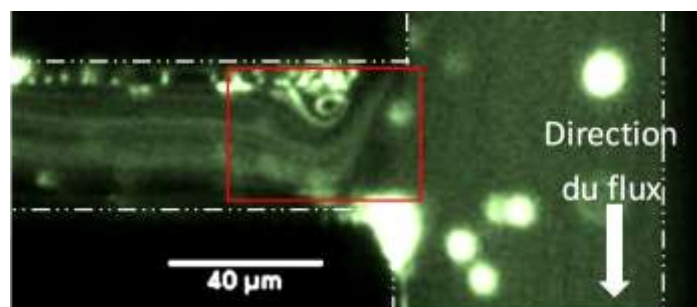


Figure III- 2 : Caractérisation de l'écoulement dans la puce microfluidique. Observation de l'écoulement de billes fluorescentes de $0,5\ \mu\text{m}$ de diamètre sous une pression d'entrée de 1 bar – en pointillés blancs : limites des canaux microfluidiques

Les expérimentations ont été accompagnées par des simulations réalisées sur le logiciel COMSOL 5.2. Nous avons modélisé une portion de la structure en 2D puis avons modélisé l'ensemble de la structure en 2D et 3D. Les simulations ont été réalisées dans le cas d'un écoulement laminaire en régime stationnaire. Les paramètres géométriques, le matériau et les paramètres de maille utilisés lors des simulations sont rassemblés dans le Tableau III- 3.

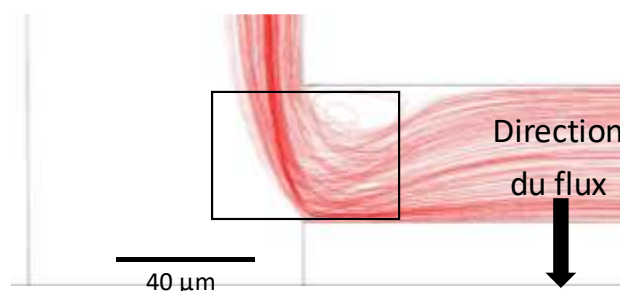
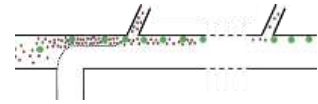


Figure III- 3 : Modélisation du dispositif de filtration hydrodynamique sur le logiciel COMSOL 5.2, focalisation sur un embranchement



Catégorie	Paramètre	Dimensions
Géométrie	Longueur de la canalisation principale	17 768 μm
	Longueur des canalisations latérales	$12\,840 < L < 173\,921\, \mu\text{m}$
	Entrée fluidique	largeur = 80 μm , hauteur = 40 μm
Matériaux	Eau	Viscosité dynamique = $1.10^{-3}\, \text{Pa.s}$ Densité = 1 kg/m^3
Maillage	Max paramètre de maille	500 μm
	Min paramètre de maille	80 μm

Tableau III- 3 : Paramètres intégrés dans le logiciel COMSOL 5.2 pour simuler le comportement des fluides dans le dispositif de filtration hydrodynamique

En Figure III- 3, sont représentées les lignes de courant (lignes rouges) correspondant à la portion de fluide aspirée par une canalisation latérale. Ces résultats valident ainsi les résultats expérimentaux et montrent qu'une perturbation se forme effectivement à l'entrée des canaux latéraux.

Cette perturbation rendant les puces inefficaces et donc inutilisables, une amélioration doit être apportée.

III.2 Développement d'un dispositif fonctionnel

La question se posant désormais est de savoir quelles sont les améliorations pouvant être apportées pour optimiser le dispositif. Par souci d'économie de ressources (matériels, matériaux, temps, etc.), nous avons utilisé la simulation afin de tester les différents paramètres qui nous semblent les plus à même d'avoir une influence sur le fonctionnement du dispositif.

III.2.1 Optimisation du design par simulation

L'influence de plusieurs paramètres sur les performances du dispositif a été étudiée : viscosité des fluides, largeur des différentes canalisations, distance entre les canaux latéraux et inclinaison des canaux latéraux. Des diverses simulations effectuées, un paramètre s'est démarqué : l'orientation des canaux microfluidiques.



Nous avons ainsi comparé les résultats des simulations d'un écoulement dans un dispositif comportant des canaux latéraux orthogonaux au canal principal et d'un écoulement dans un dispositif comportant des canaux latéraux inclinés d'un angle de 120° par rapport au canal principal.

De la même façon qu'avec la précédente géométrie, les simulations ont été réalisées dans le cas d'une étude d'un écoulement laminaire en régime stationnaire ; seuls les paramètres géométriques ont été modifiés. Les résultats de la simulation avec la nouvelle géométrie sont présentés en Figure III- 4- c : les lignes de courant, en bleu, ne forment pas de spirale en entrée de canal latéral. Grâce à ces résultats, il nous apparaît peu probable que les particules soient impactées par un reflux. Le choix d'incliner les canaux latéraux semble à ce stade être la meilleure solution pour éviter l'apparition de turbulences à l'origine des problèmes de filtration. Cette modification a ainsi été intégrée au design des nouvelles puces.

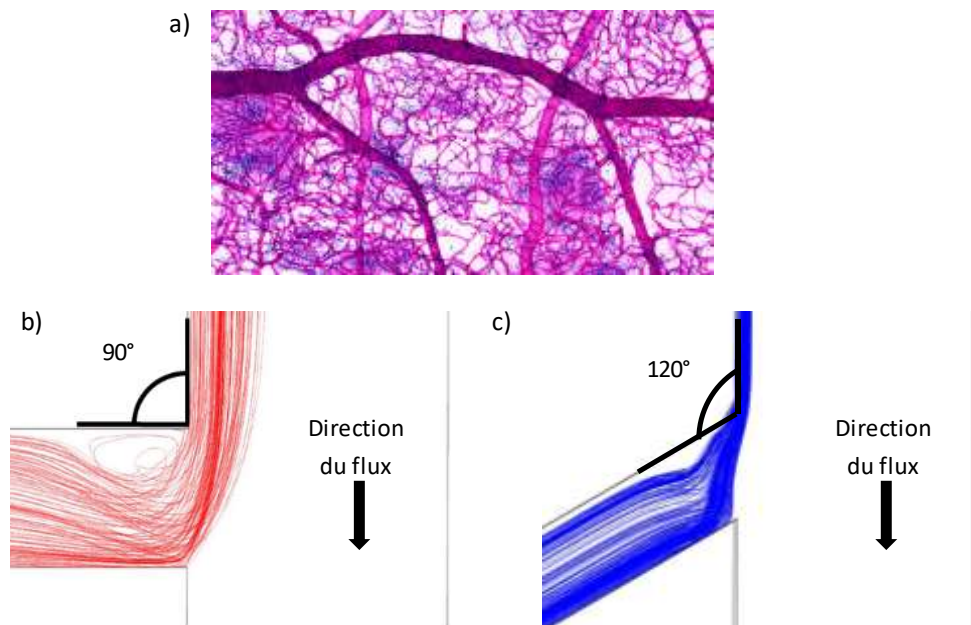
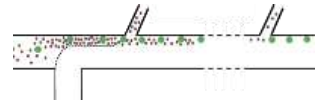


Figure III- 4 : Détermination de l'angle d'inclinaison optimal des canalisations latérales par analogie avec les vaisseaux sanguins – a) Réseau des capillaires sanguins de l'œil (©DOCSTOCK/KAGE/BSIP) : aucun angle droit visible – b) et c) Résultats des simulations de filtration avec le logiciel COMSOL 5.2 : focalisation sur l'intersection entre le canal principal et une canalisation latérale dans le cas de canalisations latérales à 90° par rapport au canal principal (b) et de canalisations latérales inclinées de 120° par rapport au canal principal (c)

Par ailleurs, afin de réduire l'encombrement sur la puce, nous avons choisi de réduire la largeur des canaux latéraux. En effet, le fait d'augmenter ou réduire la largeur des canaux latéraux influe sur leur résistance hydrodynamique (se référer à l'Équation (II- 4)). Or, dans notre cas, les valeurs des résistances hydrodynamiques ne peuvent être modifiées (pour conserver un rayon critique constant). Afin de conserver les mêmes résistances



hydrodynamiques tout en modifiant la largeur des canaux, il est nécessaire de modifier le seul paramètre pouvant varier : la longueur des canalisations latérales. Ainsi une réduction de la largeur des canaux entraîne une réduction de la longueur des canaux latéraux et entraîne donc une réduction de l'encombrement sur la puce. Cette modification a été accompagnée d'une réduction de la distance entre les canalisations secondaires (distance centre à centre) qui a permis d'augmenter le nombre de canaux latéraux rattachés au canal principal.

Trois modifications ont donc été apportées à la géométrie du design. La première est une réduction de la largeur des canaux latéraux de 10 μm (soit un passage de 40 à 30 μm). Grâce à cela, les canalisations secondaires sont plus courtes. La deuxième modification porte sur la réduction de l'espacement entre deux canaux latéraux. La dernière amélioration porte enfin sur l'inclinaison des canaux latéraux d'un angle de 120° par rapport au canal principal.

Suite à ces simulations et aux choix techniques réalisés, nous avons réalisé plusieurs générations de puces. Une première version a permis de faire la transition entre le design comportant des canaux latéraux orthogonaux au canal principal et le design comportant des canaux latéraux inclinés. Les dispositifs suivants correspondent aux autres modifications évoquées : réduction de la largeur des canaux latéraux (et par conséquent de leur longueur), réduction de la distance entre les canaux latéraux et augmentation du nombre de canaux latéraux. L'évolution du design est détaillée en annexe III-A/ **Évolution du dispositif**.

III.2.2 Caractéristiques du nouveau dispositif

La version aboutie de ce dispositif est schématisée en Figure III- 5- a. Le nouveau design comporte 30 canaux latéraux distants les uns des autres de 300 μm (distance centre à centre). Afin d'accueillir un tel nombre de canaux latéraux, la longueur de la canalisation principale a été augmentée. Les canaux latéraux ont été inclinés d'un angle de 120° par rapport au canal principal. De plus, une sortie latérale s'ajoute aux deux sorties déjà présentes portant à deux le nombre total de sorties latérales. Cet ajout, dû à des contraintes de design, est indispensable afin que toutes les canalisations latérales puissent être à la fois contenues dans l'espace dédié et être rattachées à une sortie latérale. De même que pour les sorties latérales, le nombre d'entrées a été augmenté et porté à deux. Une de ces entrées a pour rôle l'injection de l'échantillon tandis que l'autre est destinée à l'injection d'une solution tampon. Concrètement, l'injection d'une solution tampon permet de confiner l'échantillon proche des parois du canal principal et de focaliser les particules près des canaux latéraux. Son rôle est d'augmenter le taux de filtration en plaquant les particules contre la paroi qui se trouve du côté des canaux latéraux (Figure III- 5- b). Seule la hauteur des canaux principal et latéraux reste inchangée et égale à 40 μm . Les caractéristiques de ce nouveau design (nommé « Version finale ») sont détaillées dans le Tableau III- 4 et sont mises en parallèle des données de la version initiale du design pour rappeler les différences entre les deux versions.

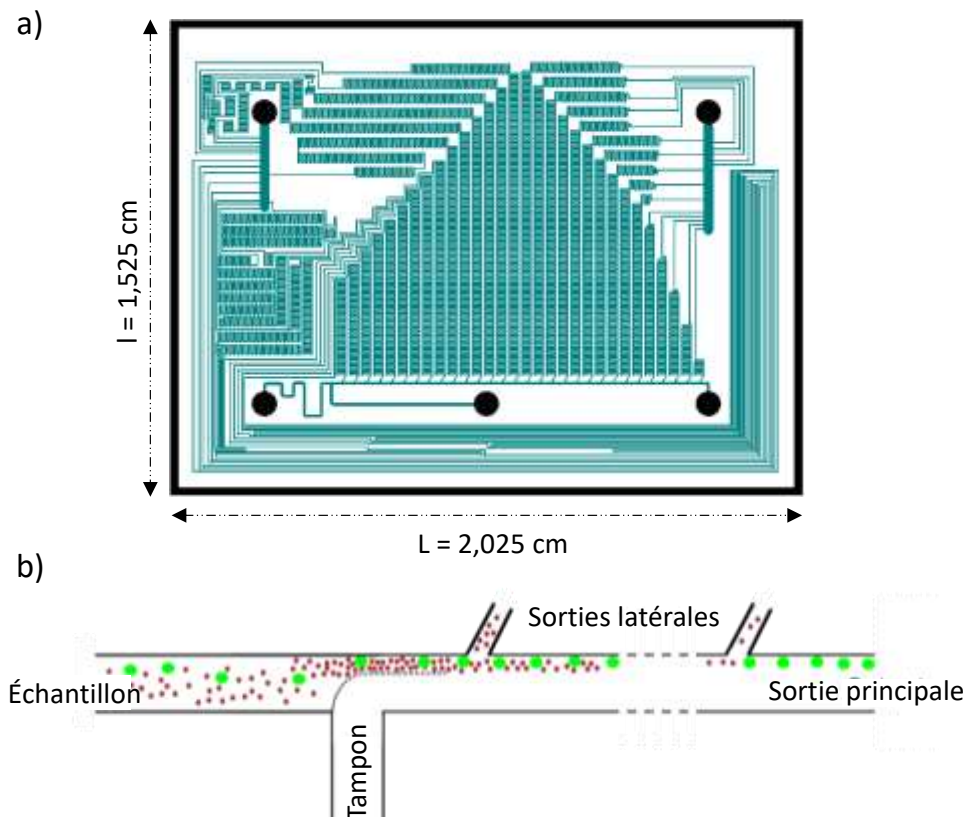
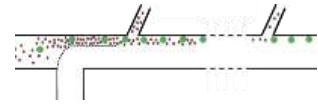


Figure III- 5 : Version améliorée comportant 30 canaux latéraux inclinés – a) Design final réalisé avec le logiciel CleWin 5 – b) Schéma de principe du dispositif : en rouge sont schématisées les particules de diamètre inférieur à $10 \mu\text{m}$ et en vert les particules de diamètre supérieur à $10 \mu\text{m}$. L'échantillon, injecté en entrée échantillon, est plaqué par la solution tampon contre la paroi du côté des canaux latéraux. Les particules rouges dont le rayon est inférieur au rayon critique ($5 \mu\text{m}$) sont filtrées par les canalisations latérales tandis que les particules vertes restent dans le canal principal et sont récoltées en sortie principale

	Version initiale	Version finale
Nombre d'entrées	1	2
Nombre de sorties	1 sortie principale 1 sortie latérale	1 sortie principale 2 sorties latérales
Nombre de canaux latéraux	20	30
Angle d'inclinaison des canaux latéraux	90° 	120° 
Dimensions canal principal (Longueur*largeur*hauteur μm)	8712*80*40	17 768*80*40
Dimensions canaux latéraux (largeur*hauteur μm)	40*40	30*40
Distance entre canaux latéraux (centre à centre) (μm)	400	300

Tableau III- 4 : Tableau comparatif des caractéristiques des deux versions du dispositif de filtration hydrodynamique



Comme indiqué également dans le Tableau III- 4, la largeur des canaux latéraux a été réduite à 30 μm , ce qui permet une réduction non négligeable de la longueur de tous les canaux latéraux. Les longueurs des canalisations latérales ainsi que le débit associé à chaque canal latéral (dans le cas d'une pression d'entrée égale à 950 mbar et d'une viscosité dynamique égale à 1.10^{-3} Pa.s) sont rassemblés dans le Tableau III- 5.

N°	Longueur (mm)	Débit ($\mu\text{L/s}$)	N°	Longueur (mm)	Débit ($\mu\text{L/s}$)	N°	Longueur (mm)	Débit ($\mu\text{L/s}$)
1	112,267	$2,41.10^{-2}$	11	80,012	$2,15.10^{-2}$	21	43,901	$1,92.10^{-2}$
2	109,203	$2,38.10^{-2}$	12	76,582	$2,13.10^{-2}$	22	40,060	$1,90.10^{-2}$
3	106,104	$2,36.10^{-2}$	13	73,112	$2,10.10^{-2}$	23	36,176	$1,88.10^{-2}$
4	102,970	$2,33.10^{-2}$	14	69,604	$2,08.10^{-2}$	24	32,248	$1,86.10^{-2}$
5	99,801	$2,30.10^{-2}$	15	66,055	$2,06.10^{-2}$	25	28,275	$1,84.10^{-2}$
6	96,595	$2,28.10^{-2}$	16	62,466	$2,03.10^{-2}$	26	24,257	$1,82.10^{-2}$
7	93,353	$2,25.10^{-2}$	17	58,836	$2,01.10^{-2}$	27	20,193	$1,80.10^{-2}$
8	90,074	$2,23.10^{-2}$	18	55,166	$1,99.10^{-2}$	28	16,083	$1,78.10^{-2}$
9	86,758	$2,20.10^{-2}$	19	51,453	$1,97.10^{-2}$	29	11,927	$1,76.10^{-2}$
10	83,404	$2,18.10^{-2}$	20	47,698	$1,94.10^{-2}$	30	7,723	$1,74.10^{-2}$

Tableau III- 5 : Longueur des 30 canalisations latérales et débits associés dans le cas d'une pression d'entrée fixée à 950 mbar et d'une viscosité dynamique de fluide de 1.10^{-3} Pa.s

Il apparait que le débit théorique total dans les canalisations latérales est de $6,17.10^{-01}$ $\mu\text{L/s}$ soit 37,0 $\mu\text{L/min}$. Le débit théorique en sortie principale est de 1,53 $\mu\text{L/s}$ soit 91,7 $\mu\text{L/min}$. A nouveau, les volumes obtenus, que ce soit en sortie latérale ou en sortie principale, sont parfaitement exploitables et ce, au bout de quelques minutes.

III.2.3 Validation expérimentale : échantillons synthétiques

La caractérisation et la validation des puces ont débuté par la vérification de la disparition de la perturbation initialement présente en entrée de canal latéral. Pour ce faire, l'écoulement d'une solution de PBS 1x contenant des billes de diamètre égal à 0,5 μm a été étudié. Les Figure III- 6- a et Figure III- 6- b permettent de comparer le comportement de la solution de billes injectée, dans les mêmes conditions, dans une puce comportant l'ancien design et dans une puce comportant le design optimisé. Cette comparaison a permis de valider la simulation (et donc le nouveau design) puisqu'aucune perturbation n'a été constatée en entrée de canal latéral dans les nouveaux dispositifs.



La perturbation disparue, la caractérisation des dispositifs s'est poursuivie par la validation du rayon critique.

Pour ce faire, une solution de PBS 1x contenant des billes en polystyrène fluorescentes de diamètre égal à 5 μm a été injectée. Le résultat de cette filtration est visible en Figure III- 6- c. Les billes, injectées par l'entrée échantillon et plaquées contre la paroi du canal principal par la solution tampon, en l'occurrence du PBS 1x, sont parfaitement filtrées par les canaux latéraux.

Partant de ces constats positifs, d'autres solutions contenant des billes calibrées de diamètre 15 et 10 μm ont été injectées. Les billes de 15 μm ne parviennent pas à entrer dans les canaux latéraux et sont récupérées en totalité dans la sortie principale. Les billes dont le diamètre est égal à 10 μm sont quant à elles partiellement filtrées : bien que la grande majorité de ces billes soit récoltée en sortie principale, quelques billes sont aspirées dans les canaux latéraux. Ces observations sont suffisantes pour établir le fait que le rayon de coupure de notre dispositif avoisine les 5 μm . Cela valide le principe de fonctionnement des dispositifs et permet d'accéder à l'étape d'après : l'application de la filtration aux échantillons biologiques.

Il est important à ce stade de préciser qu'aucune quantification des taux de filtration des billes en polystyrène n'a été effectuée, ceci, dans le but de travailler le plus rapidement possible avec les échantillons d'intérêt.

Les tests réalisés avec des échantillons synthétiques ont enfin permis de mettre en avant le fait que les billes, quel que soit leur diamètre, collent aux parois des canaux microfluidiques et se positionnent, voire s'ancrent dans la résine à proximité de l'entrée des canaux latéraux. Les zones de forte intensité visibles en Figure III- 6- a et Figure III- 6- b correspondent justement à des agglomérats de billes ayant collé à la paroi, à l'entrée d'un canal latéral. Pour remédier au problème d'interaction entre les billes et les parois, une solution contenant 1 % de polymère polyvinylpyrrolidone (PVP), de poids moléculaire 40 kDa, a été injectée et ce, afin que le polymère recouvre les parois des canaux microfluidiques. Suite à ce recouvrement, les billes ne collaient plus aux parois.

Pour finir, il a été évoqué à plusieurs reprises le fait que la filtration des particules ne dépend pas de la pression appliquée. Pour confirmer cela, trois couples de pression ont été utilisés : 300 et 350 mbar ; 500 et 600 mbar ; 800 et 950 mbar, correspondant respectivement à la pression appliquée pour injecter l'échantillon et la pression appliquée pour injecter la solution tampon. Ces expériences ont confirmé le fait que les particules sont filtrées indépendamment de la pression appliquée.

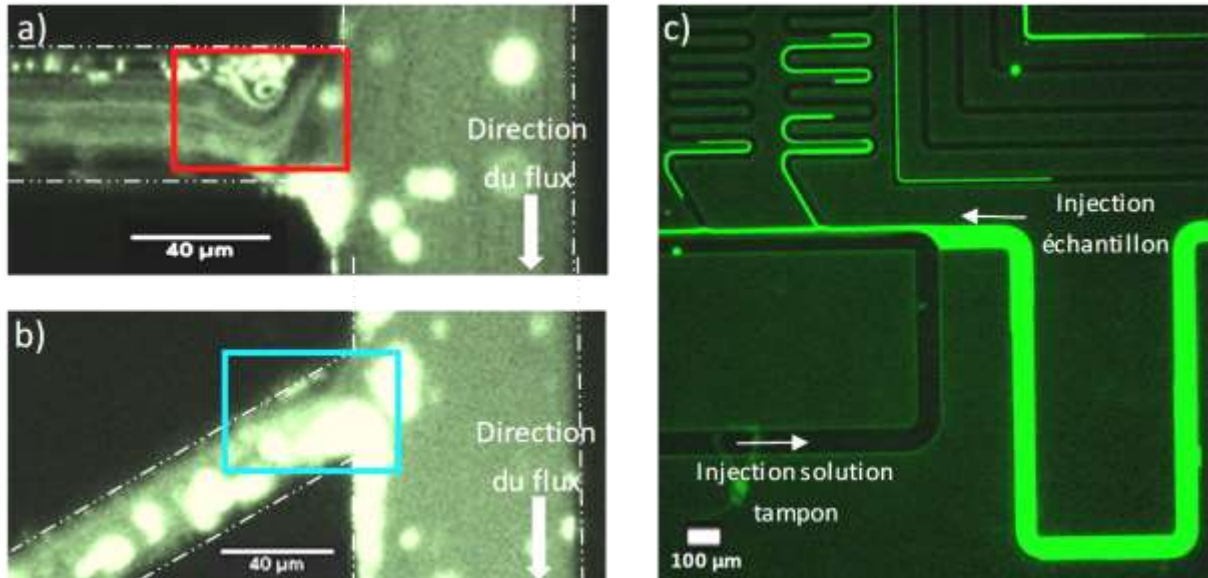
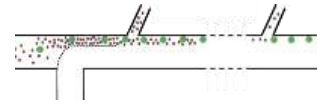


Figure III- 6 : Images d'un écoulement de billes fluorescentes en polystyrène dans différents dispositifs. Images réalisées sous microscopie à fluorescence – a) Canal latéral orthogonal au canal principal : perturbation en entrée de canal latéral visible *via* injection de billes de polystyrène fluorescentes de diamètre 0,5 µm (pression appliquée : 1 bar) – b) Canal latéral incliné d'un angle de 120° : disparition de la perturbation (visible grâce à l'injection de billes de polystyrène fluorescentes de diamètre 0,5 µm, pression appliquée : 1 bar) – c) Filtration d'une solution de PBS 1x contenant des billes de 5 µm de diamètre : les billes sont parfaitement filtrées par les canaux latéraux inclinés (pression appliquée en entrée échantillon : 800 mbar ; pression appliquée en entrée tampon : 950 mbar)

Le dispositif tel que développé est fonctionnel et les résultats sont reproductibles. Ceci nous permet de passer à l'étape suivante : la caractérisation de la filtration sur des échantillons biologiques.

III.2.4 Validation expérimentale : échantillons biologiques

Pour valider ce dispositif, différents critères sont à évaluer : taux de filtration des cellules à éliminer mais également taux de récupération des cellules d'intérêt et enfin impact de la filtration sur les différents types cellulaires. Ce dernier critère inclut l'étude de la morphologie, de la lyse et de la prolifération des cellules.

Différents paramètres tels que le couple de pressions appliqué, la concentration des différents types cellulaires, le marquage cellulaire ont été explorés. L'influence de ces paramètres a été analysée pour déterminer les paramètres les plus adaptés pour la filtration des échantillons biologiques et en particulier la récupération de cellules souches adipeuses intactes.



III.2.4.1 Détermination des taux de filtration

L'objectif de ce dispositif étant d'éliminer 100 % des cellules de diamètre inférieur à 10 μm , la quantification du taux de filtration et plus exactement du taux d'exclusion des globules rouges, qui représentent plus de 99,9 % des éléments du sang, est indispensable.

Avant de filtrer un échantillon sanguin complet, plusieurs tests préliminaires ont été nécessaires. Dans un premier temps, nous avons cherché à quantifier les taux de filtration d'échantillons ne comprenant que des globules rouges. Ces premiers essais permettent de valider le principe de filtration sur des objets biologiques mais également de quantifier les taux de filtration sur des objets faciles à prélever et à qualifier. Pour ce faire, les globules rouges ont été prélevés à partir d'un sang complet centrifugé (1300 RPM pendant 3 minutes). Ces mêmes globules ont ensuite été remis en suspension dans une solution tampon PBS 1x. La concentration en globules alors obtenue correspond à une dilution au 25^{ème} du sang complet.

Le graphique en Figure III- 7 présente les résultats de trois tests de filtration. Chaque test correspond à une condition d'injection différente ou plus précisément à un couple de pressions. Les couples de pressions (échantillon/tampon) ainsi employés sont : 300/350 mbar, 500/600 mbar et 800/950 mbar.

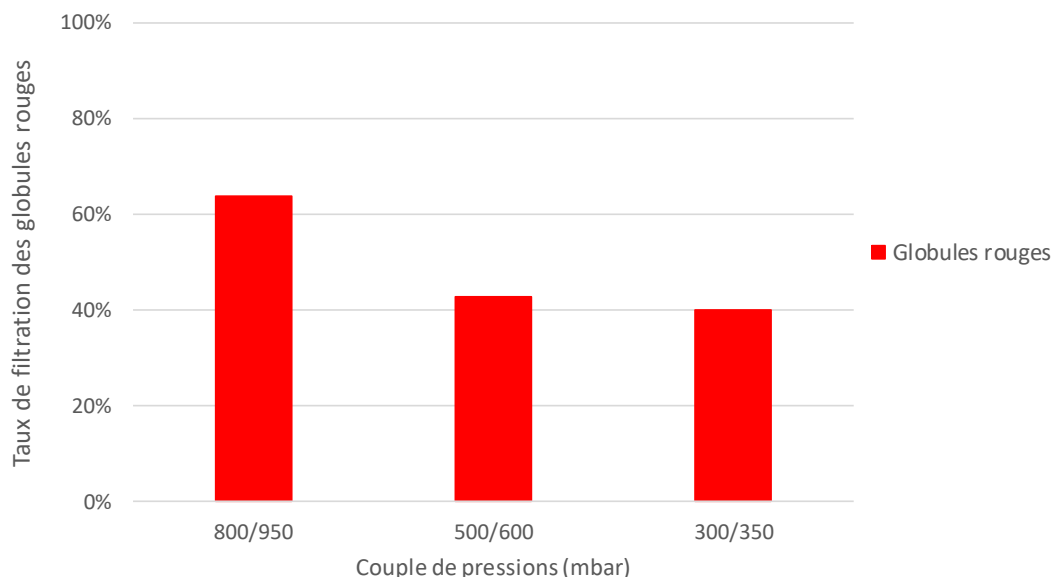
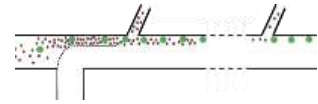


Figure III- 7 : Taux de filtration des globules rouges (échantillon sanguin dilué au 25^{ème}) mesurés à partir des échantillons obtenus en sortie latérale pour trois conditions d'entrée différentes : trois couples de pressions différents

Ce graphique indique que les taux de filtration pour les globules rouges seuls sont assez faibles et ce, quel que soit le couple de pressions appliqué. Au mieux, 54 % des globules rouges sont



filtrés et récupérés en sortie latérale. Dans le cas le plus critique, le taux descend à 30 % seulement. En plus des taux de filtration, nous avons noté les temps de filtration nécessaires pour filtrer 1 mL d'échantillon et ce, pour les trois couples de pressions. La filtration d'un échantillon de globules (dilution au 25^{ème}) dure 30 minutes avec le couple 800/950 mbar. Ce temps augmente jusqu'à 1 heure et 30 minutes avec le couple 500/600 mbar et atteint les 2 heures et 30 minutes avec le couple 300/350 mbar.

Par la suite, nous avons réalisé des essais sur des échantillons contenant deux types cellulaires. Ces échantillons comprennent soit des globules rouges et des ASCs, soit des globules rouges et des monocytes THP-1. Pour rappel, les monocytes THP-1 ont pour rôle de mimer le comportement des ASCs dans nos dispositifs. Pour ces expériences, la concentration en globule rouge a été maintenue constante dans tous les échantillons. Cette concentration correspond à une dilution du sang complet au 25^{ème}. Seule la concentration en ASCs ou en THP-1 a été amenée à varier dans la gamme de concentration $[7.10^3; 7.10^5]$ cellules/mL (abrégé en c/mL). Faire varier la concentration en cellules d'intérêt doit permettre de conclure sur l'influence de la variation du rapport des concentrations entre différents types cellulaires sur l'efficacité de filtration.

Plusieurs solutions ont ainsi été préparées. Pour faciliter la comparaison entre les divers résultats, nous avons défini un ratio « r » qui correspond au rapport des concentrations en ASCs/THP-1 et globules rouges (Équation ((III- 1))).

$$r = \frac{(\text{nombre d'ASCs ou de THP} - 1)}{(\text{nombre de Globules Rouges})} \quad (\text{III- 1})$$

Les résultats rapportés dans le graphique en Figure III- 8 correspondent à des expériences de filtration réalisées avec le couple de pressions 500/600 mbar. Les calculs des taux de filtration sont basés sur les mesures des concentrations réalisées avec un Coulter Counter Z2 dont le principe de mesure repose sur une mesure de variation d'impédance proportionnelle au volume des particules analysées.

Toutes les expériences réalisées ont montré que 100 % des cellules d'intérêt (THP-1 ou ASCs) sont récoltées en sortie principale. Cela prouve que la filtration des cellules, dans la gamme de concentration $[7.10^3; 7.10^5]$ c/mL, ne dépend pas de la concentration initiale. Ces résultats sont très encourageants pour de futurs tests avec des concentrations bien plus faibles. Les taux de filtration des globules rouges sont quant à eux moins satisfaisants car plus aléatoires et faibles. Dans le cas des expériences menées avec les ASCs, les résultats sont plutôt homogènes : le pourcentage de filtration varie entre 35 et 58 % tandis que dans le cas du mélange avec les THP-1, le pourcentage de filtration varie sans logique entre 24 et 90 %.

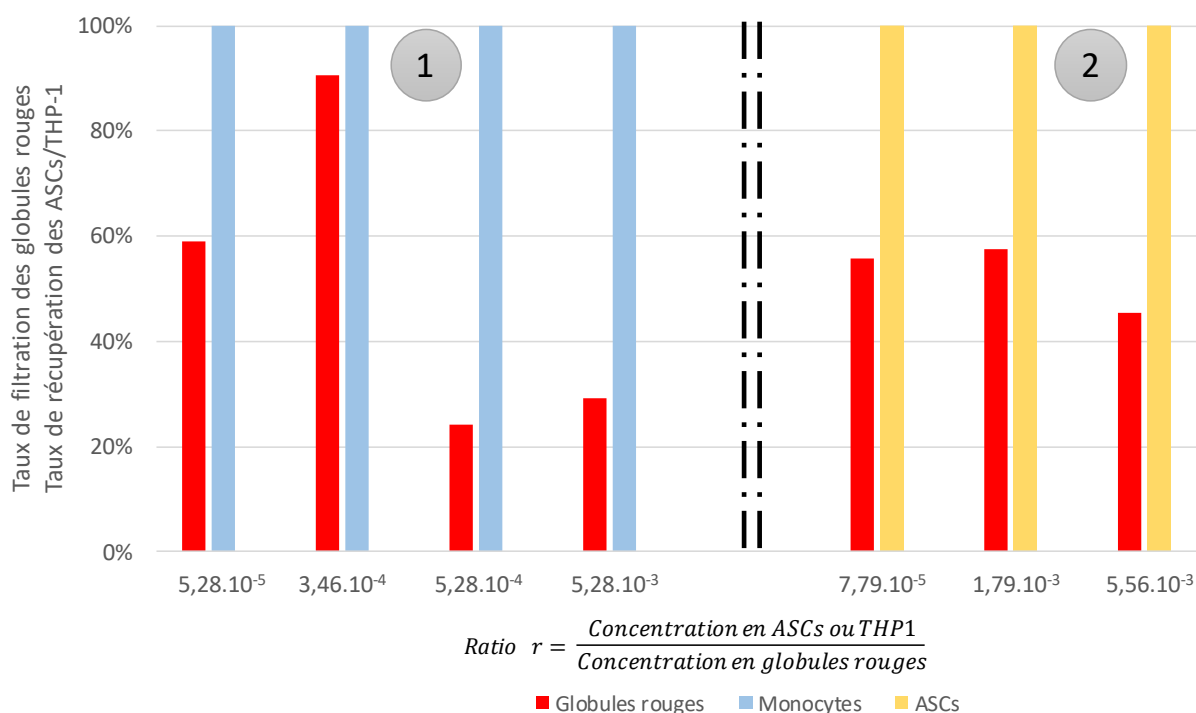


Figure III- 8 : Résultats de la filtration d'échantillons comportant un mélange de globules rouges et de THP-1 ou d'ASCs. Ces résultats rassemblent les taux de filtration des globules rouges : mesures effectuées sur les échantillons obtenus en sortie latérale. Ils rassemblent également les taux de récupération des THP-1 ou ASCs : mesures effectuées sur les échantillons obtenus en sortie principale. La zone 1 correspond aux mélanges globules rouges/THP-1 et la zone 2 aux mélanges globules rouges/ASCs

Pour finir, la filtration d'un échantillon sanguin complet a été comparée, en termes de taux et temps de filtration, à la filtration d'un échantillon sanguin dilué au 25^{ème}. Dans ce cas, la comparaison a été faite sur des échantillons injectés à une pression de 800 mbar (solution tampon injectée à une pression de 950 mbar).

Le graphique présenté en Figure III- 9 rassemble les résultats de ces deux tests. Les taux de filtration indiqués ne correspondent pas seulement aux taux de filtration des globules rouges. En effet, ne pouvant faire la distinction entre les globules blancs et les globules rouges *via* le comptage au Coulter Counter Z2, l'ensemble des éléments biologiques de diamètre inférieur à 10 μm a été dénombré. Ces taux de filtration incluent ainsi les taux de filtration des globules rouges et de certains leucocytes.

Il s'avère alors que les taux de filtration sont faibles : 54 % dans le cas du sang dilué et 36 % dans le cas du sang pur. Ces tests confirment les tendances présentées lors des précédentes expériences. De plus, les temps de filtration diffèrent entre les deux tests : 30 minutes suffisent à filtrer un échantillon de sang dilué de 1 mL alors que 2 heures et 20 minutes sont requises pour filtrer 1 mL de sang complet.

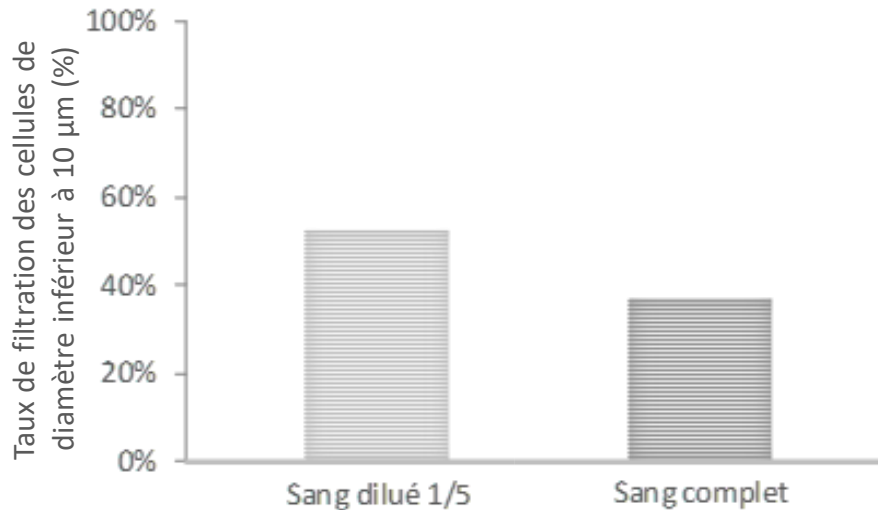
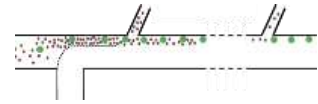


Figure III- 9 : Comparaison des taux de filtration des cellules de diamètre inférieur à 10 µm mesurés à partir des échantillons obtenus en sortie latérale et ce, après filtration de sang dilué au 25^{ème} et de sang complet en appliquant le couple de pressions 800/950 mbar

Ces essais prouvent ainsi que le dispositif n'est pas complètement adapté à la filtration des échantillons sanguins aussi bien purs que dilués. Plusieurs options ont été envisagées pour améliorer les dispositifs. Une première option consiste à filtrer plusieurs fois l'échantillon. Toutefois, de nombreux problèmes s'imposent rapidement avec ce choix. Tout d'abord les temps de filtration seraient fortement augmentés. De plus, une refiltration de sang pur pourrait conduire à la formation de bouchons dus au phénomène de coagulation et dégrader les capacités de filtration voire même rendre la puce inutilisable. Il est également possible d'imaginer la mise en parallèle de nombreuses puces pour réduire les temps de filtration. Toutefois, cette option nécessite beaucoup de ressources (matériels, puces).

Plutôt que d'imaginer diverses solutions destinées à améliorer les taux de filtration sans trop impacter les temps de filtration, nous avons cherché à déterminer quel phénomène pourrait être à l'origine des faibles taux de filtration. Deux phénomènes se sont ainsi distingués : la *margination* et la saturation des canaux latéraux. L'étude de ces phénomènes et de leur impact sur les taux de filtration seront plus amplement détaillés dans la suite de ce manuscrit.

III.2.4.2 Étude de la viabilité cellulaire

En parallèle de la quantification des taux de filtration des diverses populations cellulaires, une étude portant sur la viabilité des cellules a été effectuée. Cette viabilité peut être qualifiée ou quantifiée de différentes manières : lyse cellulaire, analyse morphologique ou encore quantification de la prolifération des cellules. Ce sont ces critères qui nous permettront de conclure quant à l'impact de la filtration sur l'intégrité des cellules.



Quel impact sur la lyse des cellules ?

La vérification de la lyse des cellules, autrement dit, de la mort des cellules, est une vérification purement visuelle. Elle permet de conclure, de manière qualitative, sur l'impact de manipulation des cellules et de leur injection dans les dispositifs sur leur viabilité.

D'entre toutes les cellules, les globules rouges représentent les meilleurs indicateurs de conditions expérimentales inadaptées et leur lyse peut être facilement caractérisée, c'est pourquoi cette étude s'est focalisée sur ce type cellulaire. Pour déterminer s'il y a effectivement lyse des globules rouges, une simple centrifugation suffit. En effet, lorsque les globules rouges lysent, ils libèrent l'hémoglobine qu'ils contiennent. Cette dernière, de couleur rouge, est un parfait indicateur de la destruction de la cellule. Après centrifugation, si le milieu est de couleur rouge (Figure III- 10- b) alors il est possible de conclure sur la lyse des globules rouges. Dans le cas contraire, lorsque les cellules restent viables, un culot se forme et le milieu n'est pas coloré (Figure III- 10- a).

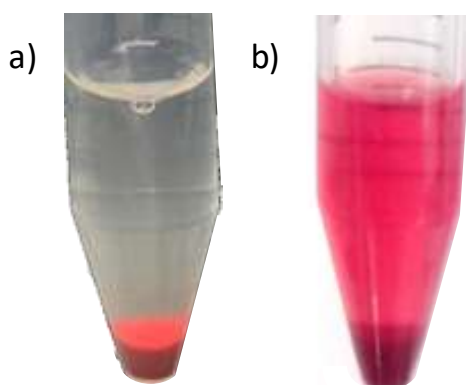
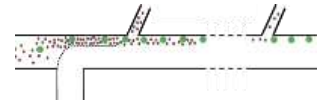


Figure III- 10 : Comparaison de deux échantillons sanguins – a) Sang non lysé : les globules rouges forment un culot – b) Sang lysé : les globules rouges viables forment un culot tandis que les autres ont libéré l'hémoglobine qu'ils contenaient colorant ainsi le milieu en rouge

Dans notre cas, nous avons cherché à vérifier si le protocole de préparation employé et/ou la filtration pouvaient avoir un impact et entraîner la lyse des globules rouges. Pour ce faire, du sang complet a été centrifugé à 1300 RPM durant 3 minutes. Seuls les globules rouges ont été prélevés et remis en suspension dans 1 mL de tampon PBS 1x contenant 4 μ L de fluorochrome PKH26. L'échantillon a été mélangé manuellement (à l'aide d'une pipette) durant 5 minutes. Suite à cela, l'échantillon a été centrifugé (1300 RPM, 3 minutes) pour retirer la solution contenant le fluorochrome. Les globules rouges ont enfin été remis en suspension dans une solution de PBS 1x.

Pour commencer, aucune lyse cellulaire n'a été constatée une fois la préparation de l'échantillon terminée. L'échantillon a ensuite été injecté dans le dispositif (le tampon alors utilisé est du PBS 1x). Quel qu'ait été le couple de pressions employé, une lyse des globules



rouges a été constatée. En effet, la centrifugation des échantillons obtenus aussi bien en sortie latérale qu'en sortie principale mène à l'obtention d'échantillons identiques à celui imagé en Figure III- 10- b.

Afin de vérifier si la lyse est causée par une étape du protocole de préparation ou si elle est simplement causée par la filtration, nous avons choisi de retirer toute étape du protocole pouvant avoir une influence sur l'intégrité des globules rouges. L'étape la moins indispensable étant le marquage des cellules, nous avons retiré cette étape du protocole. Il s'est alors avéré qu'aucune lyse cellulaire n'a été constatée après la filtration et ce, quel que soit le couple de pressions utilisé. Pour cette raison, l'étape de marquage des cellules a été définitivement retirée du protocole de préparation.

En parallèle de cette analyse, nous avons caractérisé la morphologie des cellules.

Quel impact sur la morphologie des cellules ?

L'observation de la morphologie des cellules est également une vérification purement visuelle permettant de caractériser la viabilité de la cellule. Cette vérification a été effectuée sur les globules rouges et les globules blancs.

Ayant d'ordinaire la forme d'une lentille biconcave, le globule rouge peut prendre différentes formes notamment selon la composition du milieu (en particulier la teneur en sels) dans lequel il est en suspension ainsi que des contraintes mécaniques auxquelles il est soumis.

Dans le cas d'exposition à des contraintes mécaniques, le globule rouge, soumis à des gradients de cisaillement (ce qui est le cas dans un écoulement de type Poiseuille) peut adopter des formes allant du biconcave au multilobé, ce qui est visible en Figure III- 11.

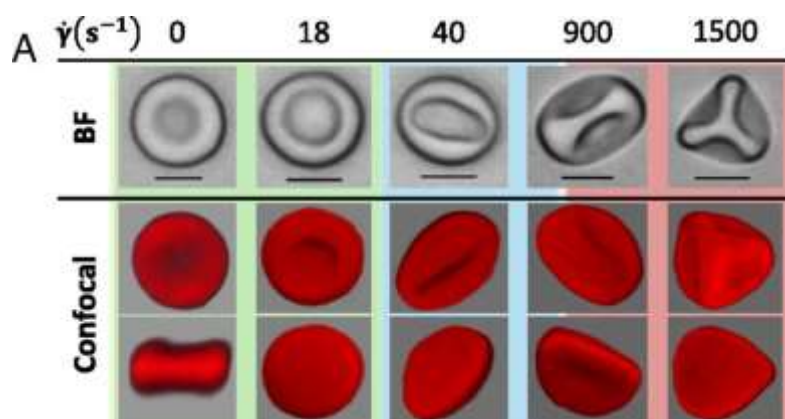


Figure III- 11 : Variation de la morphologie du globule rouge en fonction du taux de cisaillement dans un canal microfluidique⁷⁶

Dans le cas d'un milieu dont la teneur en sels est inadaptée, le globule rouge peut prendre différentes formes (Figure III- 12- a) allant du globule rouge crénelé (milieu hypertonique car



contenant trop de sels) au globule rouge lysé (milieu très hypotonique car contenant trop peu de sels).

Dans un premier temps, nous avons utilisé des échantillons marqués en fluorescence afin de faciliter l'observation de la forme des cellules. Les échantillons ont été préparés selon le même protocole que celui utilisé pour préparer les échantillons destinés à l'analyse de la lyse cellulaire. L'échantillon a ensuite été injecté dans le dispositif (la solution tampon utilisée est le PBS 1x).

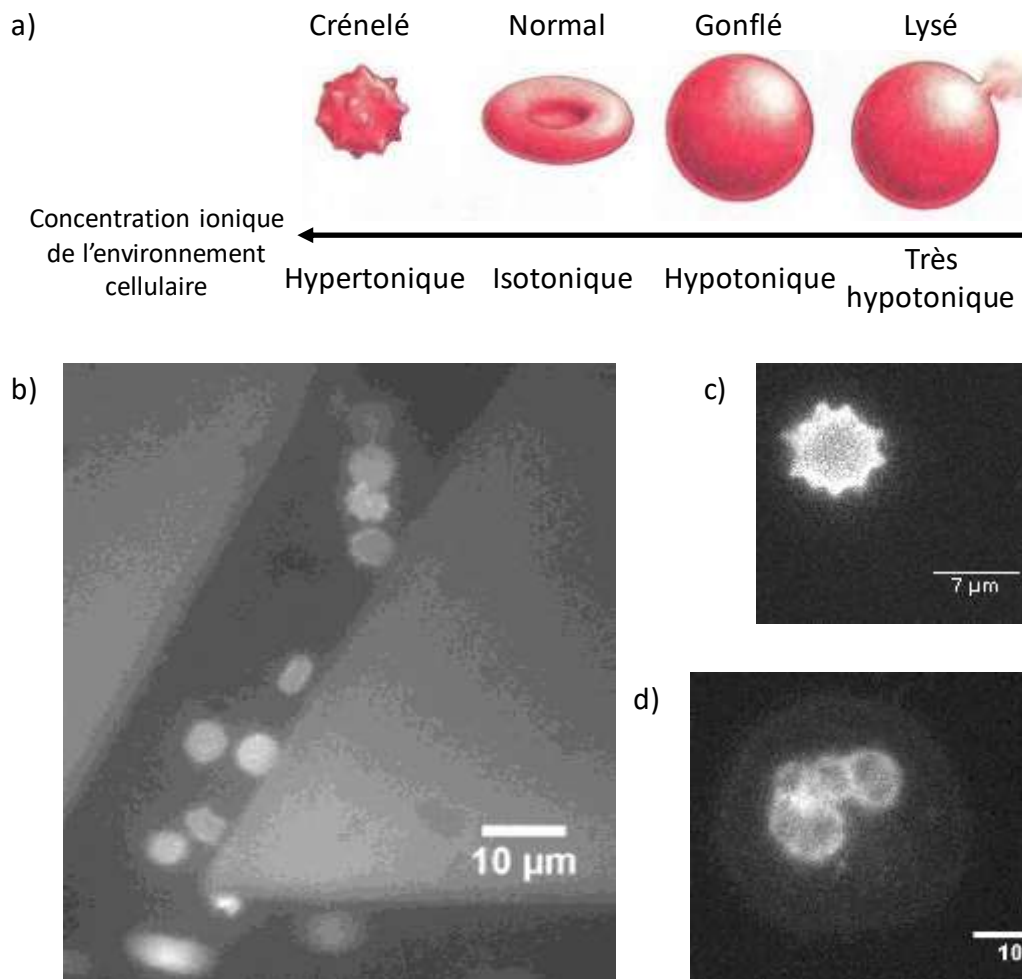
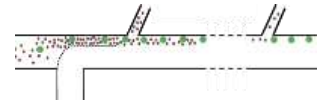


Figure III- 12 : Détermination de la morphologie des cellules – a) Échelle indiquant la forme d'un globule rouge en fonction de la teneur en sels du milieu dans lequel il est mis en suspension – b) Globules rouges marqués au PKH26 en écoulement dans un canal microfluidique : présence d'échinocytes et d'érythrocytes – c) Focalisation sur un échinocyte marqué au PKH26 obtenu après filtration – d) Morphologie d'un globule blanc polynucléaire marqué au DAPI obtenu après filtration : le globule a conservé sa morphologie d'origine

Quels qu'aient été les couples de pressions appliqués, les globules rouges sont devenus des échinocytes, érythrocytes crênelés ressemblant à des oursins plutôt qu'à des disques biconcaves. De plus, que ce soit dans les microcanaux (Figure III- 12- b) ou en sortie de



dispositif (Figure III- 12- c), nombreux sont les globules rouges qui ont pris cette forme. *Via* leur forme, il a été facile d'établir le fait que le milieu dans lequel ils ont été remis en suspension est hypertonique et donc non adapté.

Le marquage des cellules semblant impacter leur comportement, les mêmes expériences ont été réalisées, cette fois, sans marquer les cellules. Il est alors apparu que les globules prennent la même forme crénelée confirmant que le milieu est bien la cause d'un tel changement de morphologie.

En parallèle, la morphologie des leucocytes a été évaluée. Les leucocytes semblent être peu impactés par le milieu dans lequel ils sont mis en suspension et ne semblent pas non plus être impactés par la filtration dans les puces microfluidiques. La Figure III- 12- d correspond à un leucocyte polynucléaire marqué au DAPI, mis en suspension dans du PBS 1x et ayant été soumis à la filtration (donc soumis aux mêmes contraintes que les globules rouges). La forme de la cellule est en parfaite cohérence avec la forme prise d'ordinaire par ce type de cellules et prouve que ni la préparation ni la filtration n'ont d'impact sur ce type de cellules.

Ainsi, il apparaît indispensable de changer le milieu dans lequel les cellules sont mises en suspension. La remise en suspension des globules rouges dans du S.A.G. Mannitol (Saline Adénine Glucose Mannitol) a permis de pallier le problème d'hypertonie du milieu puisque lorsqu'ils sont mis en suspension dans ce milieu, ils conservent leur forme discoïdale.

Un dernier test permettant de caractériser la viabilité cellulaire après filtration a été réalisé.

Quel impact sur la prolifération ?

L'étude de la prolifération des cellules est cruciale pour les études de croissance et de différenciation cellulaire. Dans notre cas, l'analyse de la prolifération est indispensable et doit nous permettre de déterminer si cette première étape de tri est adaptée à nos cellules, en particulier dans l'optique d'un usage des ASCs en médecine régénératrice.

Les paragraphes suivants rapportent les résultats de tests effectués sur des THP-1. Parmi les expériences menées sur les monocytes, trois types d'essais peuvent être distingués. Un premier essai porte sur l'analyse de la prolifération de THP-1 restés dans l'incubateur et n'ayant subi aucune contrainte. Le deuxième essai porte sur l'analyse de la prolifération de THP-1 n'ayant pas été filtrés mais ayant subi les mêmes étapes de préparation que les cellules destinées à être filtrées. Le dernier essai porte sur l'analyse de la prolifération de THP-1 ayant été injectés et filtrés dans les puces microfluidiques. Tous ces essais ont en commun la remise en culture des cellules à une concentration fixée à 5.10^3 c/mL. Les analyses ont été effectuées sur une durée d'une semaine avec une quantification de l'évolution du nombre de cellules aux jours 1, 3 et 7. Les mesures du nombre de cellules ont été réalisées avec le Coulter Counter Z2.

Sont rassemblées dans les graphiques en Figure III- 13, Figure III- 14, Figure III- 15 et Figure III- 16, les courbes de prolifération cellulaire des THP-1 soumis aux différents essais. Le jour 0 correspond au jour où les cellules ont été remises en culture à la concentration de 5.10^3 c/mL dans le milieu de culture RPMI-1640 (milieu de culture cellulaire *Roswell Park Memorial Institute*) mélangé à 10 % de SVF (Sérum de Vœu Foetal) et 1 % d'antibiotiques.

La courbe en pointillés rouges en Figure III- 13 correspond aux résultats de prolifération des THP-1 qui n'ont été soumis à aucun stress et qui sont restés dans l'incubateur. Cette courbe est prise comme référence de prolifération cellulaire. Il apparaît une certaine latence avant que les cellules ne prolifèrent fortement et ce, à partir du 3^{ème} jour. Cette latence est due à la faible concentration initiale en cellules remises en suspension.

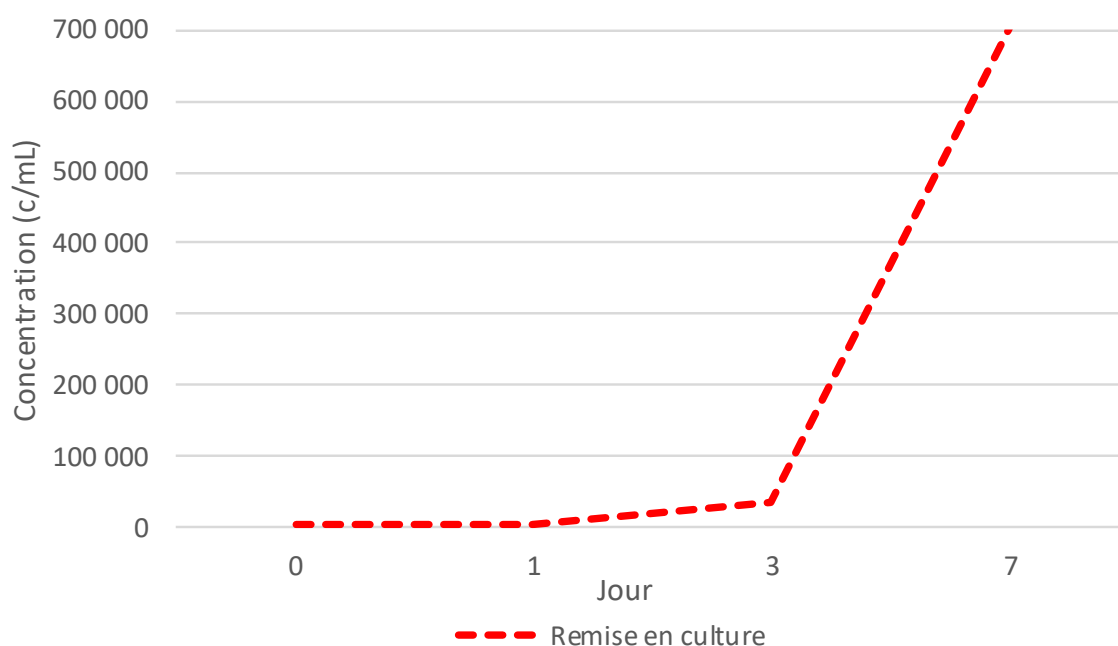
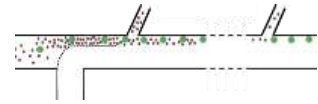


Figure III- 13 : Étude sur une semaine de la prolifération de THP-1 n'ayant été soumis à aucune contrainte : remise en culture (en incubateur 37 °C, 5 % de CO₂) immédiate à une concentration de 5 000 c/mL (jour 0)

Nous avons ensuite analysé la prolifération des THP-1 ayant subi le protocole de préparation mais pas la filtration. Les quatre courbes en traits discontinus en Figure III- 14 correspondent aux résultats de prolifération de ces cellules. Avant injection dans les puces microfluidiques, les cellules sont préparées (centrifugation à 1300 RPM pendant 3 minutes) et remises en suspension pendant un certain délai dans un milieu autre que le milieu de culture et hors de l'incubateur (soit sans échange gazeux à $T_{amb} = 22$ °C). Nous avons cherché à déterminer si la préparation et la conservation (« mise en attente ») de l'échantillon pouvaient impacter la prolifération cellulaire. Deux échantillons différents ont été préparés. Dans le premier cas, les THP-1 ont été remis en suspension en milieu PBS 1x à une concentration de 400 000 c/mL.



Dans le deuxième cas, les cellules ont été remises en suspension en milieu RPMI (sans présence de SVF ou d'antibiotiques) à la même concentration. Ces échantillons ont été conservés hors de l'incubateur durant une durée pouvant aller d'une à deux heures, soit les temps d'attente des cellules avant injection dans les dispositifs. Avant la remise en culture, les échantillons ont été centrifugés et remis en suspension dans le milieu de culture RPMI contenant 10 % de SVF et 1 % d'antibiotiques.

Le fait de conserver les cellules dans ces conditions ne semble pas avoir d'impact négatif sur leur prolifération. Au contraire, les cellules semblent mieux proliférer dans ces conditions. En effet, le même phénomène de latence est constaté que sur l'échantillon de référence : la prolifération redémarre fortement au troisième jour. Une fois la prolifération relancée, les cellules atteignent des concentrations élevées, soit le million de cellules par mL dans la plupart des cas.

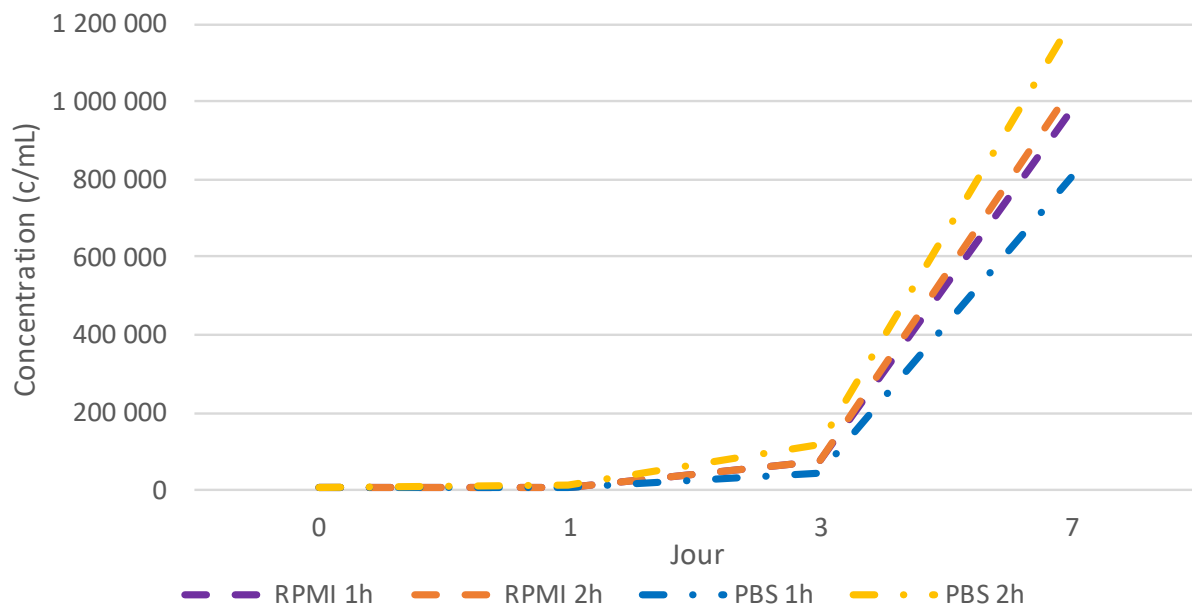


Figure III- 14 : Étude sur une semaine de la prolifération de THP-1 n'ayant pas été filtrés mais soumis aux mêmes conditions que les cellules destinées à la filtration. Remise en culture (en incubateur 37 °C, 5 % de CO₂) à une concentration de 5 000 c/mL (jour 0)

Les trois dernières courbes, en trait plein en Figure III- 15, correspondent aux résultats de prolifération des THP-1 injectées dans le dispositif. Ces cellules, ont été soumises au protocole de préparation comprenant une centrifugation à 1300 RPM pendant 3 minutes suivie d'une remise en suspension dans le milieu d'intérêt et d'une conservation pendant une à deux heures à T_{amb} hors de l'incubateur. Les cellules ont ensuite été injectées à différentes pressions dans le dispositif. Nous avons alors focalisé notre étude sur les cellules récupérées en sortie principale. Chaque courbe en trait plein correspond à un essai avec un couple de pressions : 800/950 mbar (courbe rouge) ou 500/600 (courbe verte) mbar ou 300/350 mbar (courbe



grise). Comme observé dans les deux cas précédents, un phénomène de latence est visible jusqu'au 3^{ème} jour. Il apparaît également que les cellules prolifèrent globalement de la même façon et ce, quel qu'ait été le couple de pressions auquel elles ont été soumises. Ce dernier constat permet de décider du couple de pressions à utiliser lors de futurs essais. En effet, si la pression n'a pas d'influence sur la prolifération des cellules, nous ferons le choix des pressions les plus élevées pour réduire les temps de filtration.

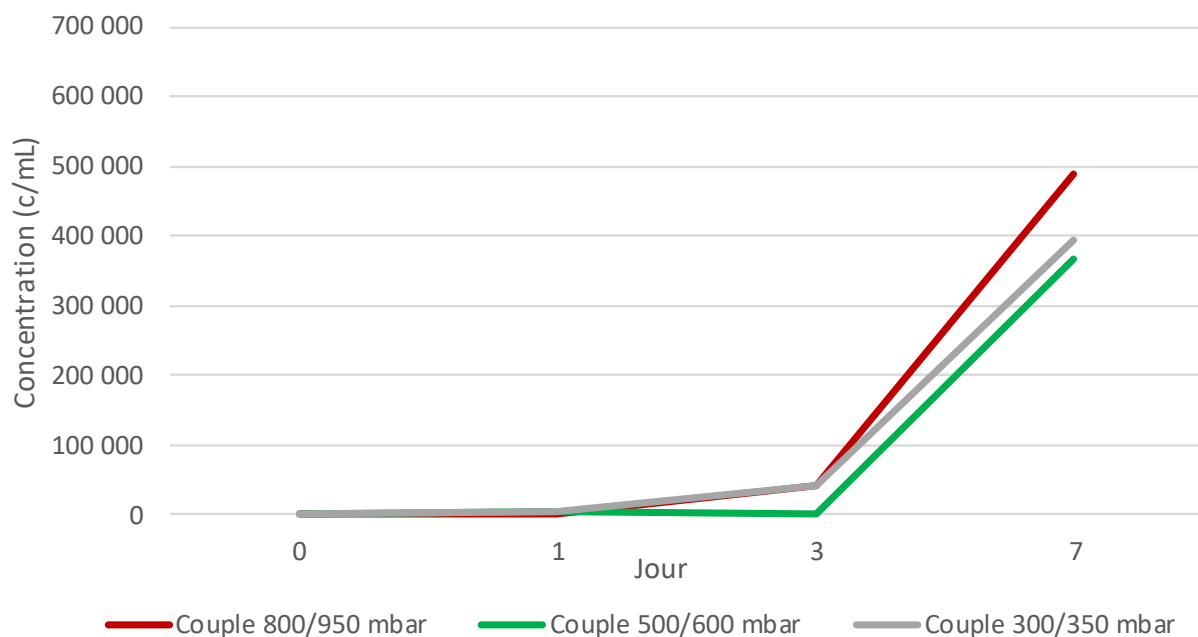


Figure III- 15 : Étude sur une semaine de la prolifération de THP-1 injectées dans la puce microfluidique à différentes pressions. Remise en culture à une concentration de 5 000 c/mL (jour 0)

Pour finir, tous les résultats présentés précédemment ont été rassemblés sur un même graphique (Figure III- 16) pour pouvoir les comparer les uns aux autres. Comme évoqué précédemment, les courbes de prolifération des quatre échantillons « mis en attente » se placent nettement au-dessus de la courbe référence. Il semble alors que notre protocole de préparation des échantillons n'impacte aucunement la prolifération des THP-1. Dans le cas des cellules soumises à la filtration, il apparaît que, quel que soit le couple de pressions appliqué, la prolifération est impactée. Cet impact est caractérisé par le fait que les trois courbes se situent en dessous de la courbe référence (en pointillés rouges).

Ces résultats donnent ainsi accès à une tendance de la prolifération des cellules.

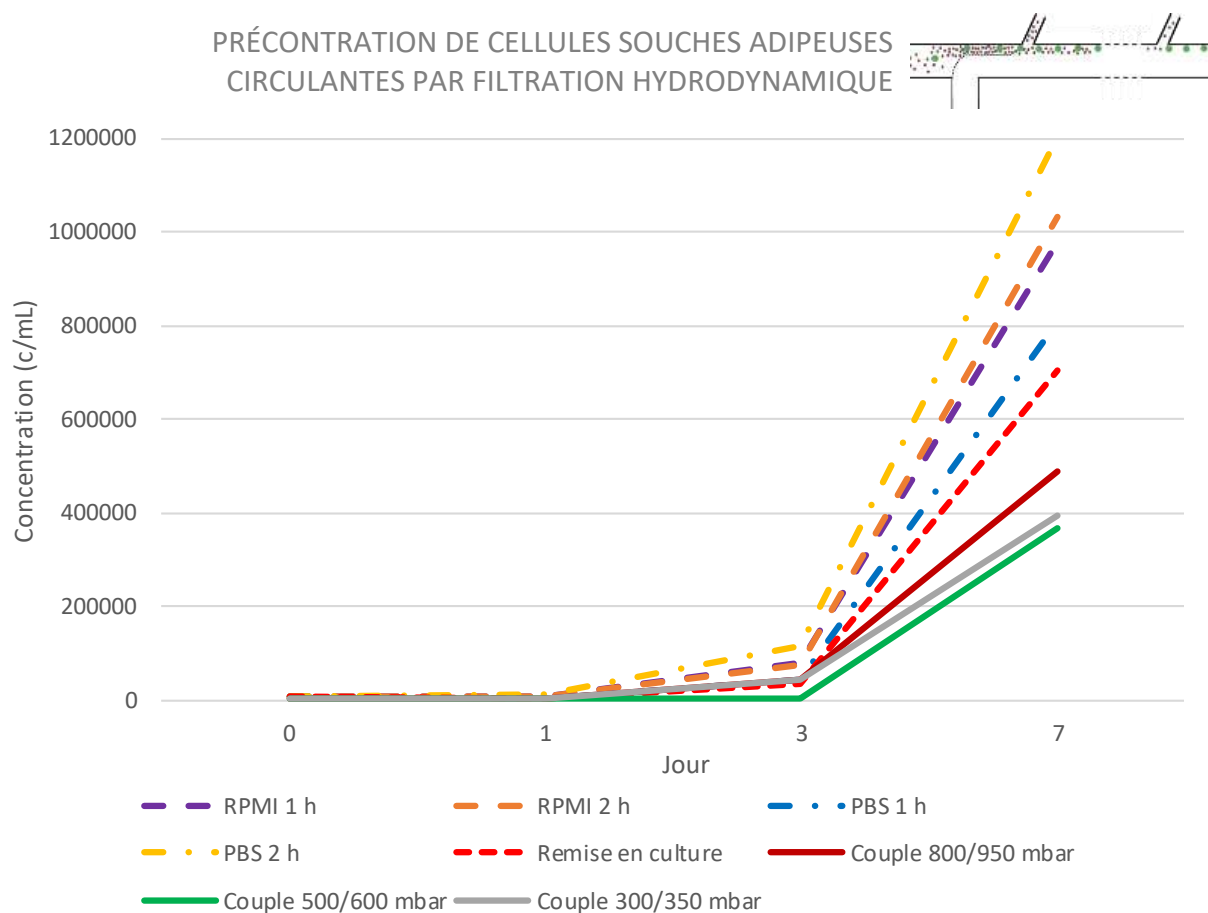


Figure III- 16 : Comparaison de la prolifération, sur une semaine, des THP-1 sur l'ensemble des tests réalisés

En complément de ces résultats, un autre essai de prolifération cellulaire pourrait permettre de confirmer les tendances constatées. Cet essai est basé sur l'observation de la réplication de l'ADN au fil des divisions cellulaires.

III.2.5 Bilan

Ces différentes expériences ont permis de valider dans un premier temps le principe de filtration sur des objets biologiques puisque les cellules de diamètre inférieur à $10\ \mu\text{m}$ sont filtrées par le système. De plus, il est possible de conclure sur l'efficacité du dispositif à filtrer différents types cellulaires. Il apparaît alors que les taux de filtration des globules rouges sont très insuffisants, trop aléatoires. Toutefois, les résultats sont encourageants car les cellules d'intérêt, qu'elles soient fortement concentrées (de l'ordre de $7 \cdot 10^5\ \text{c/mL}$) ou plus faiblement concentrées (de l'ordre de $7 \cdot 10^3\ \text{c/mL}$) ont été entièrement récupérées.

Ces essais permettent également de conclure sur l'impact du protocole de préparation et de la filtration sur les échantillons. Les cellules étant très sensibles au milieu dans lequel elles sont mises en solution, des améliorations ont été apportées pour éviter leur lyse au cours des différentes expériences. Ainsi, le marquage des globules rouges a été retiré du protocole de préparation et les cellules ont été mises en suspension dans un milieu isotonique.

Ces résultats, en particulier les taux de filtration des globules rouges insuffisants, ne sont pas complètement satisfaisants. Pour que l'échantillon d'intérêt soit exploitable, il est nécessaire d'améliorer l'efficacité de filtration de ce premier module. Pour ce faire, nous avons étudié les phénomènes pouvant être à l'origine des taux de filtration insuffisants. Deux phénomènes sont susceptibles d'en être la cause : la *margination* des globules blancs et la saturation des canaux latéraux. Leur influence sera évaluée dans les paragraphes suivants.

III.3 Vérification de l'hypothèse de *margination* des globules blancs

III.3.1 Présentation rapide du phénomène de *margination*

Le mécanisme associé à la *margination* est directement lié à la présence des globules rouges. Ces derniers étant plus déformables que les globules blancs, ils se déplacent vers les champs de cisaillement les plus faibles qui se trouvent au centre des vaisseaux sanguins. Les globules blancs ainsi que les plaquettes, moins déformables, sont alors repoussés vers les parois, ce qui est schématisé en Figure III- 17.

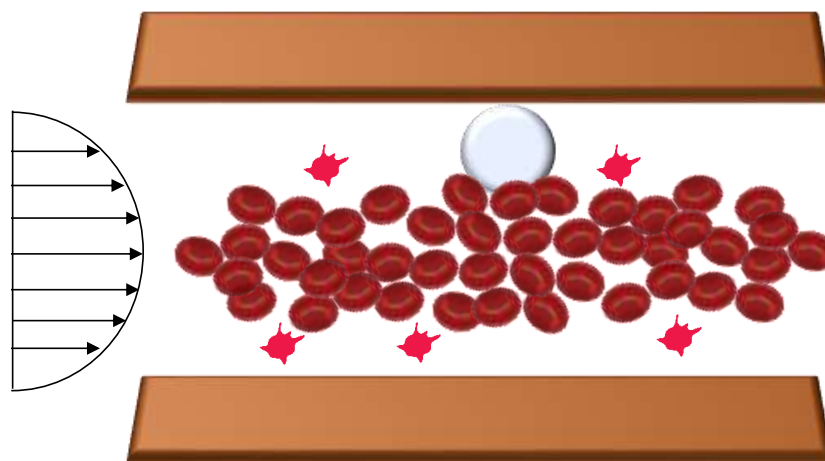
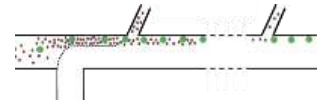


Figure III- 17 : Schématisation du phénomène de *margination* : les globules rouges se déplacent vers le centre du vaisseau sanguin, là où les taux de cisaillement sont les plus faibles, tandis que les plaquettes et globules blancs sont repoussés vers les parois

Ce phénomène, en plus d'être indispensable lors de la réaction inflammatoire, fait l'objet d'une forte attention de la part des médecins, physiciens, mathématiciens et ingénieurs. Cela se justifie notamment par le fait que la *margination* pourrait intervenir dans d'autres mécanismes comme l'hémostase⁶ et que sa compréhension pourrait également permettre d'améliorer les connaissances en libération d'agents médicamenteux dans le corps.

⁶ Hémostase : Arrêt d'une hémorragie.



De nombreuses études aussi bien expérimentales que théoriques ont été menées pour comprendre la physique à l'origine de ce mécanisme⁷⁷⁻⁸⁴. Fahraeus et Lindqvist en sont les pionniers et ont démontré l'influence de certains paramètres (diamètre des capillaires, débit) sur la rhéologie du sang. Il apparaît ainsi que dans le cas de diamètres de capillaires inférieurs à 300 μm (mais supérieurs à 5 μm)⁷⁸, la viscosité du sang décroît en même temps que décroît le diamètre du capillaire⁷⁷. Si, de plus, le débit est élevé, il apparaît que les globules rouges migrent vers le centre des capillaires en induisant la formation d'une couche libre de cellules, ce qui est schématisé en Figure III- 18.

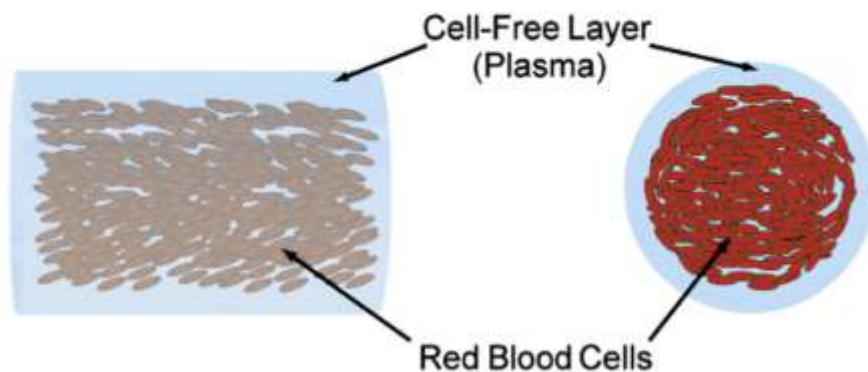


Figure III- 18 : Schéma du sang dans un capillaire. Dans le cas d'une injection de sang à haut débit dans un capillaire de diamètre compris entre 5 et 300 μm , les globules rouges migrent vers le centre du capillaire laissant apparaître, près des parois, une couche déplétée en cellules

Cette migration des cellules vers le centre du vaisseau a pu être expliquée quelques décennies plus tard grâce à la description de forces permettant la migration latérale des cellules : les forces de portance (ou *lift force*). Dès lors, de nombreuses études se sont attachées à décrire le comportement des cellules en intégrant différents paramètres : dimensions des structures, déformabilité ou taille des cellules, hémocrite, débit, etc. Études expérimentales^{79,81} et études théoriques^{80,82-84} ont ainsi permis de montrer l'influence des différents paramètres sur le déplacement des cellules dans des structures microfluidiques.

Afin de déterminer si ce phénomène peut avoir lieu dans nos puces microfluidiques et ainsi être à l'origine des taux de filtration des globules rouges insuffisants que nous avons obtenus, nous avons choisi de simuler le comportement des globules rouges dans un canal microfluidique. L'étude menée est présentée dans le paragraphe suivant.

III.3.2 Analyse de l'impact de la *margination* sur la filtration

Pour cette étude, nous nous sommes inspirés des travaux réalisés par Qi *et al.*⁸⁰. Ces derniers permettent de prédire théoriquement la distribution des globules rouges dans un canal microfluidique en fonction de différents paramètres (hémocrite, dimensions des canaux



microfluidiques, etc.). Parmi ces paramètres, nous nous sommes en particulier intéressés à l'influence de l'hématocrite sur le phénomène de *margination*. Ce choix se justifie par le fait que l'hématocrite est amené à varier au cours de la filtration dans nos puces. En effet, chaque canal latéral prélève une certaine portion de cellules, ce qui entraîne une diminution de la valeur de l'hématocrite à chaque embranchement.

Qi *et al.* ont ainsi montré que la diminution de l'hématocrite entraîne une augmentation du phénomène de *margination*, ce qui est indiqué en Figure III- 19. En effet, la distance entre la paroi du canal et les globules rouges est deux fois plus importante dans le cas d'un hématocrite de 10 % (Figure III- 19 - courbes rouges) que dans le cas d'un hématocrite de 20 % (Figure III- 19 – courbes bleues). Ce résultat indique nettement que la *margination* augmente quand l'hématocrite diminue.

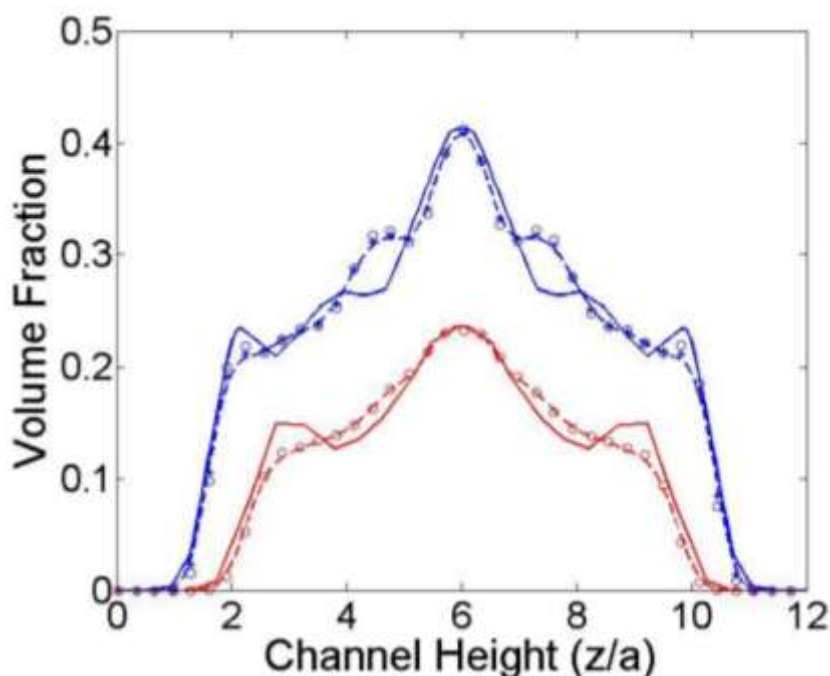


Figure III- 19 : Comparaison de la distribution des globules rouges dans un canal microfluidique rectangulaire dans le cas d'un hématocrite égal à 20 % (courbes bleues) et d'un hématocrite égal à 10 % (courbes rouges)

Ces résultats sont en corrélation avec les résultats expérimentaux présentés par Abitt et Nash⁸⁵. Cette étude, portant sur la détermination de l'influence des propriétés rhéologiques du sang sur la *margination*, la capture et la capacité des leucocytes à rouler sur les parois des vaisseaux sanguins, montre la même tendance. En effet, comme illustré en Figure III- 20, il apparaît que, sur un échantillon sanguin humain mélangé à de l'EDTA, la *margination* est minimale pour un hématocrite de 40 % et est maximale pour un hématocrite de 10 %.

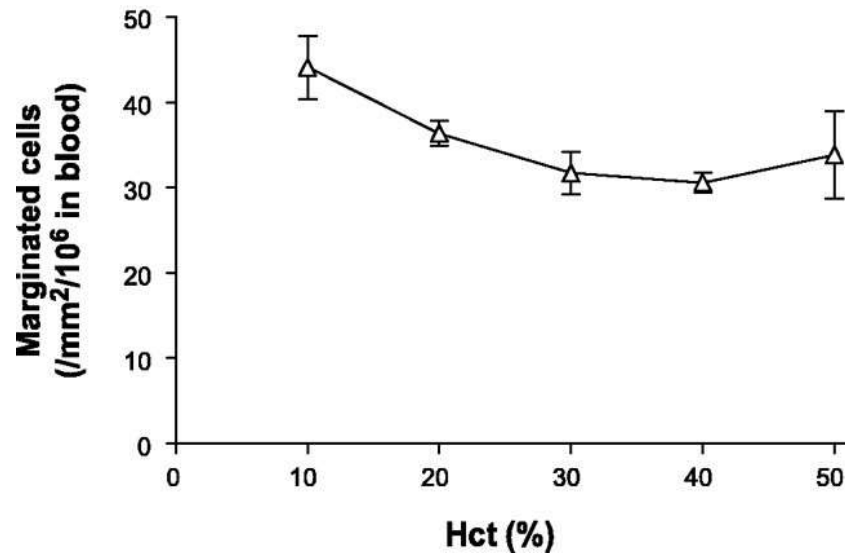
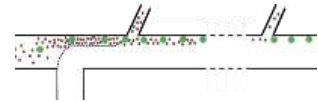


Figure III- 20 : Influence du changement d'hématocrite sur la *margination* des leucocytes. Expériences menées sur du sang humain complet mélangé à de l'EDTA⁸⁵

La question de la *margination* dans nos dispositifs microfluidiques se pose alors : la diminution de l'hématocrite au cours de la filtration peut-elle conduire à l'éloignement des globules rouges des parois des canaux microfluidiques ?

Pour répondre à ce questionnement, nous nous sommes placés dans le cas critique de l'écoulement de quelques globules rouges dans une solution tampon, ce qui correspond aux conditions rencontrées en fin de filtration. Nous avons alors cherché à estimer si, sur la distance entre deux canalisations latérales, soit 400 μm , les globules rouges s'éloignent suffisamment des parois du canal microfluidique pour ne pas être filtrés. Nous nous sommes restreints à cette distance puisqu'une fois parcourue, les cellules sont rapprochées des parois du fait de l'aspiration du fluide par les canaux latéraux.

Nous avons alors calculé le déplacement de sphères rigides de rayon équivalent égal à 2,8 μm (même dimension que celle utilisée par Qi *et al.*⁸⁰) dans un canal microfluidique de largeur égale à 80 μm , soit la largeur de notre canal principal. Pour ce faire, un travail préalable, détaillé en annexe **III-B/ Justification des hypothèses pour la *margination***.

, a permis de déterminer les forces adaptées à notre application. Ainsi, forces de traînée et de portance sont les forces que nous avons appliquées sur les particules. Ce travail a également porté sur la comparaison de différentes expressions de la force de portance afin de déterminer l'expression la plus adaptée. Notre choix s'est porté sur l'expression proposée par Sukumaran et Seifert⁸⁶.

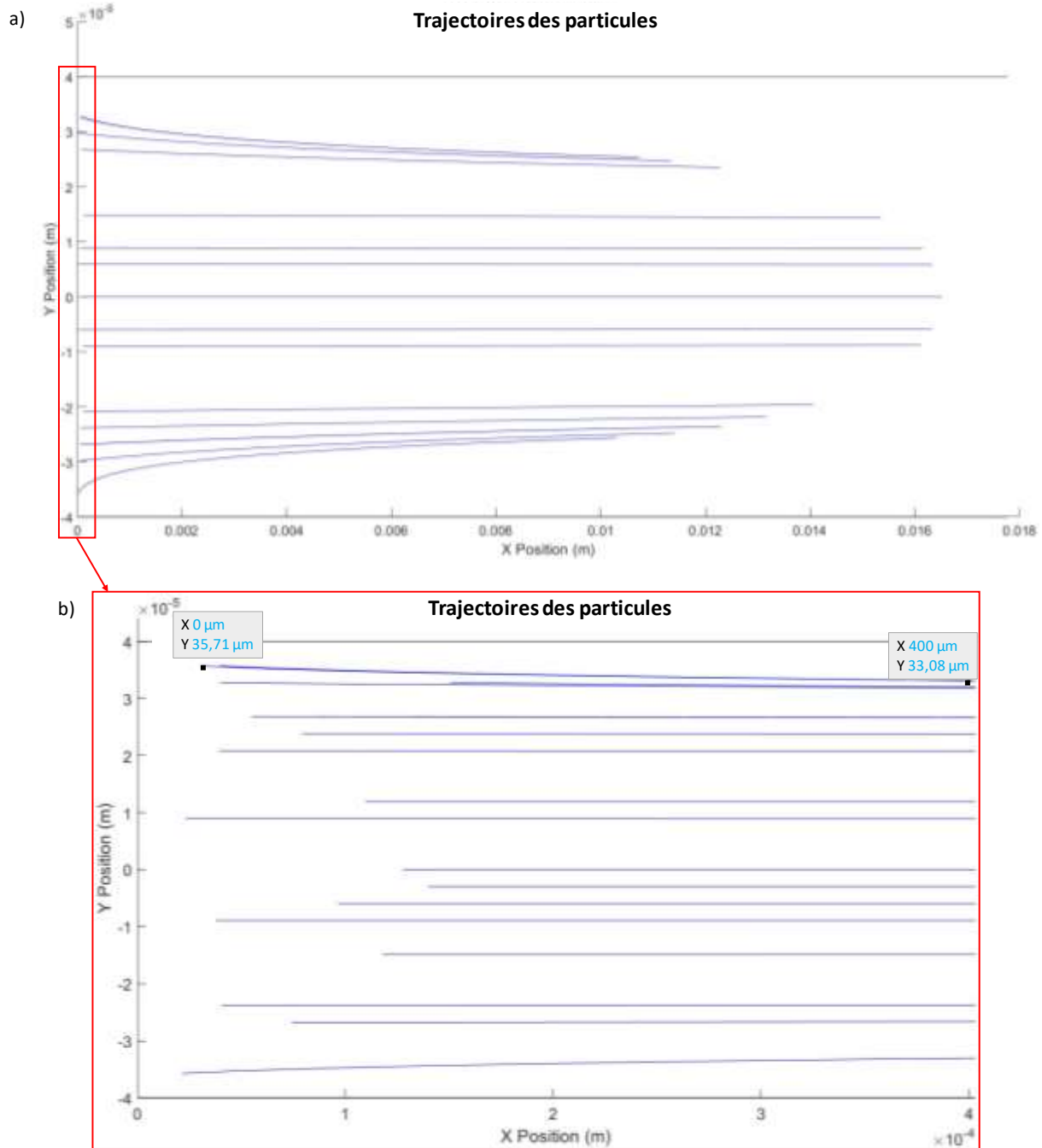
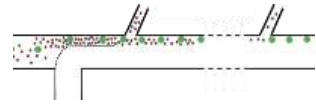


Figure III- 21 : Trajectoires de 20 particules positionnées aléatoirement injectées dans un canal microfluidique de largeur égale à $80\text{ }\mu\text{m}$ à une pression de 800 mbar dans un milieu de viscosité dynamique égale à 1.10^{-3} Pa.s (viscosité dynamique de la solution tampon) – a) Trajectoire des particules sur la longueur totale du canal principal – b) Zoom sur la distance $400\text{ }\mu\text{m}$ (distance entre deux canaux latéraux)

La simulation de l'écoulement de 20 particules, de position initiale aléatoire, en solution dans un milieu de viscosité dynamique égale à 1.10^{-3} Pa.s (viscosité dynamique de l'eau) et injectées à une pression de 800 mbar, a mené à l'obtention des trajectoires illustrées en Figure III- 21. Il apparaît, de façon cohérente, que les particules s'éloignant le plus des parois des canaux



microfluidiques sont celles qui en étaient initialement les plus proches. Nous nous sommes ainsi concentrés sur le déplacement de ces particules. La Figure III- 21- a met en évidence une dynamique générale de migration des particules lente. Un zoom sur la zone correspondant à la distance entre deux canaux latéraux (Figure III- 21- b) met en évidence le fait que les particules, initialement les plus proches des parois, se déplacent d'une distance inférieure à $3\ \mu\text{m}$. Or, pour que ces particules se rendent invisibles des canaux latéraux et ne soient pas aspirées, il aurait fallu qu'elles se déplacent d'au moins $3,2\ \mu\text{m}$. Bien que limite, nous pourrions considérer que le phénomène de *margination* est négligeable et n'impacte pas la filtration.

Pour compléter cette analyse, nous avons fait varier la pression d'entrée entre 100 mbar et 1 bar. Il n'a alors été constaté aucune différence entre les différentes simulations : les particules s'éloignent des parois du canal microfluidique d'une distance inférieure à $3\ \mu\text{m}$ et ce, quelle que soit la pression appliquée.

III.3.3 Bilan

Cette étude, réalisée par simulation, montre que le phénomène de *margination* ou plutôt d'éloignement des globules rouges des parois, dans un canal microfluidique rectangulaire simple, est très faible et ce, quelle que soit la pression appliquée en entrée. Cette étude donne ainsi une tendance quant au comportement des globules rouges et permet de conclure sur le fait qu'il semble très peu probable que la *margination* soit à l'origine des taux de filtration insuffisants obtenus jusqu'à présent.

III.4 Vérification de l'hypothèse de saturation des canaux latéraux

Comme discuté précédemment, le phénomène de *margination* ne semble pas être à l'origine des taux de filtration insuffisants obtenus. Il reste désormais à vérifier si l'hypothèse de saturation des canaux latéraux peut justifier de tels résultats. Pour ce faire, nous avons choisi d'augmenter la capacité de filtration du dispositif en augmentant le nombre de canaux latéraux.

Cette partie présente ainsi le nouveau dispositif développé, comprenant un nombre de canaux latéraux bien supérieur au précédent dispositif. Cette partie présentera également les résultats de filtration obtenus avec ce nouveau design.

III.4.1 Dimensionnement d'un dispositif à 100 canalisations latérales

Afin de vérifier si la saturation des canaux latéraux est effectivement à l'origine des faibles taux de filtration, le nombre de canalisations secondaires a ainsi été fortement augmenté, passant de 30 à 100.



De nombreuses améliorations ont dû être apportées pour adapter le dispositif à une telle augmentation du nombre de canaux latéraux. Pour commencer, certaines dimensions du design précédent ont été conservées : largeur et hauteur du canal principal (respectivement de 80 et 40 μm), largeur et hauteur des canaux latéraux (respectivement de 30 et 40 μm), distance entre les canaux latéraux (300 μm de centre à centre) ainsi que le nombre d'entrées (deux au total) et de sorties (une principale et deux latérales). Pour pouvoir accueillir autant de canaux latéraux, la longueur du canal principal a dû être fortement augmentée. De cette dernière modification a découlé la modification de la longueur totale de la puce. La largeur a également été adaptée pour permettre l'intégration des 100 canaux latéraux et en particulier des différentes longueurs. La largeur initialement de 1,5 cm a été augmentée à 2,2 cm ; la longueur est passée quant à elle de 2 cm à 4,3 cm. De tels changements ont nécessité d'ajuster le support de puce pour qu'il soit adapté à ces nouvelles dimensions. Tous ces ajustements ont été effectués de sorte à pouvoir conserver le même protocole de fabrication. Les puces ont ainsi été fabriquées selon le protocole décrit en II.2.4. Le design du dispositif final est indiqué en Figure III- 22.

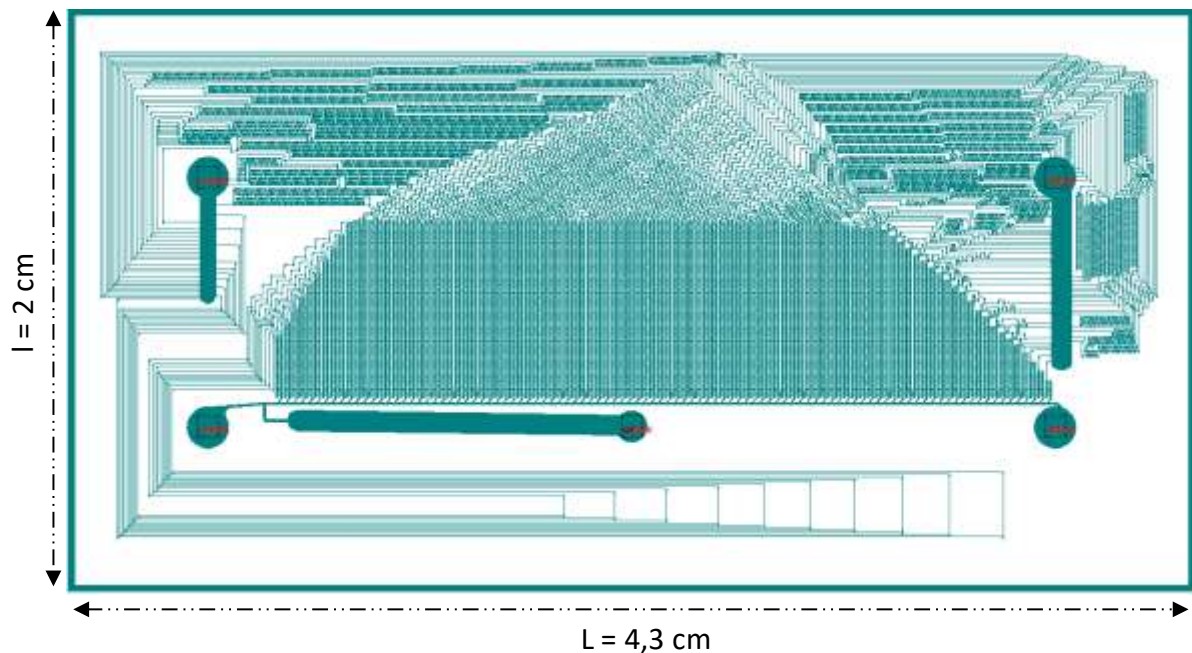
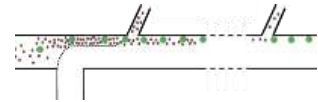


Figure III- 22 : Design réalisé sous CleWin 5 de la version améliorée comportant 100 canaux latéraux

Les longueurs des canalisations latérales alors calculées sont rassemblées dans le Tableau III- 6. Sont également rassemblés dans ce tableau les débits associés à chaque canal latéral dans le cas où le fluide considéré est l'eau (pour rappel, de viscosité dynamique $\eta = 1.10^{-3} \text{ Pa.s}$) et dans le cas d'une pression initiale égale à 767 mbar, pression que nous avons utilisée pour toutes les expériences qui seront décrites par la suite.



N°	L (mm)	Débit (μL/s)	N°	L (mm)	Débit (μL/s)	N°	L (mm)	Débit (μL/s)	N°	L (mm)	Débit (μL/s)
1	259,675	1,08.10 ⁻²	26	219,755	8,13.10 ⁻³	51	166,811	6,13.10 ⁻³	76	96,595	4,62.10 ⁻³
2	258,285	1,07.10 ⁻²	27	217,912	8,04.10 ⁻³	52	164,367	6,06.10 ⁻³	77	93,353	4,57.10 ⁻³
3	256,879	1,05.10 ⁻²	28	216,047	7,95.10 ⁻³	53	161,894	5,99.10 ⁻³	78	90,074	4,52.10 ⁻³
4	255,458	1,04.10 ⁻²	29	214,162	7,86.10 ⁻³	54	159,394	5,93.10 ⁻³	79	86,758	4,47.10 ⁻³
5	254,020	1,03.10 ⁻²	30	212,255	7,77.10 ⁻³	55	156,865	5,86.10 ⁻³	80	83,404	4,42.10 ⁻³
6	252,566	1,02.10 ⁻²	31	210,327	7,69.10 ⁻³	56	154,308	5,79.10 ⁻³	81	80,012	4,37.10 ⁻³
7	251,096	1,01.10 ⁻²	32	208,377	7,60.10 ⁻³	57	151,721	5,73.10 ⁻³	82	76,582	4,32.10 ⁻³
8	249,608	9,96.10 ⁻³	33	206,404	7,51.10 ⁻³	58	149,105	5,67.10 ⁻³	83	73,112	4,27.10 ⁻³
9	248,104	9,85.10 ⁻³	34	204,409	7,43.10 ⁻³	59	146,459	5,60.10 ⁻³	84	69,604	4,22.10 ⁻³
10	246,583	9,74.10 ⁻³	35	202,392	7,35.10 ⁻³	60	143,784	5,54.10 ⁻³	85	66,055	4,18.10 ⁻³
11	245,045	9,63.10 ⁻³	36	200,352	7,26.10 ⁻³	61	141,078	5,48.10 ⁻³	86	62,466	4,13.10 ⁻³
12	243,489	9,52.10 ⁻³	37	198,288	7,18.10 ⁻³	62	138,341	5,41.10 ⁻³	87	58,836	4,08.10 ⁻³
13	241,915	9,42.10 ⁻³	38	196,201	7,10.10 ⁻³	63	135,573	5,35.10 ⁻³	88	55,166	4,04.10 ⁻³
14	240,323	9,31.10 ⁻³	39	194,090	7,02.10 ⁻³	64	132,774	5,29.10 ⁻³	89	51,453	3,99.10 ⁻³
15	238,714	9,21.10 ⁻³	40	191,955	6,94.10 ⁻³	65	129,942	5,23.10 ⁻³	90	47,698	3,95.10 ⁻³
16	237,086	9,10.10 ⁻³	41	189,796	6,86.10 ⁻³	66	127,079	5,18.10 ⁻³	91	43,901	3,90.10 ⁻³
17	235,440	9,00.10 ⁻³	42	187,613	6,79.10 ⁻³	67	124,183	5,12.10 ⁻³	92	40,060	3,86.10 ⁻³
18	233,775	8,90.10 ⁻³	43	185,405	6,71.10 ⁻³	68	121,255	5,06.10 ⁻³	93	36,176	3,82.10 ⁻³
19	232,091	8,80.10 ⁻³	44	183,171	6,64.10 ⁻³	69	118,293	5,00.10 ⁻³	94	32,248	3,77.10 ⁻³
20	230,387	8,70.10 ⁻³	45	180,913	6,56.10 ⁻³	70	115,297	4,95.10 ⁻³	95	28,275	3,73.10 ⁻³
21	228,665	8,60.10 ⁻³	46	178,628	6,49.10 ⁻³	71	112,267	4,89.10 ⁻³	96	24,257	3,69.10 ⁻³
22	226,923	8,51.10 ⁻³	47	176,318	6,41.10 ⁻³	72	109,203	4,84.10 ⁻³	97	20,193	3,65.10 ⁻³
23	225,161	8,41.10 ⁻³	48	173,981	6,34.10 ⁻³	73	106,104	4,78.10 ⁻³	98	16,083	3,61.10 ⁻³
24	223,379	8,32.10 ⁻³	49	171,618	6,27.10 ⁻³	74	102,970	4,73.10 ⁻³	99	11,927	3,57.10 ⁻³
25	221,577	8,22.10 ⁻³	50	169,228	6,20.10 ⁻³	75	99,801	4,68.10 ⁻³	100	7,723	3,53.10 ⁻³

Tableau III- 6 : Longueurs des canalisations secondaires dans le cas d'un dispositif avec 30 canaux latéraux



Le débit total théorique dans les canalisations latérales est égal à $6,50.10^{-1} \mu\text{L/s}$ soit $39,0 \mu\text{L/min}$. Le débit théorique en sortie principale est de $3,10.10^{-1} \mu\text{L/s}$ soit $18,6 \mu\text{L/min}$. Il apparaît dans ce cas que le volume obtenu en sortie latérale est plus de deux fois plus important que le volume obtenu en sortie principale. Ce constat est positif puisqu'il indique que la capacité de filtration du système a été augmentée. De plus, les objets d'intérêt étant recueillis en sortie principale, il est utile que le volume de l'échantillon soit suffisamment important pour être traité par l'utilisateur ou un autre dispositif mais aussi suffisamment faible pour être traité rapidement.

Ce nouveau dispositif se démarque ainsi de façon positive de son prédécesseur. En effet, pour rappel, dans le cas du précédent dispositif, le débit total théorique dans les canalisations latérales était de $6,17.10^{-1} \mu\text{L/s}$ soit $37,0 \mu\text{L/min}$. Le débit théorique en sortie principale était quant à lui de $1,53 \mu\text{L/s}$ soit $91,7 \mu\text{L/min}$. Le volume obtenu en sortie principale était dans ce cas près de trois fois supérieur au volume obtenu en sortie latérale. L'échantillon d'intérêt était bien plus dilué, ce qui ne présentait que peu d'intérêt et pouvait même constituer un inconvénient pour son traitement par un deuxième dispositif. Le dispositif optimisé est donc bien plus avantageux puisqu'il fournit des échantillons plus facilement exploitables.

Les paragraphes suivants permettront de déterminer si cette augmentation de capacité de filtration permet d'améliorer les taux de filtration.

III.4.2 Analyse qualitative de la filtration

Afin de déterminer les différences entre une filtration avec un dispositif comportant 30 canaux et un autre dispositif en comportant 100, des expériences ont été réalisées en parallèle sur les deux types de puce. Cette première analyse, qualitative, de la capacité des puces à filtrer les éléments biologiques de diamètre inférieur à $10 \mu\text{m}$ a été réalisée sur un échantillon de sang humain complet non dilué.

L'expérience a ainsi consisté en l'injection de 1 mL de sang complet à une pression de 800 mbar dans les puces comportant 30 canaux latéraux. La solution tampon (PBS 1x) a quant à elle été injectée à une pression de 950 mbar dans ces mêmes dispositifs. Le couple de pressions a dû être adapté pour optimiser la filtration dans les puces comportant 100 canaux latéraux. L'échantillon a dans ce cas été injecté à une pression de 719 mbar et la solution tampon (du PBS 1x) a été injectée à une pression de 767 mbar .

Il s'est tout d'abord avéré que les temps de filtration ne diffèrent que très peu d'un dispositif à l'autre. En effet, 2 heures et 20 minutes ont été nécessaires pour filtrer 1 mL dans le premier dispositif et 2 heures et 30 minutes ont permis de filtrer le même volume dans le second dispositif. Le temps de filtration n'influera aucunement sur le choix de dispositif à faire entre celui comportant 30 canaux latéraux et celui en comportant 100.

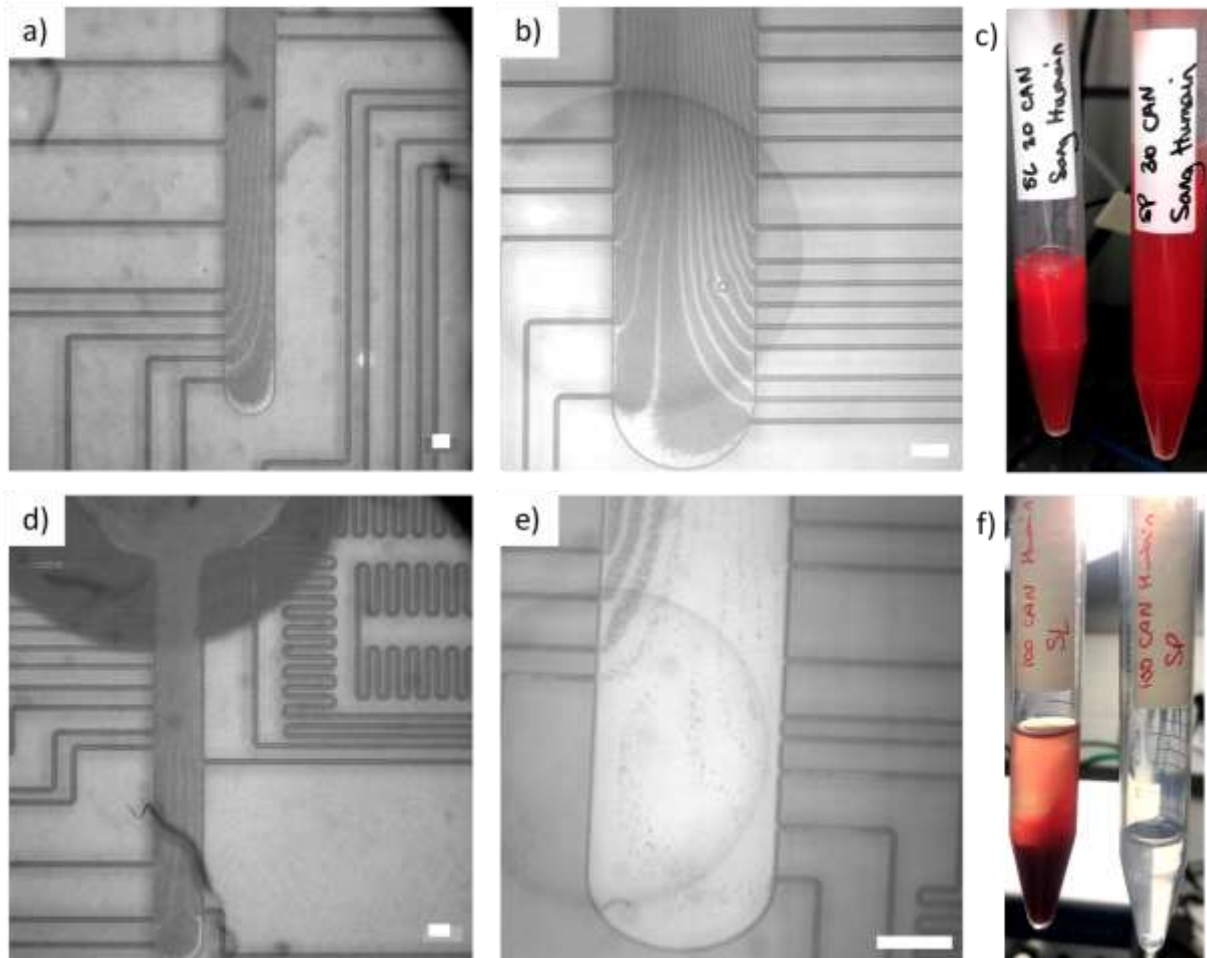
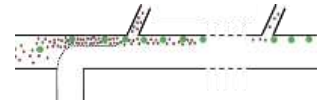


Figure III- 23 : Observation de la filtration d'un échantillon sanguin complet non dilué dans deux puces microfluidiques comportant 30 ou 100 canaux latéraux (la barre représente une échelle de 100 μ m) – Les 3 images du haut correspondent à la filtration dans les puces comportant 30 canaux latéraux - a) Première sortie latérale qui sature en globules rouges – b) Deuxième sortie latérale qui sature également en globules rouges – c) Échantillons obtenus après filtration de sang humain complet *via* les sorties latérales : à gauche sortie latérale et à droite sortie principale. Il reste encore énormément de globules rouges dans l'échantillon d'intérêt – Les 3 images du bas correspondent à la filtration dans les puces comportant 100 canaux latéraux – d) Première sortie latérale saturant en globules rouges – e) Deuxième sortie latérale qui ne sature pas en globules rouges – f) Échantillons obtenus après filtration de sang humain complet *via* les sorties latérales : à gauche sortie latérale et à droite sortie principale. L'échantillon d'intérêt semble être totalement nettoyé des globules rouges

La comparaison a ensuite porté sur la capacité de filtration de chacun des dispositifs. Les résultats des observations des deux filtrations sont imagés en Figure III- 23. Les Figure III- 23- a, Figure III- 23- b et Figure III- 23- c correspondent à la filtration dans une puce comportant 30 canaux latéraux. Les Figure III- 23- d, Figure III- 23- e et Figure III- 23- f correspondent quant à elles à la filtration dans une puce comportant 100 canaux.



Il apparaît très nettement que la filtration est bien plus efficace avec les puces comportant 100 canaux latéraux. En effet, les Figure III- 23- a et Figure III- 23- b montrent que les deux sorties latérales sont complètement saturées et sont dans l'incapacité de filtrer plus de cellules. Au contraire, les Figure III- 23- d et Figure III- 23- e, montrent une première sortie latérale saturée en globules rouges et une deuxième sortie latérale très peu occupée par les globules rouges. Ces premières observations laissent imaginer que la capacité de filtration est fortement augmentée avec le nouveau dispositif. Cette hypothèse se vérifie *via* l'observation des échantillons obtenus après filtration. La Figure III- 23- c montre que les globules rouges se retrouvent aussi bien en sortie latérale qu'en sortie principale. Cela est en cohérence avec les taux de filtration (insuffisants) des premiers dispositifs calculés précédemment en **III.2.4.1**. La Figure III- 23- f montre quant à elle deux échantillons complètement différents. Le premier, issu de la filtration par les 100 canaux latéraux, apparaît fortement enrichi en globules rouges tandis que le deuxième est limpide. Il semble donc que l'intégralité des globules ait été filtrée par le dispositif.

L'observation des Figure III- 23- c et Figure III- 23- f valide également les prédictions des volumes obtenus (se référer aux parties **III.2.2** et **III.4.1**) dans les deux dispositifs : le volume obtenu en sortie latérale du dispositif comprenant 30 canalisations latérales est bien 3 fois plus faible que le volume obtenu en sortie principale. Dans le cas du dispositif en comptant 100, le volume obtenu en sortie latérale est bien 2 fois plus important que celui obtenu en sortie principale. Ces images permettent enfin d'affirmer que la filtration n'a pas entraîné de lyse cellulaire.

Ces premières observations sont très encourageantes mais doivent être validées par un calcul des taux de filtration.

III.4.3 Analyse quantitative de la filtration : détermination des taux de filtration

Les observations réalisées précédemment laissent ainsi imaginer que les taux de filtration dans les dispositifs comportant 100 canaux latéraux s'approchent des 100 %. Les taux de filtration ont ainsi été calculés et une comparaison a de nouveau été faite entre les deux dispositifs. Les expériences ont porté sur des échantillons de sang humain dilués au 25^{ème} et des échantillons sanguins complets.

Les quatre expériences ont été réalisées selon les mêmes conditions que celles évoquées au paragraphe précédent. De plus, comme évoqué précédemment, il est difficile de distinguer globules rouges et globules blancs lors du comptage c'est pourquoi les comptages, réalisés au Coulter Counter Z2, concernent toutes les cellules de diamètre inférieur à 10 μm et pas seulement les globules rouges.

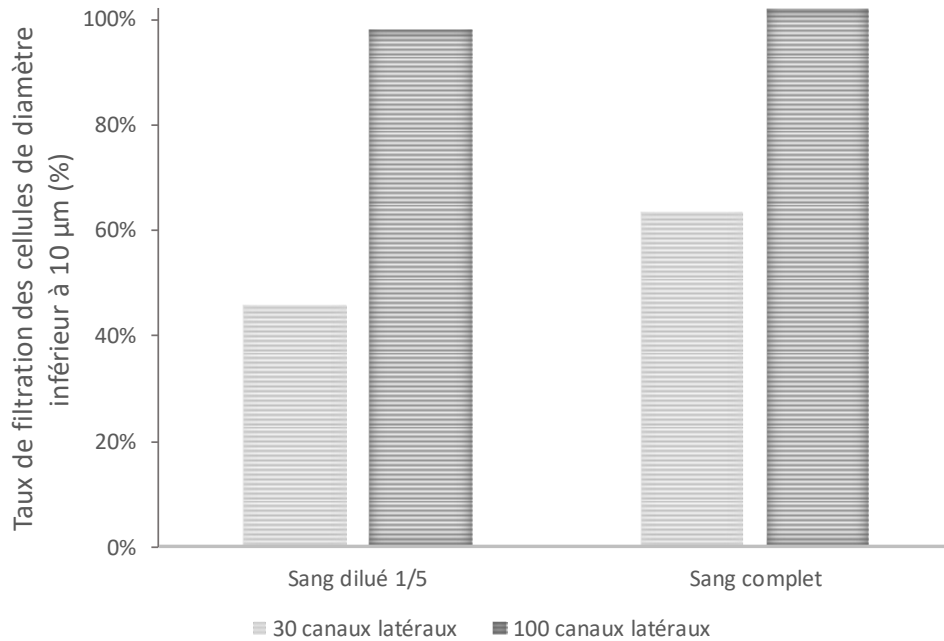
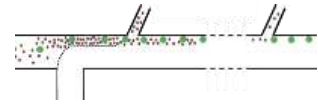


Figure III- 24 : Comparaison des résultats de filtrations d'un sang dilué (au 25^{ème}) et d'un sang complet non dilué dans les dispositifs comportant 30 et 100 canaux latéraux

Les résultats des quatre filtrations sont rassemblés dans le graphique en Figure III- 24. A nouveau, ces résultats indiquent que les taux de filtration sont insuffisants dans le cas des dispositifs intégrant 30 canaux latéraux. Que ce soit avec le sang dilué (taux de filtration égal à 45 %) ou avec le sang complet (taux de filtration égal à 63 %), les résultats ne sont pas satisfaisants et montrent que nous obtenons un échantillon non exploitable. Au contraire, les résultats prouvent que les taux de filtration ont été fortement améliorés avec les dispositifs comprenant 100 canaux latéraux. Que ce soit avec le sang dilué ou avec le sang complet, le taux de filtration est supérieur à 99,9 %. Quelques globules rouges restent dans le canal principal mais ils représentent moins de 0,1 % du nombre initial en globules rouges. Ces expériences ont été renouvelées à plusieurs reprises sur différentes puces et les résultats sont parfaitement reproductibles : le taux de filtration des éléments de diamètre inférieur à 10 µm dépasse toujours les 99,9 %.

Ces résultats, extrêmement positifs ont été complétés par une analyse des échantillons obtenus au FACS. Ces tests ont cette fois porté sur du sang murin et du sang humain complets.

III.4.4 Vérification par analyse FACS des espèces cellulaires en présence après filtration

L'objectif final étant de récupérer en sortie du dispositif les cellules d'intérêt (les ASCs mélangées à certains leucocytes), il est important de déterminer quelles sont les cellules en présence dans les différents échantillons récoltés une fois la filtration terminée. Ainsi, cette



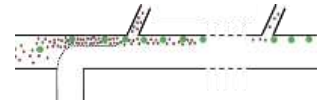
analyse a non pas pour but de quantifier les taux de filtration des globules rouges ou de récupération des leucocytes/ASCs mais plutôt de déterminer quels sont les types cellulaires en présence dans les différents échantillons. Les expériences qui sont présentées dans cette partie doivent répondre à diverses questions : les globules rouges sont-ils suffisamment filtrés ? Quelles sont les cellules restant dans l'échantillon récolté en sortie principale ? L'échantillon obtenu après filtration est-il exploitable par les biologistes ?

Pour y répondre, des échantillons sanguins, murins et humains complets, ont été injectés aussi bien dans les dispositifs comportant 30 canaux latéraux que dans les dispositifs comportant 100 canaux latéraux. Le sang murin a été prélevé sur deux souris au STROMA^{lab} : 700 μ L de sang complet mélangé à de l'EDTA (pour éviter la coagulation) ont été prélevés à partir de chacune des souris. Le sang humain a été fourni par l'EFS : les 4 mL de sang complet contiennent également de l'EDTA pour éviter la coagulation. Afin de garantir la viabilité des cellules, éviter qu'elles ne lysent pendant et/ou après la filtration, nous avons choisi d'utiliser le S.A.G. Mannitol comme solution tampon.

Dans le cas d'une filtration dans les puces comportant 30 canalisations latérales, les pressions appliquées sont respectivement de 800 mbar et 950 mbar pour l'échantillon et le tampon. Dans le cas d'une filtration dans les puces comportant 100 canalisations latérales, les pressions appliquées sont respectivement de 719 mbar et 767 mbar pour l'échantillon et la solution tampon.

Un premier constat peut être fait sur les temps de filtration des deux types d'échantillon. Pour un même volume filtré, les temps de filtration des échantillons murins sont plus courts que ceux obtenus après filtration des échantillons humains. En effet, pour filtrer 700 μ L de sang de souris complet, 48 minutes sont nécessaires *via* le dispositif comportant 30 canaux latéraux et 55 minutes pour celui en comportant 100. Pour filtrer 700 μ L de sang humain complet, 1 h 20 minutes sont nécessaires dans le dispositif comportant 30 canaux latéraux et 1 h 50 minutes dans celui en comportant 100. Ce premier constat peut être expliqué par le fait que la viscosité du sang de souris est moins élevée que la viscosité du sang humain⁸⁷. La viscosité ayant un effet sur les débits, il apparaît cohérent que dans les mêmes conditions de filtration, les temps de filtration ne soient pas les mêmes pour les deux échantillons.

Une fois encore, la comparaison a été faite sur les échantillons obtenus après filtration. La Figure III- 25 rassemble les résultats des quatre filtrations. A gauche sont rassemblés les échantillons récoltés après filtration dans les dispositifs comportant 30 canaux latéraux et à droite les échantillons récoltés après filtration dans les dispositifs comportant 100 canaux latéraux. La différence d'efficacité de filtration est à nouveau nettement visible : dans les puces comportant 30 canaux latéraux, les globules rouges sont présents en grande quantité, aussi bien en sortie latérale qu'en sortie principale. Au contraire, les globules rouges sont



totalemment absents des échantillons obtenus en sortie principale des puces comportant 100 canaux latéraux et ont été totalement filtrés et collectés en sortie latérale.

Un autre constat positif peut être fait : aucune lyse des globules rouges n'est visible. En effet, les globules rouges sédimentent naturellement (particulièrement visible en Figure III- 25- a et Figure III- 25- d).

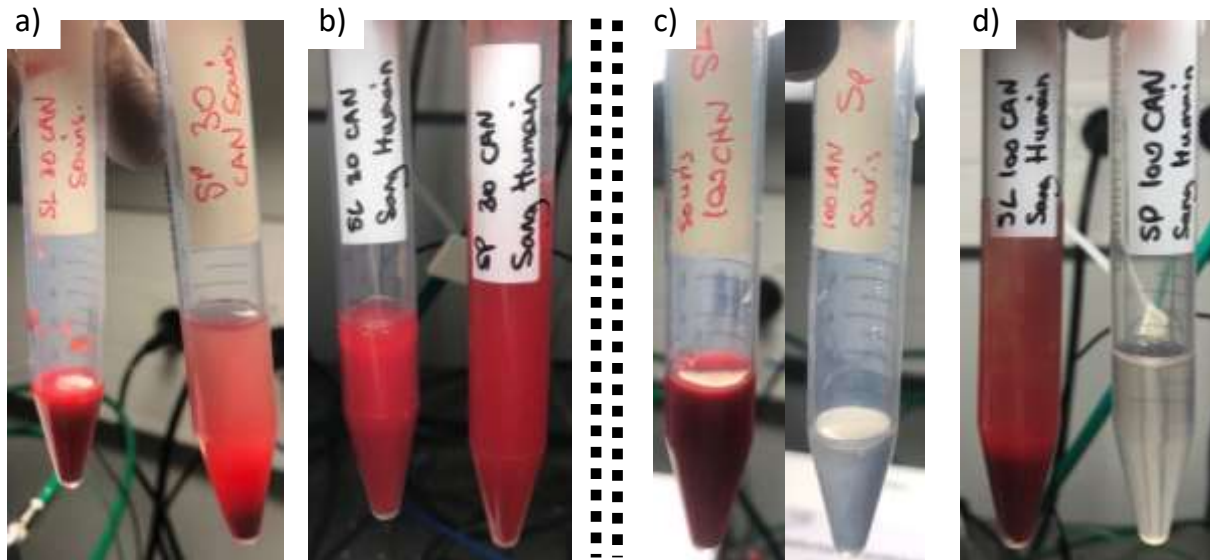


Figure III- 25 : Comparaison des filtrations – a) et b) Filtration dans les dispositifs comportant 30 canaux latéraux de sang de souris complet (a) et de sang humain complet (b) – c) et d) Filtration dans les dispositifs comportant 100 canaux latéraux de sang de souris complet (c) et de sang humain complet (d)

Forts de ces constats, nous avons effectué une analyse par FACS afin de déterminer quels sont les types cellulaires présents dans les divers échantillons récoltés.

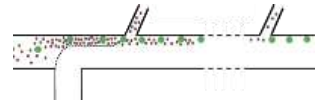
Pour effectuer l'analyse, plusieurs types cellulaires ont été marqués. Les globules rouges et les leucocytes ont ainsi été ciblés par des anticorps marqués en fluorescence et parmi les leucocytes, les lymphocytes ont été doublement ciblés. Que ce soit pour les cellules murines ou humaines, les leucocytes ont été ciblés avec des anticorps anti-CD45, APC (longueurs d'onde d'excitation/émission : 650/660 nm) et les lymphocytes ont été en plus ciblés par des anticorps anti-CD3, PE (longueurs d'onde d'excitation/émission : 496/578 nm). Le marquage des globules rouges a quant à lui différé entre les deux espèces. Dans le cas des cellules humaines, le marquage des globules rouges a été réalisé avec l'anticorps anti-humain CD235a, BV421 (longueurs d'onde d'excitation/émission : 407/421 nm). Enfin, dans le cas des cellules murines, le marquage des globules rouges a été réalisé avec l'anticorps anti-souris Ter 119, Vioblue (longueurs d'onde d'excitation/émission : 401/452 nm). Pour ce marquage, les anticorps et les cellules ont été mis en solution dans un milieu tampon adapté à l'analyse FACS

(pour rappel, PBS 1x, 2-5 % de BSA, 2mM d'EDTA et 2 mM de NaN₃) pendant 25 minutes à 4 °C. En parallèle des échantillons marqués, des échantillons de contrôle, permettant la calibration de l'appareil, ont été préparés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

Une fois les cellules marquées, les anticorps ont été retirés du milieu et les cellules ont été remises en suspension en milieu tampon adapté au FACS. Les résultats des analyses FACS du sang humain sont rassemblés en Figure III- 26 et Figure III- 29. La Figure III- 26 rassemble les résultats de la filtration dans le dispositif comportant 30 canaux latéraux tandis que la Figure III- 29 rassemble les résultats de la filtration dans le dispositif comportant 100 canaux latéraux. Les résultats des filtrations du sang de souris sont quant à eux rassemblés en annexe **III-C/ Résultats FACS après filtration de sang de souris**.

Dans notre cas, les analyses des résultats fournis par le FACS sont réalisées à partir de quatre fenêtres qui correspondent aux différentes populations de cellules constituant l'échantillon et d'une légende qui donne accès aux pourcentages des différents types cellulaires présents dans l'échantillon. La fenêtre en haut à gauche correspond à la population entière : elle rassemble tous les événements analysés par l'appareil. Ces événements peuvent être divisés en deux catégories : les cellules, points rouges et les débris, points noirs. Seules les cellules ont une importance c'est pourquoi les débris n'ont pas été pris en considération et ne sont pas représentés dans les trois autres fenêtres. Les trois autres fenêtres permettent, grâce au marquage et à l'analyse de la granularité de déterminer les différents types cellulaires. Chaque fenêtre correspond à un fluorochrome qui lui-même correspond à un anticorps et donc à une population cellulaire. L'axe des abscisses (qui correspond à un fluorochrome) permet de déterminer quelles sont les cellules ayant répondu de façon positive à l'excitation. Ainsi, les événements cellulaires inclus dans la fenêtre sont dits positifs et correspondent à la population cellulaire ciblée tandis que les populations de cellules se trouvant hors de la fenêtre sont négatives et correspondent aux autres types cellulaires. L'axe des ordonnées (qui se réfère à la granularité) permet d'affiner l'analyse et a un rôle très important dans la distinction des globules blancs.

Dans le cas d'une filtration *via* un dispositif comprenant 30 canaux latéraux (Figure III- 26), les résultats du FACS confirment les observations précédemment réalisées. Tout d'abord, d'un point de vue purement qualitatif, il apparaît que les globules rouges, marqués par l'anticorps anti-CD235a, sont présents aussi bien en sortie principale qu'en sortie latérale (fenêtres A en Figure III- 26- a et Figure III- 26- b). La filtration des petites cellules (notamment les globules rouges) ne semble alors que très peu efficace. Les globules blancs, marqués par l'anticorps anti-CD45, comprenant les lymphocytes marqués avec l'anticorps anti-CD3, semblent quant à eux être présents, en faible quantité, seulement en sortie principale (fenêtres B et C en Figure III- 26- a et Figure III- 26- b).



Afin d'affiner l'analyse, nous avons calculé les pourcentages des différents types cellulaires en présence dans les deux échantillons obtenus après filtration : les résultats associés sont rassemblés en Figure III- 27. Les pourcentages ainsi indiqués correspondent au nombre de cellules de chaque type cellulaire analysées rapporté au nombre total d'événements analysés dans l'échantillon.

Il apparaît tout d'abord que le nombre total de cellules analysées est le même dans les deux cas. Les échantillons ayant été traités de la même façon dans le FACS, nous pouvons en déduire que l'échantillon obtenu en sortie principale est aussi riche en cellules que l'échantillon obtenu en sortie latérale. Bien que ces échantillons soient similaires (en termes de nombre de cellules les constituant), leur composition diffère. Nous avons ainsi cherché à déterminer la répartition des populations cellulaires dans ces échantillons pour en déterminer la composition finale.

Pour commencer, nous avons calculé la proportion en éléments analysés mais non marqués (notés « autres »). Ces éléments peuvent correspondre à des cellules mortes, à des débris cellulaires et donc à des éléments qui ne représentent pas d'intérêt. Malgré tout, il apparaît que la proportion en événements « autres » soit la même dans les deux échantillons. Une fois encore, il apparaît que les deux échantillons sont très similaires mais il reste à déterminer la répartition en globules rouges et globules blancs pour le confirmer.

Les résultats présentés indiquent alors que les globules rouges sont présents aussi bien en sortie latérale qu'en sortie principale : la proportion en globules rouges est similaire dans les deux cas. En effet, sur un total de cellules analysées similaire, la proportion en globules dans un cas comme dans l'autre est proche des 40 %. Ces résultats permettent également de quantifier l'enrichissement en globules blancs. En effet, les sorties latérales prélèvent 0,2 % de globules blancs tandis que la sortie principale récolte 0,6 % de globules blancs. Il y a donc trois fois plus de globules blancs en sortie principale qu'en sortie latérale, ce qui correspond à un enrichissement en globules blancs. Cependant, les globules blancs représentent à peine plus de 1 % des cellules constituant l'échantillon d'intérêt (obtenu en sortie principale). Bien que ces dispositifs permettent d'enrichir l'échantillon d'intérêt en globules blancs, l'enrichissement est faible et le pourcentage en globules rouges est encore trop important pour que l'échantillon soit exploitable.

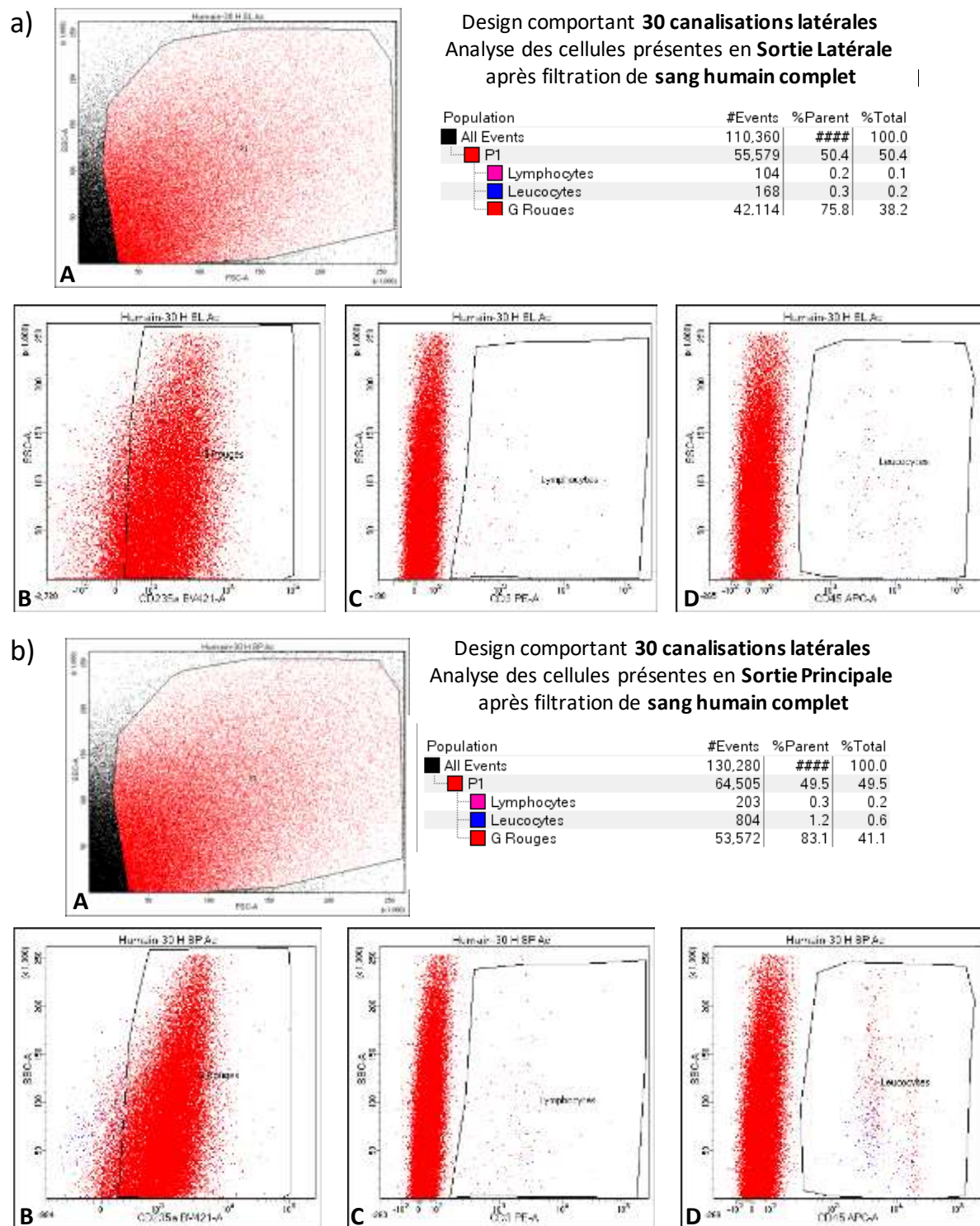


Figure III- 26 : Résultats du tri par FACS après filtration de sang humain complet (non dilué) dans les dispositifs comportant **30 canaux latéraux** – a) Cas de la sortie principale où toutes les cellules de diamètre supérieur à 10 μm doivent être récoltées – b) Cas des sorties latérales où toutes les cellules de diamètre inférieur à 10 μm doivent être filtrées, retirées (globules rouges, plaquettes et quelques lymphocytes)

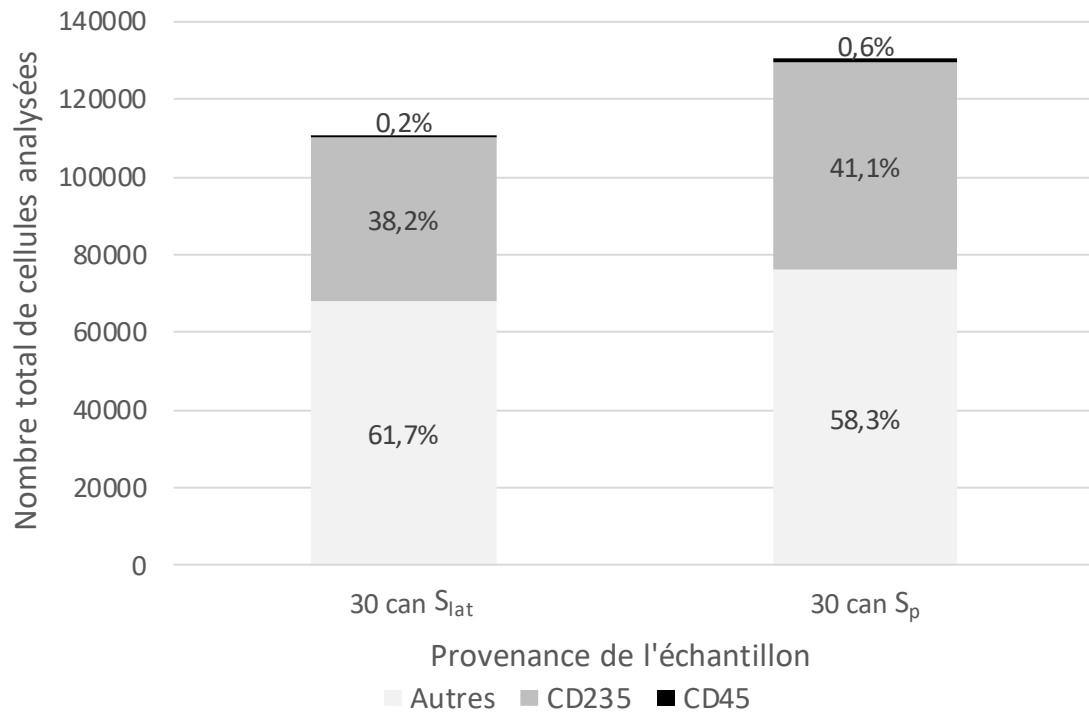
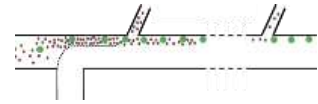


Figure III- 27 : Comparaison des échantillons récoltés en sortie principale (S_p) et en sortie latérale (S_{lat}) après filtration dans un dispositif comportant 30 canalisations latérales. Les pourcentages des différents types cellulaires sont fonction du marqueur cellulaire : CD235 = globules rouges, CD45 = globules blancs et « autres » = types cellulaires non marqués, débris, etc.

Les résultats de la filtration *via* un dispositif comprenant 100 canaux latéraux sont tout autres. En effet, les globules rouges sont très fortement concentrés, enrichis en sortie latérale et sont presque absents en sortie principale (fenêtres A en Figure III- 29- a et Figure III- 29- b). La filtration est donc extrêmement efficace, confirmant encore une fois les observations réalisées précédemment (cf. Figure III- 25- c et Figure III- 25- d). Les globules blancs sont quant à eux présents en sortie principale et très peu représentés en sortie latérale (fenêtres B et C en Figure III- 29- a et Figure III- 29- b). Quoiqu'il en soit, les puces dont le design comporte 100 canaux latéraux permettent d'obtenir un échantillon propre, enrichi en globules blancs et exploitable par les biologistes.

Nous avons également calculé les pourcentages des différents types cellulaires en présence dans les deux échantillons obtenus après filtration : les résultats associés sont rassemblés en Figure III- 28.

Il apparaît tout d'abord que le nombre total de cellules analysées diffère fortement entre les deux échantillons. En effet, dans un cas (sortie latérale), le nombre d'événements analysés a atteint rapidement les 250 000 cellules tandis que dans l'autre cas (sortie principale), l'échantillon a peine à fournir 20 000 événements. Ceci indique déjà une forte différence de composition entre les deux échantillons, ce qui n'était pas le cas après une filtration dans un



dispositif comportant 30 canalisations latérales. Nous avons ensuite cherché à déterminer la répartition des populations cellulaires dans ces échantillons pour en déterminer la composition finale.

Au vu de la différence du nombre d'événements analysés dans ces deux échantillons, nous avons choisi de nous focaliser sur l'enrichissement en globules blancs permis par ce dispositif. Les résultats montrent que les sorties latérales prélèvent 0,3 % des globules blancs tandis que la sortie principale récolte 2,6 % des globules blancs. Il y a donc près de neuf fois plus de globules blancs en sortie principale qu'en sortie latérale. De plus, les globules blancs représentent 10 % de l'échantillon d'intérêt obtenu en sortie principale. Ces dispositifs permettent donc de fortement enrichir l'échantillon d'intérêt en globules blancs.

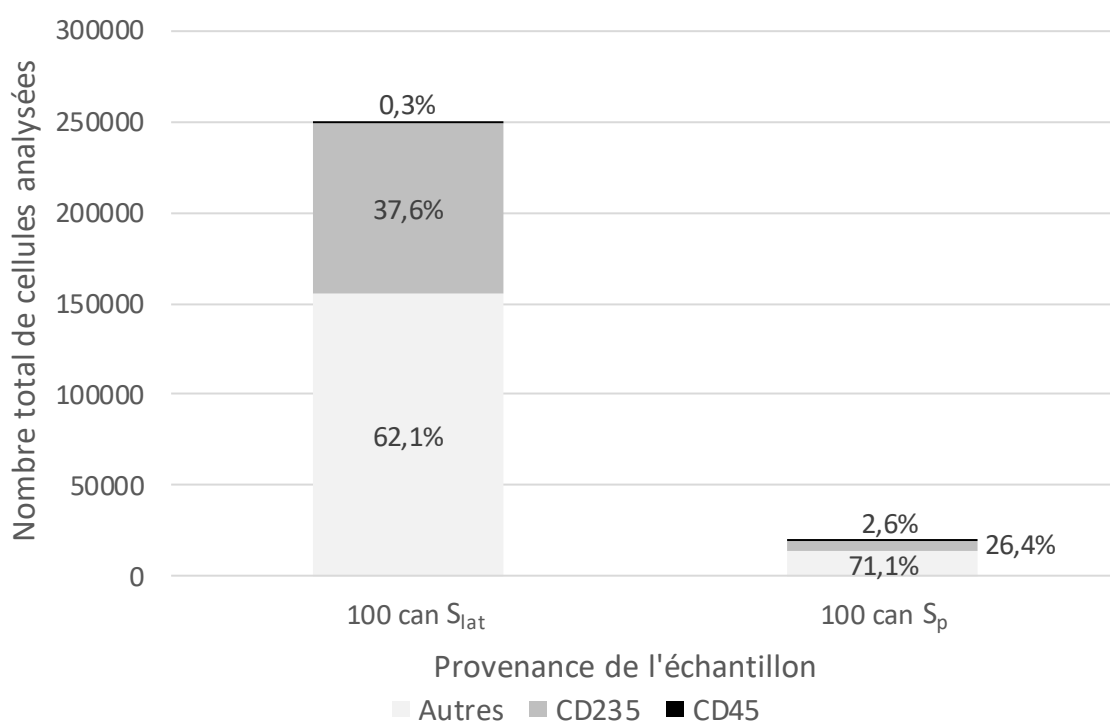
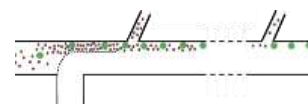
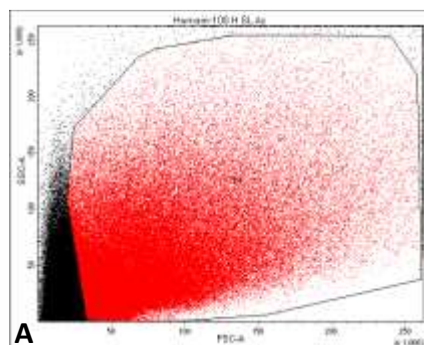


Figure III- 28 : Comparaison des échantillons récoltés en sortie principale (S_p) et en sortie latérale (S_{lat}) après filtration dans un dispositif comportant 100 canalisations latérales. Les pourcentages des différents types cellulaires sont fonction du marqueur cellulaire : CD235 = globules rouges, CD45 = globules blancs et « autres » = types cellulaires non marqués, débris, etc.

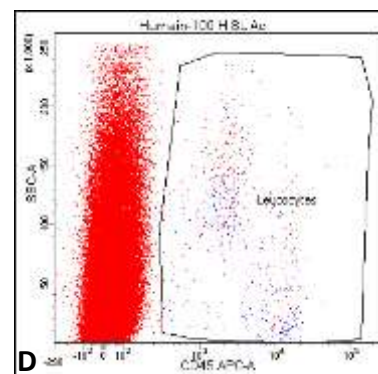
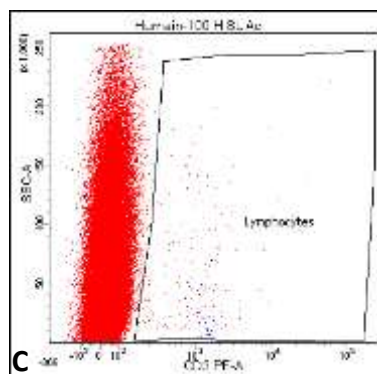
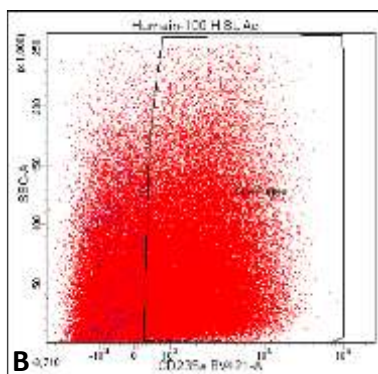


a)

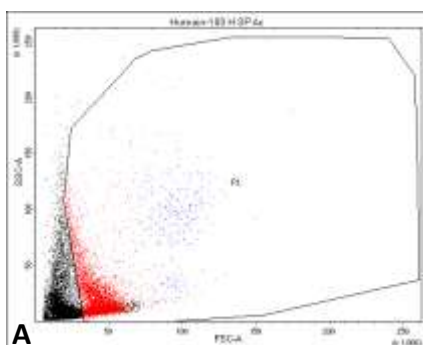


Design comportant **100 canalisations latérales**
Analyse des cellules présentes en **Sortie Latérale**
après filtration de **sang humain complet**

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	250,200	####	100.0
P1	167,815	67.1	67.1
Lymphocytes	259	0.2	0.1
Leucocytes	740	0.4	0.3
G Rouges	93,975	56.0	37.6



b)



Design comportant **100 canalisations latérales**
Analyse des cellules présentes en **Sortie Principale**
après filtration de **sang humain complet**

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	####	100.0
P1	5,768	28.8	28.8
Lymphocytes	148	2.6	0.7
Leucocytes	508	8.8	2.6
Lymphocytes-1	137	27.0	0.7
G Rouges	5,280	91.5	26.4

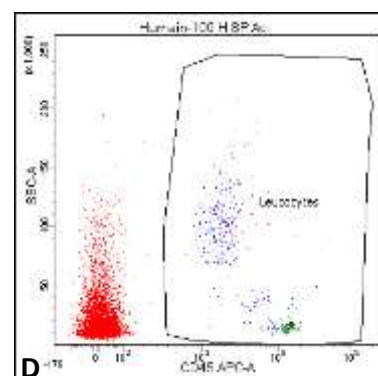
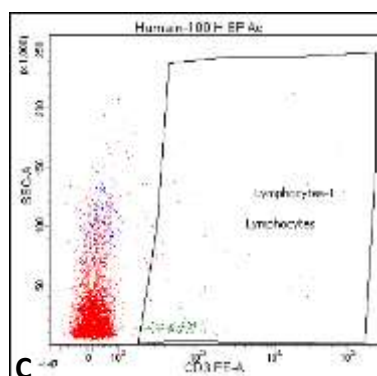
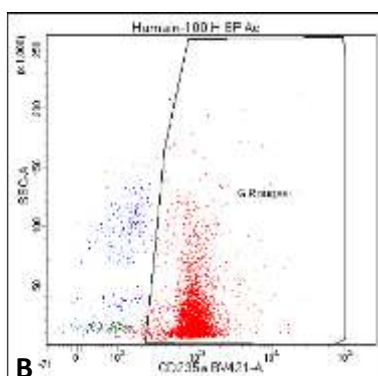


Figure III- 29 : Résultats du tri par FACS après filtration de sang humain complet (non dilué) dans les dispositifs comportant **100 canaux latéraux** – a) Cas de la sortie principale où toutes les cellules de diamètre supérieur à 10 µm doivent être récoltées – b) Cas des sorties latérales où toutes les cellules de diamètre inférieur à 10 µm doivent être filtrées, retirées (globules rouges, plaquettes et quelques lymphocytes)



Afin de comparer les performances des deux dispositifs, nous avons rassemblé les résultats sur le graphique présenté en Figure III- 30. Il apparaît très nettement que les performances du dispositif comportant 100 canalisations latérales sont bien meilleures que les performances du dispositif en comportant 30. En effet, l'enrichissement en globules blancs a été triplé entre les deux générations de puces. Les échantillons obtenus sont donc bien mieux nettoyés en globules rouges et sont exploitables pour de futures applications.

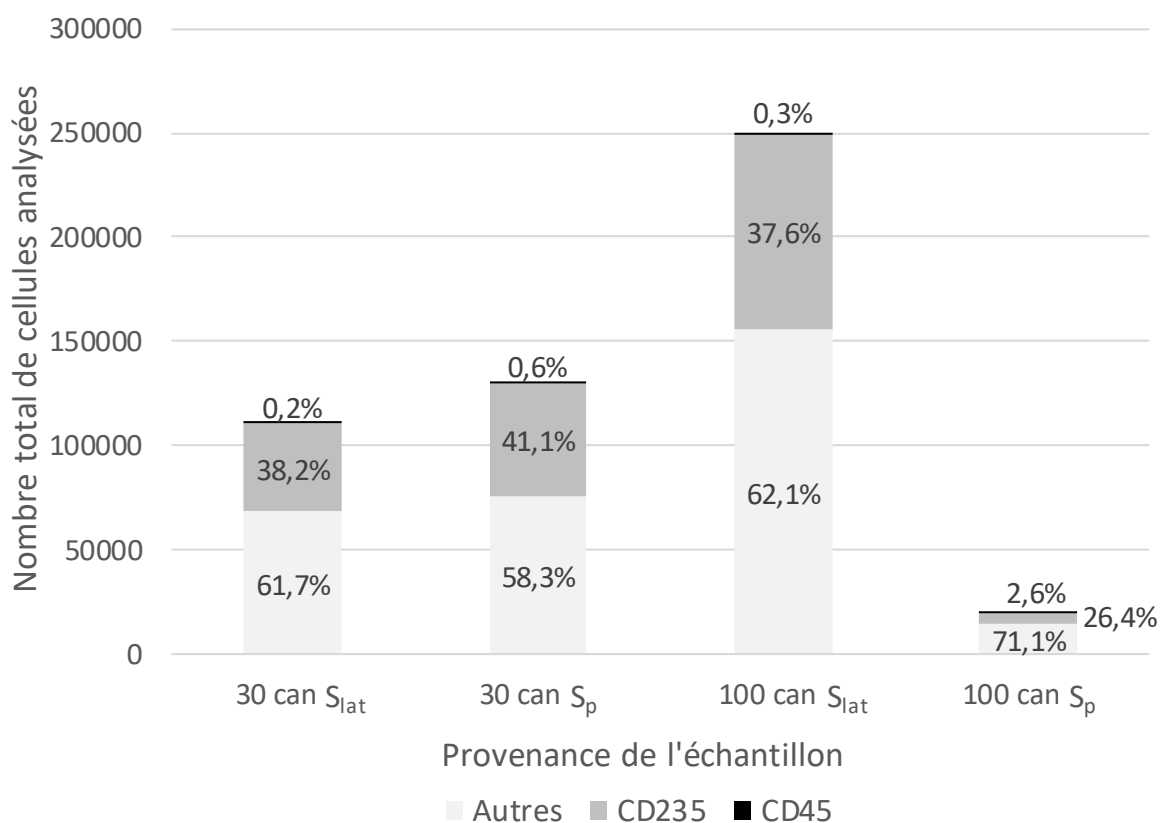
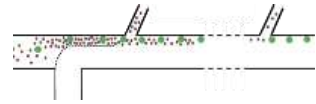


Figure III- 30 : Comparaison des échantillons récoltés en sortie principale (S_p) et en sortie latérale (S_{lat}) après filtration dans des dispositifs comportant 30 ou 100 canalisations latérales. Les pourcentages des différents types cellulaires sont fonction du marqueur cellulaire : CD235 = globules rouges, CD45 = globules blancs et « autres » = types cellulaires non marqués, débris, etc.

Pour finir, ces résultats ont été confirmés avec les tests réalisés sur le sang murin. Bien que de nombreux globules rouges aient lysé pendant la préparation (juste avant injection des échantillons dans le FACS), il est possible d'affirmer que le dispositif comportant 100 canaux latéraux élimine plus efficacement les globules rouges que celui comportant 30 canaux latéraux. En effet, les globules rouges sont enrichis en sortie latérale tandis que les globules blancs sont enrichis en sortie principale où il reste très peu de globules rouges.

Ces tests ont ainsi permis de répondre aux questions initialement posées. En utilisant les dispositifs de 100 canaux, il est possible de retirer la quasi-totalité des globules rouges ainsi



que quelques lymphocytes. Les échantillons d'intérêt sont ainsi nettoyés et sont parfaitement exploitables pour de futures utilisations. Ces tests ont également confirmé que, dans l'échantillon d'intérêt, les ASCs seront accompagnées par des globules blancs.

En complément de cette étude, il sera nécessaire d'effectuer des analyses de viabilité cellulaire, ce qui n'a pas été fait avec les dispositifs comportant 100 canaux latéraux.

III.4.5 Sensibilité du dispositif

Une dernière étude a permis de préciser les limites de filtration du dispositif ou encore de préciser la concentration en-deçà de laquelle le dispositif n'est plus apte à fournir de cellules d'intérêt.

Pour ce faire, du sang de souris ainsi que des ASCs murines natives ont été prélevés au STROMA^{lab}. Les deux échantillons ont été conservés séparément afin de pouvoir marquer d'une part en fluorescence les ASCs et de pouvoir d'autre part réaliser des mélanges sang de souris/ASCs murines avec une concentration en cellules souches variée. Avec les outils à disposition, du sang murin contenant une concentration minimale en ASCs de 100 c/mL a pu être réalisée.

Une fois préparée, la solution a été filtrée dans un dispositif comportant 100 canalisations latérales. Les échantillons obtenus en sortie latérale et en sortie principale ont été caractérisés visuellement afin de déterminer la présence ou l'absence des cellules souches fluorescentes dans les échantillons. Il s'est avéré que l'échantillon obtenu en sortie latérale ne contenait pas d'élément fluorescent au contraire de la sortie principale, indiquant comme attendu l'absence des ASCs en sortie latérale et la présence des ASCs en sortie principale. Ce premier constat est extrêmement positif puisque cela laisse présager le fait que le dispositif est capable de séparer des éléments présents en très faible proportion à partir d'un échantillon biologique complexe.

Bien que ce résultat soit très prometteur, cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et caractérisée qualitativement, visuellement. Il est indispensable de renouveler cette expérience et de la caractériser avec précision : en effectuant une analyse des échantillons au FACS par exemple. Il est également nécessaire d'effectuer d'autres expériences afin de déterminer avec précision la concentration minimale en ASCs qui peut être traitée par le dispositif.

III.4.6 Bilan

Cette étude permet d'arriver à la conclusion que les taux de filtration insuffisants ont un lien avec le nombre de canaux latéraux. L'augmentation du nombre de canaux latéraux a été accompagnée d'une nette augmentation des taux de filtration. En effet, ces derniers dispositifs parviennent à éliminer plus de 99,9 % des particules de diamètre inférieur à 10 μm



à partir de sang murin ou humain aussi bien dilué que complet. Il a également été démontré que ces dispositifs permettent de récupérer les globules blancs de diamètre supérieur à $10\ \mu\text{m}$. Cette étude a ainsi démontré que les derniers dispositifs comportant 100 canaux latéraux sont bien plus efficaces pour éliminer les globules rouges que leurs prédécesseurs. Ces dispositifs sont fonctionnels mais plus important, les résultats sont reproductibles et fiables. Pour finir, une dernière expérience a permis de montrer que le dispositif est capable de traiter des échantillons sanguins complets contenant une très faible concentration ($100\ \text{cellules/mL}$) en cellules d'intérêt. Ces résultats prometteurs devront être reproduits et être plus précisément caractérisés.

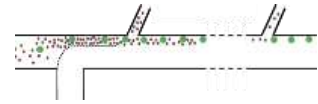
III.5 Conclusion et perspectives

Les cellules souches adipeuses ne se distinguent certes pas, d'un point de vue de leur diamètre, des globules blancs mais elles se distinguent nettement des globules rouges, des plaquettes et de quelques globules blancs (une partie des lymphocytes). L'objectif de ce premier module était donc de prétraiter l'échantillon sanguin en éliminant les cellules de diamètre inférieur à $10\ \mu\text{m}$ tout en récoltant l'intégralité des cellules d'intérêt, les ASCs.

Dans ce chapitre nous avons montré les différents développements réalisés afin de parvenir à l'obtention d'un dispositif capable de répondre à nos attentes. Les expériences menées sur des billes rigides et fluorescentes en polystyrène ont permis de valider dans un premier temps le principe de fonctionnement et de parvenir à l'obtention d'un premier module, comportant 30 canaux latéraux, capable de filtrer les particules de diamètre inférieur à $10\ \mu\text{m}$.

Une fois le fonctionnement validé, la filtration a été testée sur des échantillons biologiques simples (globules rouges seuls dilués dans une solution de PBS 1x) et complexes (allant du mélange de cellules jusqu'au sang complet). Il s'est alors avéré que les taux de récupération des cellules d'intérêt (monocytes THP-1 ou ASCs), dans la gamme de concentrations $[7.10^3 ; 7.10^5]\ \text{c/mL}$, sont de 100 %, ce qui indique que nous ne perdons pas de cellules d'intérêt au cours de la filtration. En contrepartie, il est apparu que ce dispositif ne permet pas de filtrer l'intégralité des cellules de diamètre inférieur à $10\ \mu\text{m}$. L'échantillon alors obtenu contient certes les cellules d'intérêt mais contient également une grande quantité de globules rouges, le rendant inexploitable. Afin d'augmenter les taux de filtration des cellules de diamètre inférieur à $10\ \mu\text{m}$, deux options ont été explorées.

Tout d'abord, l'influence du phénomène de *margination* des globules blancs, synonyme de l'éloignement des globules rouges des parois des vaisseaux sanguins ou des canaux microfluidiques a été analysée. Une simulation sous Matlab a permis de montrer que la dynamique de migration des globules rouges est trop lente pour expliquer les faibles taux de filtration obtenus.



La deuxième option explorée concerne la saturation des canaux latéraux. Un dispositif comportant 100 canaux latéraux a été développé afin d'augmenter la capacité de filtration du module. Il s'est alors avéré que le dispositif est capable de filtrer plus de 99,9 % des cellules de diamètre inférieur à 10 μm ce qui conduit à l'obtention d'un échantillon en très grande partie purifié des globules rouges et parfaitement exploitable pour la suite de l'étude. Ajouté à cela, nous avons cherché à comparer les performances de notre dispositif à celles obtenues avec d'autres méthodes existant pour isoler des événements cellulaires rares dans des milieux complexes. Il s'avère que notre dispositif, outre le temps de traitement de l'échantillon, est plus performant que les dispositifs basés sur d'autres méthodes, comme indiqué dans le Tableau III- 7.

En plus des taux de filtration ou de récupération, la viabilité cellulaire a été étudiée et en particulier la morphologie et la prolifération des cellules après filtration. Les différents tests réalisés ont mené à l'obtention d'un protocole de préparation d'échantillon adapté et ne conduisant pas à la lyse des cellules. Les expériences de prolifération cellulaire, menées sur le module comportant 30 canaux latéraux, ont quant à elles montré que la filtration joue un rôle sur la prolifération.

Le filtrat ainsi obtenu en sortie du premier module, très fortement appauvri en globules rouges et autres cellules de diamètre inférieur à 10 μm et fortement enrichi en cellules d'intérêt, est parfaitement exploitable par le deuxième module. Ce dernier sera présenté dans le chapitre suivant.



Méthodes	Critère(s) de séparation	Échantillons traités	Efficacité de filtration	Paramètres
<i>Inertielles (microvortex)⁸⁸</i>	Taille Séparation de particules	Particules synthétiques (18,5 et 21 μm de diamètre)	> 90 %	-
<i>High-aspect-ratio microchannels⁸⁹</i>	Concentration (Hct) Déplétion en globules rouges	Sang dilué (Hct 4,5 %) Sang complet (Hct 45 %)	Jusqu'à 92 % à partir de sang dilué (Hct 4,5 %) Jusqu'à 37 % à partir de sang complet (Hct 45 %)	~ mL/min
<i>DLD⁹⁰</i>	Taille (5 – 15 μm) Déformabilité Collecte des CTCs	Dilution au 10 ^{ème} de sang humain + CTCs (1 CTC pour 10 000 cellules)	Récupération de 80 à 99 % des CTCs	~ mL/min
<i>Cross-Flow⁹¹</i>	Concentration (Hct) Déplétion en globules rouges	Sang dilué au 100 ^{ème} Sang complet	Jusqu'à 93,3 % (Sang dilué au 100 ^{ème}) Jusqu'à 42 % (Sang complet)	~ $\mu\text{L}/\text{min}$
Filtration hydrodynamique (Notre dispositif)	Taille Déplétion en cellules de $d < 10 \mu\text{m}$	Sang complet	Élimination > 99,99 % des cellules de $d < 10 \mu\text{m}$ (globules rouges, plaquettes et lymphocytes) Récupération de l'intégralité des cellules d'intérêt	2 h 30 pour filtrer 1 mL à 767 mbar

Tableau III- 7 : Comparaison des performances de différents dispositifs

Chapitre IV

Exclusion immunologique des cellules
hématopoïétiques : Isolement complet
des cellules souches adipeuses



Le chapitre précédent s'est attaché à présenter le premier des deux modules destiné à l'isolement des cellules souches adipeuses à partir d'échantillons biologiques complexes tels que le sang.

Ce chapitre se focalise sur le deuxième module dont l'objectif est de retirer, par voie immunologique, les cellules hématopoïétiques restant après élimination des cellules de diamètre inférieur à 10 μm . La technique que nous emploierons consiste à séparer les cellules en suspension suivant la présence ou l'absence d'un antigène à la surface des cellules. *Via* la méthode choisie, le *cell rolling*, seront séparées les cellules exprimant l'antigène ciblé de celles qui ne l'expriment pas. Or, comme évoqué à plusieurs reprises dans ce manuscrit, les ASCs sont dépourvues d'antigène spécifique. Cette absence a été déterminante dans le choix de la stratégie d'exclusion. En effet, il apparaît impossible de cibler directement les cellules souches pour les isoler des leucocytes. Au contraire, les marqueurs des globules blancs sont bien connus c'est pourquoi ils seront mis en jeu pour effectuer un isolement indirect des cellules d'intérêt.

Après avoir présenté le principe du *cell rolling*, ce dernier chapitre présentera le procédé de fabrication adapté à ce dispositif. Par la suite, ce chapitre s'attachera à détailler un premier protocole de fonctionnalisation faisant intervenir les anticorps spécifiques des antigènes que nous ciblons : les anticorps anti-CD45. Seront ensuite présentées les améliorations apportées à ce protocole *via* des tests de caractérisation réalisés aussi bien au LAAS-CNRS que dans d'autres laboratoires de recherche. Un protocole de fonctionnalisation final, fiable et reproductible sera alors déduit de ces expériences. Pour finir, ce chapitre présentera une première approche du *cell rolling* sur des échantillons réels, c'est-à-dire faisant intervenir nos anticorps et des leucocytes.

IV.1 Exclusion immunologique des cellules hématopoïétiques par *cell rolling*

Dans cette partie, le principe de la méthode du *cell rolling* permettant d'exclure, par voie immunologique, les cellules hématopoïétiques restantes est présenté.

IV.1.1 Origine du *cell rolling*

Le *cell rolling* trouve son origine dans les vaisseaux sanguins et fait partie intégrante du processus de recrutement des leucocytes. Ce phénomène intervient lorsque le corps humain lutte contre une inflammation et s'intègre plus particulièrement dans la réaction vasculo-exsudative, première étape du processus de réaction inflammatoire. Au cours du processus de recrutement des leucocytes, ces derniers migrent hors de la microcirculation et s'accumulent dans le foyer lésionnel. Pour cela, les leucocytes suivent un processus

d'adhésion leucocytaire mettant en jeu des glycoprotéines. Ces dernières permettent l'adhésion des leucocytes circulant dans le flux sanguin sur les cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins. Le processus se décompose en sept étapes (schématisées en Figure IV- 1) : la *margination*, le *rolling*, le *slow rolling*, l'arrêt, l'adhésion ferme, le *crawling* et la transmigration (ou diapédèse)⁹²⁻⁹⁶.

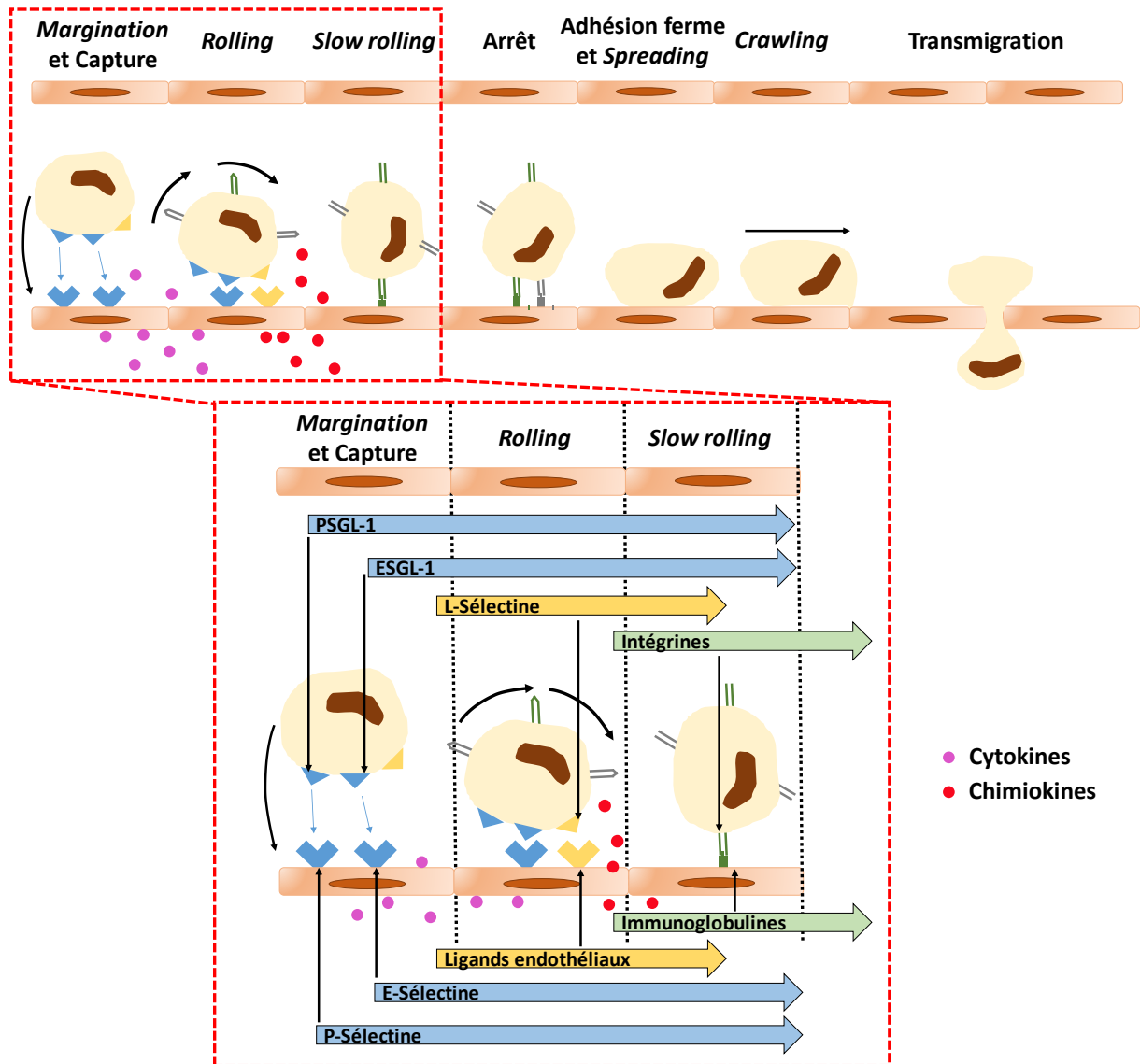


Figure IV- 1 : Mécanisme associé au processus de recrutement des leucocytes. Sept étapes sont nécessaires pour parvenir à l'extravasation des leucocytes⁹²⁻⁹⁶

Au cours de l'étape de *margination*, un ralentissement du courant circulatoire favorise le déplacement des leucocytes près des parois des vaisseaux sanguins tapissés par des cellules endothéliales. Ces dernières, alors activées par des cytokines pro-inflammatoires, expriment des molécules d'adhésion : les sélectines (P-sélectine et E-sélectine). Une fois les leucocytes capturés par les sélectines, ils entament un mouvement de roulement sur la paroi des



vaisseaux. Ce mouvement peut se poursuivre grâce à la sécrétion de chimiokines par les cellules endothéliales. Ces chimiokines activent les intégrines (glycoprotéines) présentes sur les leucocytes qui vont se lier aux immunoglobulines présentes à la surface des cellules endothéliales permettant ainsi aux leucocytes de continuer leur mouvement de roulement. Au même moment, les intégrines augmentent leur capacité de fixation ce qui entraîne le ralentissement, l'arrêt et pour finir, l'adhésion ferme et irréversible des leucocytes. Le processus se poursuit par l'étape de *crawling* (ou reptation) des leucocytes. Au cours de cette étape, des protrusions membranaires sont émises dans le corps des cellules endothéliales et dans les jonctions cellulaires. En parallèle, une ouverture des jonctions endothéliales est provoquée par la contraction des cellules endothéliales. Les leucocytes peuvent alors migrer, *via* la voie paracellulaire, vers les régions lésées.

Notre deuxième dispositif s'inspire des premières étapes du processus de recrutement des leucocytes : la capture et le *rolling*. Une étude en particulier a démontré la faisabilité de l'exclusion de cellules *via cell rolling*⁶⁴ dans un dispositif microfluidique.

Le dispositif microfluidique tel que décrit dans la littérature et dont le principe est détaillé en Figure IV- 2, est constitué de deux parties : un substrat en verre sur lequel des bandes d'or ont été déposées et la structure microfluidique réalisée dans du PDMS. La structure finale est obtenue une fois ces deux parties rassemblées. Dans ces dispositifs, les surfaces d'or sont fonctionnalisées avec des molécules de P-sélectine et ce, afin de recruter les cellules d'intérêt à partir d'un échantillon sanguin complet. Le reste de la surface est quant à lui passivé avec un PEG pour éviter les interactions non spécifiques (Figure IV- 2- a). Ce même dispositif comprend deux entrées et deux sorties. Une entrée sert à l'injection de l'échantillon tandis que l'autre sert à l'injection d'un tampon qui plaque l'échantillon contre la paroi du canal microfluidique. Une sortie récolte les cellules sanguines n'ayant pas interagi avec le parterre de P-sélectine tandis que l'autre sortie récolte les leucocytes isolés, ceux ayant interagi avec la surface fonctionnalisée (Figure IV- 2- b).

La preuve de concept a été établie sur deux lignées dérivées de leucémies myéloïdes : HL-60 et K562. Il a été démontré dans ce cas que les cellules cibles, HL-60 exprimant un niveau élevé de PSGL-1 (*P-Selectin Glycoprotein Ligand 1*), contre-récepteur de la P-sélectine, ont interagi sur la surface fonctionnalisée avec la P-sélectine. Ces cellules se sont alors déplacées (en roulant) sur les surfaces fonctionnalisées et ont ainsi été séparées des cellules K562, cellules n'exprimant pas la PSGL-1⁹⁷. Il a par la suite été démontré la capacité du dispositif à séparer les leucocytes des globules rouges. Les leucocytes, à l'image des cellules HL-60, interagissent avec la surface fonctionnalisée avec la P-sélectine tandis que les globules rouges, à l'image des K562 continuent leur progression sans interagir avec la surface⁶⁴.

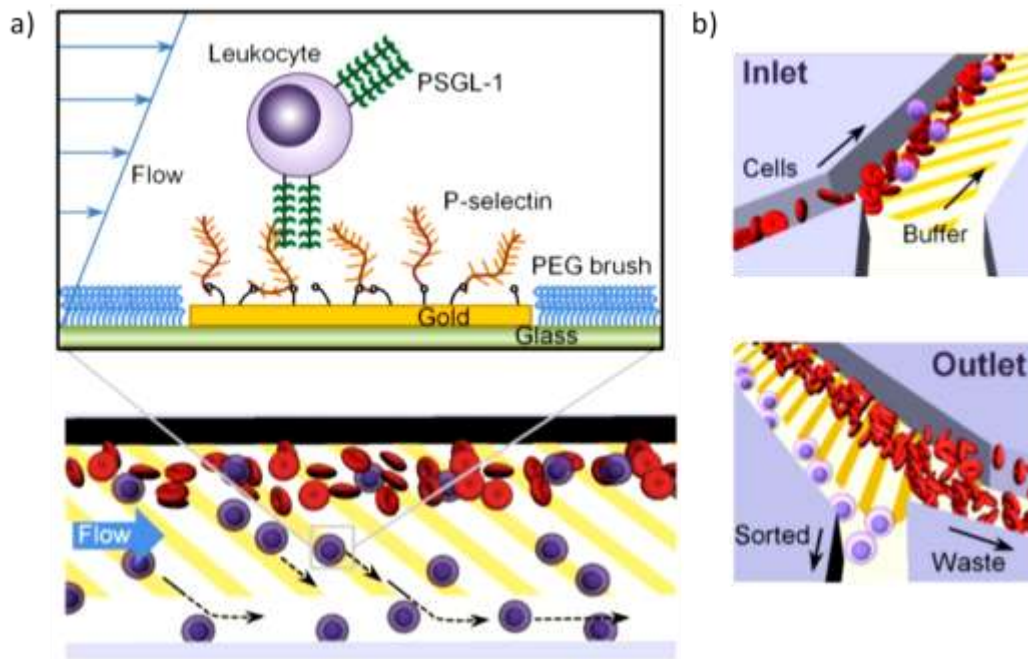


Figure IV- 2 : Principe de la méthode employée pour exclure par voie immunologique les cellules hématopoïétiques restantes : le *cell rolling*⁶⁴ – a) Interaction entre la protéine PSGL-1 d'un leucocyte et de la surface d'or fonctionnalisée avec la P-sélectine. Les cellules entrant en interaction avec la surface roulent le long des surfaces fonctionnalisées – b) Schémas correspondant à l'entrée et à la sortie du dispositif. En entrée, l'échantillon contient tous les types cellulaires ; en sortie, les globules blancs (et en particulier les neutrophiles) sont séparés des autres types cellulaires

Notre dispositif s'inspire de cette méthode. Notre but étant d'éliminer l'ensemble des leucocytes restant dans le milieu prétraité, nous avons adapté cette méthode en remplaçant la P-sélectine par une immunoglobuline compatible avec tous les leucocytes.

IV.1.2 Choix des anticorps adaptés à l'exclusion des cellules hématopoïétiques

Comme évoqué à de nombreuses reprises, les cellules souches adipeuses ne possèdent pas d'antigène spécifique. Contrairement aux ASCs, les antigènes des leucocytes sont bien connus. Notre choix s'est alors porté sur le cluster de différenciation CD45, protéine tyrosine phosphatase membranaire. Cette protéine est exprimée dans toutes les cellules hématopoïétiques et n'apparaît aucunement chez les érythrocytes, les plaquettes ou, plus important, chez les ASCs.

L'idée est donc de remplacer la P-sélectine par les anticorps monoclonaux anti-CD45. Cette modification par rapport au dispositif initial développé par Bose *et al.*⁶⁴ pose un certain nombre de questions auxquelles il convient de répondre pas à pas. En effet, le mécanisme de *cell rolling* résulte d'un équilibre entre forces d'adhésion et forces de cisaillement liées à



l'écoulement sanguin. Des approches théoriques⁹⁸ ont mis en évidence les nombreux paramètres qui le permettent et le contrôlent : densité de récepteurs sur les cellules, densité des ligands sur la surface, constantes d'association ou de dissociation des liaisons ligand-récepteur, rigidité de ces liaisons, etc., ainsi que les différents régimes de roulement : roulement à vitesse constante, tumbling, adhérence transitoire. L'implication de tous ces paramètres dans le phénomène de *cell rolling* montre ainsi la complexité du mécanisme.

Ainsi, il conviendra en particulier d'étudier dans notre cas :

- L'adéquation des constantes d'association et de dissociation de la liaison antigène/anticorps
- L'adaptation de la densité des anticorps sur des surfaces fonctionnalisées

Dans ce contexte, la première étape du travail a consisté à développer un protocole adapté à la fonctionnalisation de surface avec nos anticorps afin de définir dans un premier temps les conditions optimales de *cell rolling* puis dans un second temps de réaliser le module d'exclusion immunologique.

IV.2 Fabrication des dispositifs microfluidiques : particularité du second module

De nombreux dispositifs microfluidiques intègrent différentes fonctionnalités, certaines directement conférées par les géométries des canaux microfluidiques, d'autres conférées par des éléments de type électrodes, ou encore conférées par des surfaces fonctionnalisées. Ces fonctionnalités supplémentaires sont ajoutées grâce aux méthodes usuelles de micro et nanotechnologies (dépôt de couches minces, etc.).

Dans le cas de notre deuxième module, destiné à l'exclusion immunologique des cellules hématopoïétiques, des zones métallisées pouvant être fonctionnalisées par le greffage d'anticorps ont été ajoutées. La partie microfluidique est réalisée selon le même procédé que celui employé pour réaliser le dispositif destiné à la filtration hydrodynamique (voir **Chapitre II**, partie **II.2.4**). A ce procédé s'ajoute une étape supplémentaire, préalable à la construction des canaux microfluidiques, qui permet d'intégrer les zones métallisées.

Pour ajouter ces surfaces métallisées, l'utilisation du procédé *lift-off* est nécessaire. Ce procédé emploie un masque de résine le plus souvent déposé par dépôt centrifuge, ou *spin coating* et mis forme par photolithographie (insolation, recuit, développement). La particularité de cette technique réside dans le fait que les flancs de la résine sont inclinés selon une certaine orientation (bonne orientation sur les Figure IV- 3- a et Figure IV- 3- d ; mauvaise orientation sur les Figure IV- 3- b, Figure IV- 3- c et Figure IV- 3- e) pour permettre le retrait de la résine une fois le dépôt métallique effectué.

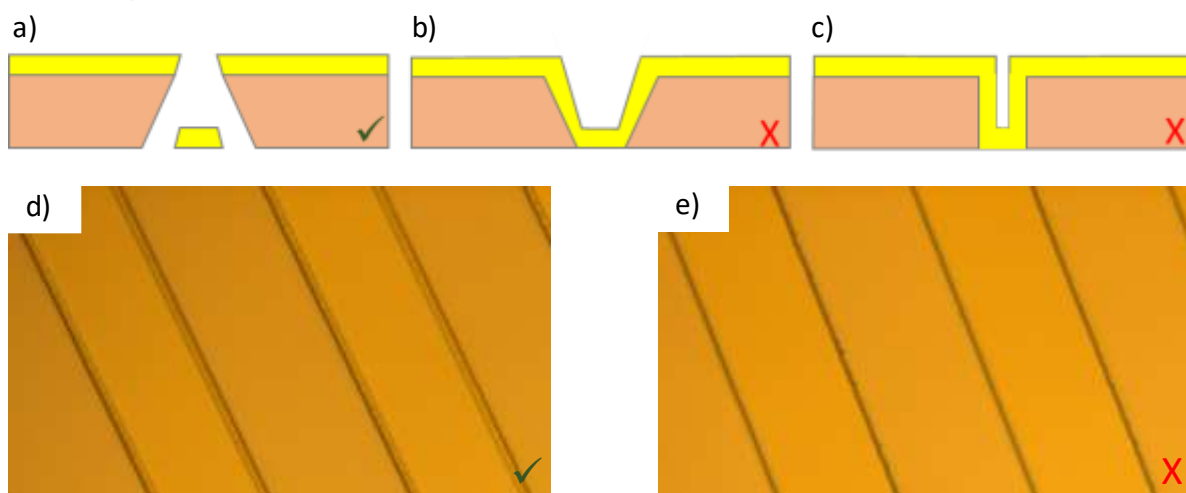
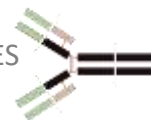


Figure IV- 3 : Caractérisation des profils de résine adaptés pour le *lift-off* – a) Profil à pente négative ou dite « en casquette », favorable au *lift-off* – b) Profil à pente positive défavorable au *lift-off* – c) Profil à flancs droits également défavorable au *lift-off* – d) Observation au microscope optique du profil en casquette – e) Observation au microscope optique du profil à flancs droits

Pour ce procédé, le masque de résine a été réalisé sur un substrat en verre, substrat sur lequel 5 μm de résine AZ NLOF 2035 (MicroChem Corporation) ont été déposés par centrifugation dans une machine semi-automatique (EVG120). L'insolation, dont les paramètres sont décrits en Tableau IV- 1, a été effectuée manuellement, hors de l'EVG120. Les recuit et développement ont quant à eux été réalisés dans l'EVG120. Une première caractérisation a consisté en la mesure de l'épaisseur effective de résine déposée qui a été déterminée (par profilomètre mécanique Tencor P17) à $5,0 \mu\text{m} \pm 0,5 \mu\text{m}$. Les flancs des motifs ont ensuite été vérifiés au microscope optique Leica (cf. Figure IV- 3- d et Figure IV- 3- e). Les paramètres utilisés pour obtenir le résultat en Figure IV- 3- d sont décrits dans le Tableau IV- 1.

Une fois le masque de résine prêt, vient l'étape du dépôt métallique. Le choix des métaux est important et dépend de leur fonction : métal destiné à l'accroche sur le substrat ou métal dédié à l'application, en l'occurrence la fonctionnalisation de surface. Plusieurs métaux peuvent être utilisés pour la couche d'accroche, les plus classiques étant le chrome et le titane. Le choix du matériau pour la fonctionnalisation de surface par le greffage d'anticorps est relativement restreint : le meilleur candidat étant l'or. Ce dernier est en effet un matériau inoxydable, biocompatible et compatible avec la chimie de greffage de thiols. Nous avons ainsi fait le choix de déposer 50 nm de titane (Ti) pour la couche d'accroche et 100 nm d'or (Au) pour réaliser les zones à fonctionnaliser. Ce couple Ti/Au a été déposé par une méthode d'évaporation par faisceau d'électrons. Dans un bâti sous vide, un creuset qui contient le métal à déposer est bombardé par un faisceau d'électrons. Le métal est alors chauffé jusqu'à sa température d'évaporation : les atomes de l'élément (Ti ou Au) se déplacent dans la chambre



et se déposent sur le wafer. Plusieurs wafers (jusqu'à 15 wafers) peuvent être traités simultanément.

Suite au dépôt métallique, le masque de résine doit être retiré. Pour ce faire, le wafer est placé dans un bécher contenant un développeur, dans notre cas le diméthylsulfoxyde (DMSO). Grâce au profil des parois, le développeur accède facilement à la résine et la dissout. Cette étape a présenté une difficulté : du fait de la grande quantité de résine à retirer (les zones métallisées représentent une faible portion de la surface de la puce), les conditions de *lift-off* ont dûes être adaptées et optimisées.

Une fois les zones métallisées réalisées, la partie fluidique est construite et la structure fermée par un deuxième wafer en verre. Contrairement au dispositif pour la filtration hydrodynamique, les dispositifs pour le *cell rolling* n'ont pas besoin d'être réalisés *via* fabrication inversée. L'alignement des ouvertures fluidiques étant bien moins critique que dans le cas du module de filtration hydrodynamique, il n'est pas nécessaire de faire appel à une technologie de perçage de pointe : le sablage convient et suffit pour leur fabrication.

La définition des zones d'or et des canaux fluidiques s'effectue sur le wafer plein. Sur le deuxième wafer, percé, une couche de résine DF-1005 est laminée puis percée avec une aiguille pour libérer les ouvertures fluidiques. Le tout est enfin scellé à la Nanonex. Les étapes de fabrication du dispositif pour le *cell rolling* sont schématisées en Figure IV-4 et détaillées dans le Tableau IV- 1.

Cette première partie a ainsi permis de présenter le procédé de fabrication des puces microfluidiques destinées à exclure par voie immunologique les cellules hématopoïétiques présentes dans l'échantillon prétraité. Les parties suivantes présentent le principe de la méthode sélectionnée ainsi que les travaux réalisés pour obtenir un dispositif fonctionnel.

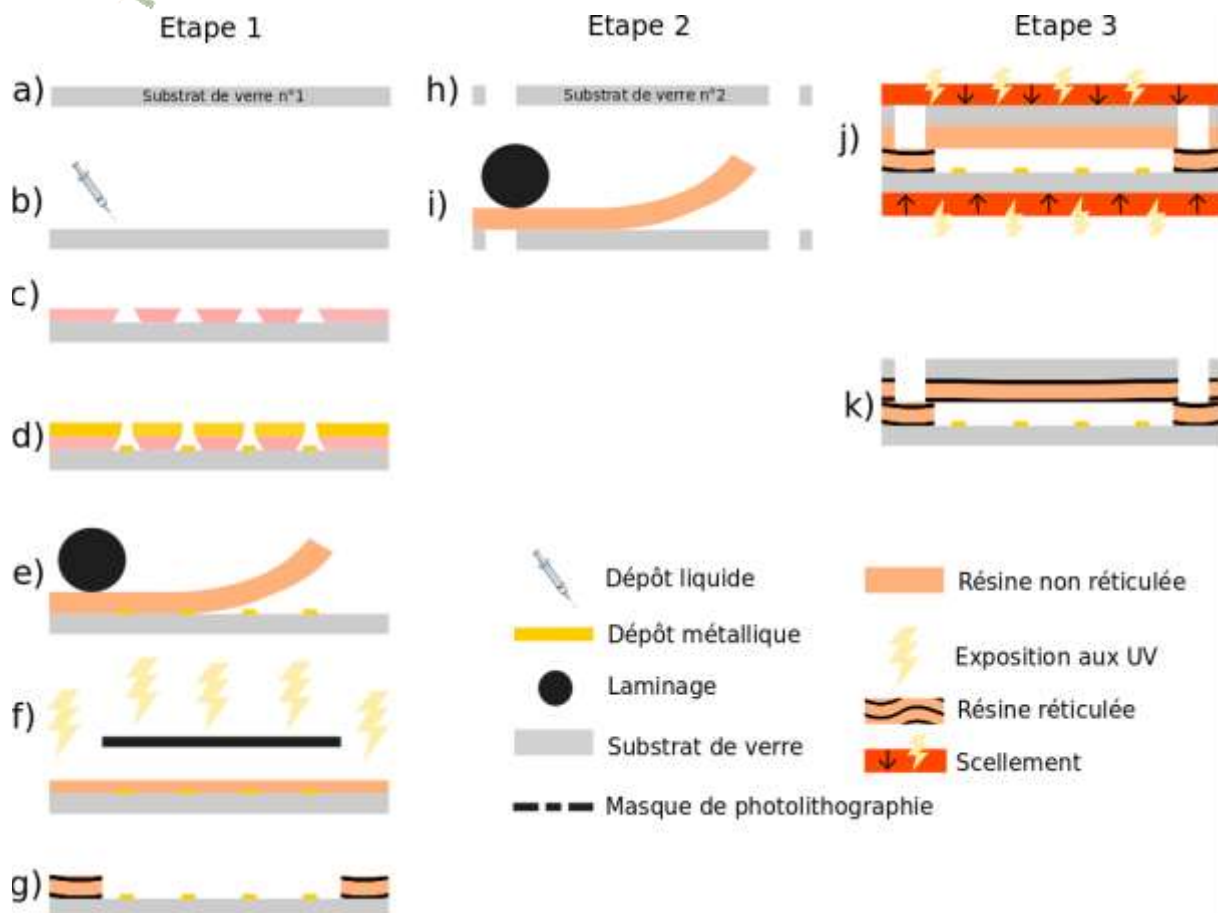
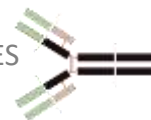


Figure IV-4 : Schématisation du procédé de fabrication final en trois étapes – la première étape vise à la réalisation des zones d'or et du canal microfluidique sur un wafer en verre AF-32 – La deuxième étape vise à la préparation du second wafer en verre AF-32 qui sert de capot aux canaux fluidiques. Les ouvertures fluidiques ayant été réalisées au préalable à la sableuse – La troisième et dernière étape vise au scellement des deux wafers en verre pour constituer les puces finales



Niveau	Étape	Paramètres
Couche pleine plaque	a	Nettoyage substrat verre : Bain $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ (5 min) suivi par un Plasma O_2 , 800 W, 5 min
	b	Dépôt de résine : NLOF 5 μm à l'EVG120 par <i>spin coating</i>
		Photolithographie :
	c	○ Insolation MA-6, 20 mW/cm^2, hard contact, 8,8 s ○ PEB, EVG 120 pdt 2 min 30 s, $T = 105^\circ\text{C}$ (plaque chauffante) ○ Développement au MFCD26, 2 min
Dépôt métallique	-	Fonctionnalisation de surface : Plasma O_2 , 200 W, 2 min
	d	Évaporation d'une cible de titane + or Dépôt couche de 50 nm de Ti et 100 nm de Au
	-	Lift-off NLOF 2,5 μm avec DMSO froid puis chaud pendant 12 h
Montage de la fluidique	-	Fonctionnalisation de surface : Plasma O_2 , 200 W, 2 min
	e	Dépôt de résine : 2 laminages de film DF-1020, 2,5 bars, $T = 100^\circ\text{C}$, $v = 0,5 \text{ m/min}$
		Photolithographie :
	f, g	○ Insolation MA-6, 20 mW/cm^2, hard contact, 13,2 s ○ PEB, 5 min 30 s, 100°C (plaque chauffante)
Capotage verre		Développement Cyclohexanone 7 min + rinçage IPA
	h	Nettoyage substrat verre percé : Bain $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ (5 min) suivi par un Plasma O_2 , 800 W, 5 min
	i	Dépôt de résine : Laminage du film DF-1005, 2,5 bars, $T = 110^\circ\text{C}$, $v = 0,5 \text{ m/min}$. Si les ouvertures fluidiques sont toujours bouchées par le film DF, percer avec une aiguille
		Fonctionnalisation de surface : wafer pleine plaque + zones métallisées + fluidique
	-	Plasma O_2 , 200 W, 2 min, cage de Faraday ATTENTION : la cage de Faraday permet d'éviter une trop forte attaque de la résine qui entraînerait l'apparition de bulles lors du scellement
		Scellement : Fermeture de la fluidique <i>via</i> capotage dans la Nanonex
	j	○ Pression (30 PSI $\Leftrightarrow$ 2 bars) + T° (65°C) ○ Pression (60 PSI $\Leftrightarrow$ 4 bars) + T° (100°C) + UV (365 nm) $\Leftrightarrow$ réticulation résine rampe

Tableau IV- 1 : Procédé de fabrication détaillé des dispositifs destinés à l'exclusion immunologique des cellules hématopoïétiques

IV.3 Fonctionnalisation de surface

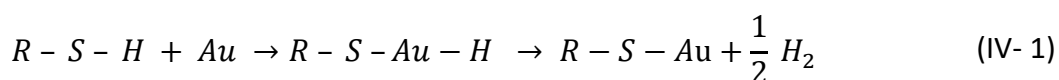
IV.3.1 Fonctionnalisation de surface : protocole générique

De nombreux protocoles de fonctionnalisation de surface par voie liquide impliquant des anticorps existent. Nous proposons dans cette partie de présenter un protocole de fonctionnalisation générique adapté à notre application.

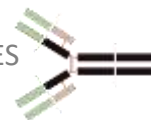
IV.3.1.1 Greffage d'une monocouche auto-assemblée

Pour que la fonctionnalisation de surface soit réussie, il est nécessaire que les anticorps soient efficacement accrochés au substrat. Pour que cela soit possible, le greffage des anticorps s'effectue par l'intermédiaire d'une monocouche auto-assemblée (ou SAMs pour *Self-Assembled Monolayers*) qui fournit un grand nombre de sites d'accroche pour la fixation covalente des anticorps. Ces monocouches sont composées de molécules comportant trois parties : un groupement permettant l'accroche avec le support, un squelette et un groupement permettant l'accroche de la biomolécule cible (schéma de la molécule en Figure IV- 5).

Le premier groupement est la partie se fixant au support. Le choix de ce groupement dépend alors directement du substrat à fonctionnaliser et dans notre cas, ce substrat est l'or. Le choix s'est porté sur ce matériau car l'or est aisé à déposer à l'aide des technologies standard de la microélectronique, ce qui nous permet de réaliser des motifs d'or en fond de canalisation. De plus l'or est un matériau biocompatible et les SAM fixées sur des surfaces d'or sont stables sur de longues périodes^{99,100}. Afin de fonctionnaliser l'or, le groupement le plus couramment utilisé est le thiol (-SH). L'adsorption, par chimisorption, des molécules thiolées sur la surface en or constitue la première étape de la formation de la SAM. La réaction pourrait être décrite comme étant une addition oxydante du thiol -SH sur la surface d'or suivie d'une élimination réductrice de l'hydrogène¹⁰¹. En résulte une liaison covalente entre les groupes thiols et la surface d'or selon l'Équation (IV- 1).



Le squelette est la deuxième partie entrant en jeu dans la formation de la SAM et est constitué de fragments aliphatiques ou aromatiques. Il permet de séparer le groupement se fixant au support du groupement permettant l'accroche des biomolécules et joue un rôle prépondérant dans l'agencement et la structuration de la SAM. En effet, lorsque les molécules s'adsorbent à la surface (lors de la première étape), elles s'adsorbent de manière ponctuelle et désordonnée mais surtout, elles ont une conformation allongée (Figure IV- 5– b). La formation d'une couche ordonnée survient après quelques heures et dépend des interactions



entre les squelettes des molécules. Dans le cas des chaînes aliphatiques (composées de fonctions alkyles C – H), les forces de Van der Waals sont prédominantes tandis que dans le cas des chaînes aromatiques, les interactions entre liaisons π (π - π *stacking*) s'ajoutent aux forces de Van der Waals. Ainsi, les molécules initialement « allongées » voient leurs squelettes entrer en interaction : les molécules commencent à se réarranger et les groupements permettant l'accroche des biomolécules s'orientent vers l'extérieur de la surface (Figure IV- 5– c). Ces phénomènes conduisent à la formation d'une monocouche ordonnée (Figure IV- 5– d)¹⁰².

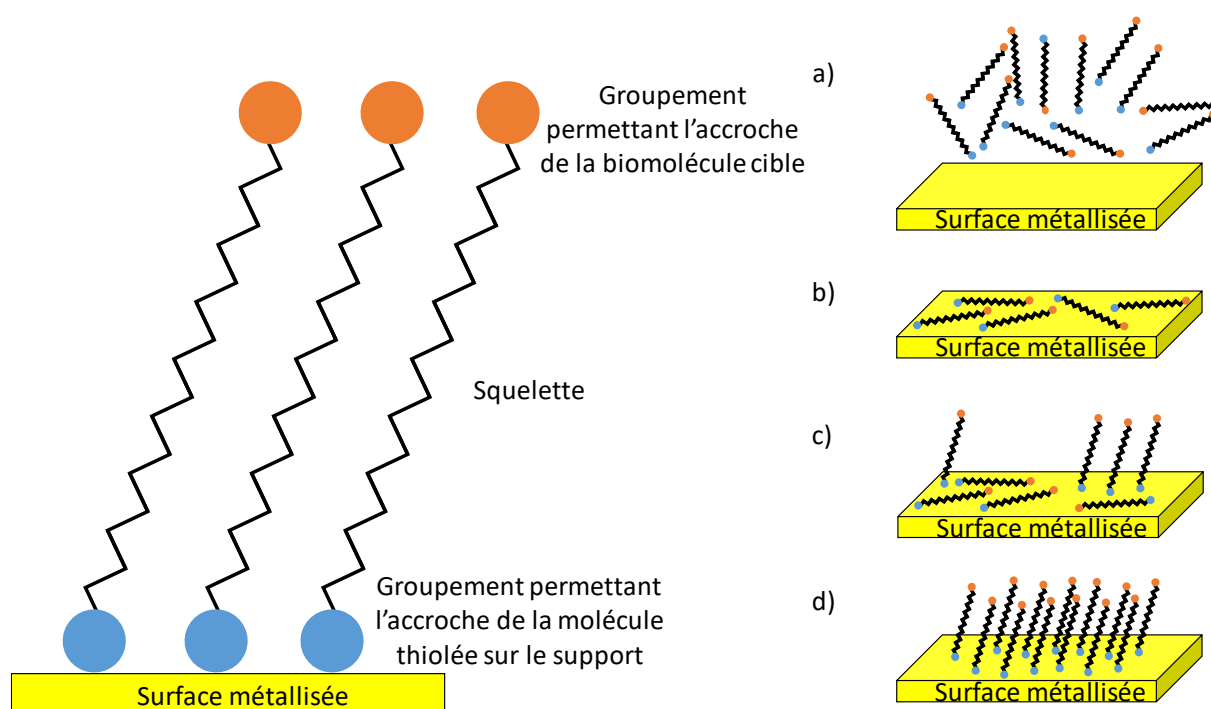


Figure IV- 5 : Organisation de la SAM – à gauche, en orange le groupement permettant de fixer l'anticorps séparé, *via* une chaîne alkyle, du groupement (en bleu) permettant l'accroche covalente de la molécule sur la partie métallique – à droite, étapes de la formation de la SAM - a) Dépôt de la solution de thiols sur la surface - b) Chimisorption des molécules - c) Début de l'auto-formation de la SAM - d) SAM formée avec les groupements permettant l'accroche de la biomolécule cible bien orientés vers le haut

La dernière partie de la molécule est le groupement permettant l'accroche des molécules à immobiliser (anticorps ou plus généralement des protéines) et donc de fonctionnaliser la SAM. Le choix de la fonction dépend de l'élément à immobiliser et de l'application : tout changement de fonction entraîne des modifications des propriétés chimique et physique de la SAM^{103–106}. Parmi les fonctions étudiées, les fonctions -NH₂ ou -OH rendent les surfaces hydrophiles et permettent d'avoir des greffages de protéines satisfaisants. Les protéines

peuvent alors être greffées soit par adsorption (grâce aux interactions électrostatiques) soit par couplage covalent (détaillé dans le prochain paragraphe).

De nombreux travaux ont porté sur le développement d'une SAM efficace aussi bien sur le plan de l'organisation que de la fonction, c'est-à-dire permettant d'obtenir un maximum de fonctions réactives. A ce propos, deux stratégies existent et font intervenir soit une SAM composée d'une seule chaîne thiolée¹⁰⁷ soit une SAM composée d'un mélange de chaînes thiolées^{108,109}. Dans tous les cas, la fonction la plus couramment employée pour permettre l'accroche des biomolécules est le -COOH . Dans le cas du mélange, les thiols avec un groupement -COOH sont mélangés avec des thiols dont le groupement est -OH . Cette fonction permet de passiver la surface en limitant les interactions non spécifiques. L'usage du mélange de thiols permet d'adapter les propriétés de la surface et ainsi d'augmenter la flexibilité des dispositifs réalisés.

IV.3.1.2 Activation des fonctions carboxyles -COOH

Pour capturer de manière covalente les anticorps, il est nécessaire d'activer les fonctions -COOH . Les protéines, par leur fonction amine primaire, pourront alors se lier aux -COOH activés et former une liaison amide stable.

Le protocole le plus couramment employé pour activer les groupements -COOH fait intervenir des carbodiimides et en particulier le 1-éthyl-3-[3-diméthylaminopropyl] carbodiimide (EDC). La réaction entre l'EDC et la fonction -COOH entraîne la formation d'un intermédiaire instable (O-acyl-iso-urée) qui réagit avec le N-hydroxysuccinimide (NHS) ou son analogue hydrosoluble le Sulfo-NHS. Cette réaction conduit à la formation d'un ester succinimidyl (ester NHS), bien plus stable que le O-acyl-iso-urée, qui permet la réaction avec les amines primaires des protéines à pH physiologique.

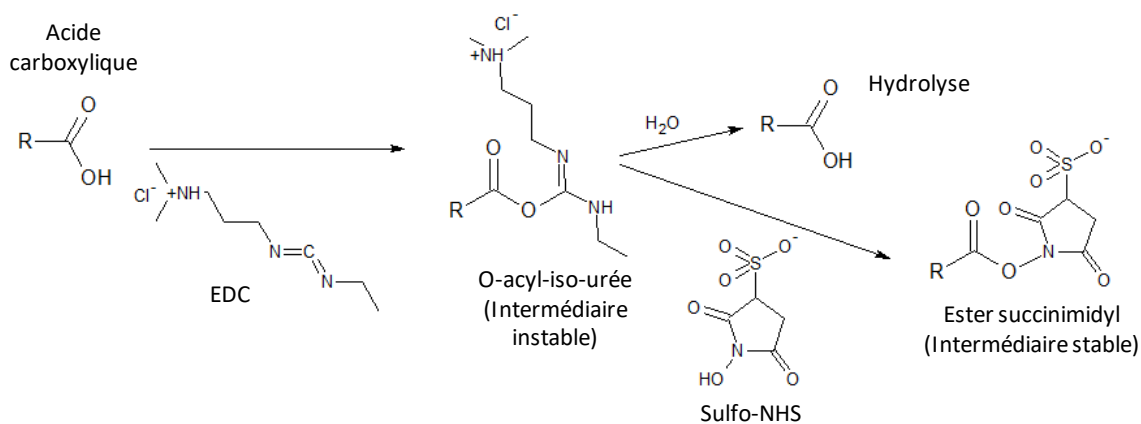
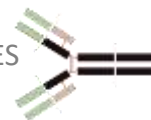


Figure IV- 6 : Protocole d'activation des fonctions -COOH par EDC/Sulfo-NHS pour le greffage des protéines. Trois produits de réaction sont obtenus : un ester stable, un ester instable et l'acide carboxylique de départ¹¹⁰



Les réactions et produits de réaction correspondant à l'activation des --COOH dans un mélange d'EDC et de Sulfo-NHS sont rassemblés en Figure IV- 6. Deux produits intermédiaires : le O- acyl-iso-urée et l'ester succinimidyl stable ainsi que l'acide carboxylique de départ sont obtenus à cette étape.

IV.3.1.3 Greffage des anticorps

Le greffage des anticorps, ou de manière plus générale des protéines, s'effectue en suivant. La structure des anticorps présente de nombreux acides aminés et l'un d'entre eux possède la particularité de présenter une fonction amine primaire libre. Il s'agit de la Lysine (Lys) : sa structure, présentée en Figure IV- 7, met évidence la présence de deux fonctions amines. La fonction amine liée au carbone alpha est indispensable à la formation de la protéine ; l'autre fonction amine reste libre. Ce sont justement les fonctions amines primaires libres qui se lient de façon covalente avec les intermédiaires (les esters) formés lors de la réaction précédente (indiquée en Figure IV- 6).

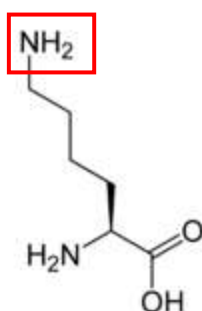


Figure IV- 7 : La lysine (Lys) possède 2 fonctions amines : une fonction amine rattachée au carbone alpha et intervenant dans la liaison peptidique et une fonction amine primaire libre (encadrée en rouge) pouvant intervenir dans la liaison avec les protéines

Trois produits de réaction sont alors obtenus : un amide formé à partir de la réaction directe entre le O-acyl-iso-urée et une amine primaire, l'acide carboxylique de départ et un amide formé à partir de la réaction entre l'ester NHS et une amine primaire. Le bilan de réaction est indiqué en Figure IV- 8.

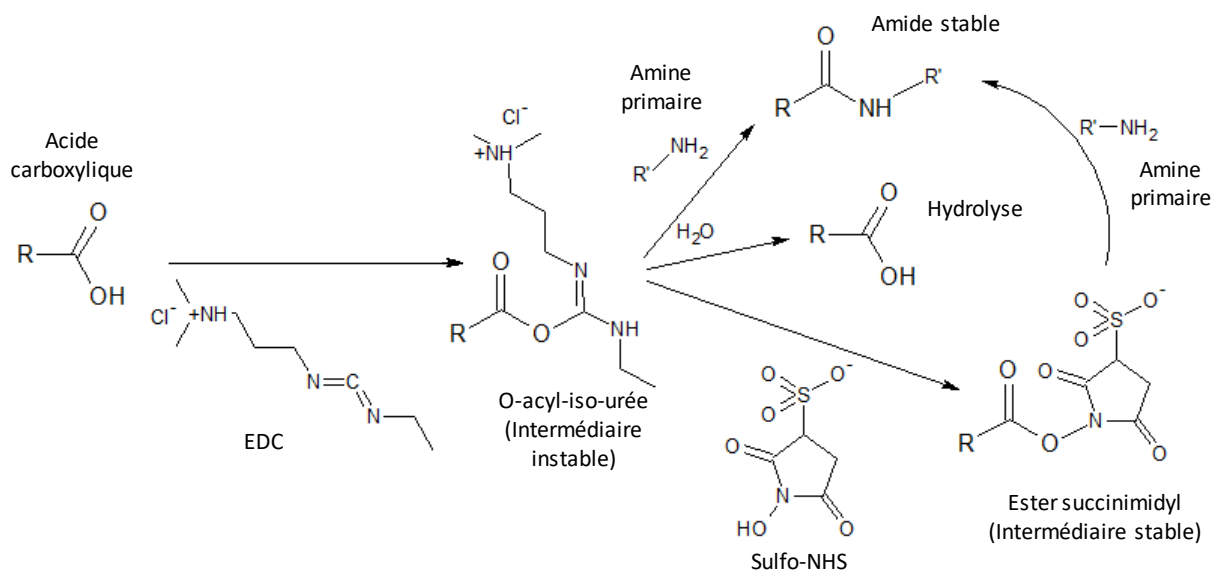


Figure IV- 8 : Réaction complète du greffage des anticorps sur la SAM par réaction des fonctions amines primaires des anticorps avec les fonctions $-COOH$ activées. Deux produits finaux sont obtenus : des amides stables qui correspondent à la liaison SAM/protéine et l'acide carboxylique de départ

L'ensemble de ces étapes constitue un protocole générique qu'il faut adapter en fonction des molécules sélectionnées ainsi que de l'application choisie. La partie suivante présente les molécules sélectionnées ainsi que la caractérisation étape par étape de notre protocole de départ.

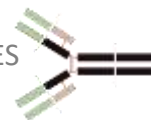
IV.3.2 Protocole de fonctionnalisation

Cette partie a pour rôle de présenter le protocole de fonctionnalisation initialement utilisé tout en détaillant les résultats des caractérisations obtenues. Ces caractérisations ont été réalisées par mesure d'angle de contact et par observation au microscope optique.

IV.3.2.1 Couche métallique

Nous avons choisi la méthode d'évaporation physique en phase vapeur pour déposer les couches métalliques : une couche d'accroche en Titane (50 nm) et la couche destinée à la fonctionnalisation en Or (100 nm). Les caractérisations ont été menées sur des petits échantillons (2 cm x 2 cm) complètement recouverts d'or.

Nous avons souhaité caractériser le protocole dès la première étape en mesurant l'angle de contact statique et en vérifiant l'hystérésis de l'angle de contact sur la surface d'or. Pour expliquer brièvement, la relation de Young-Dupré établit qu'il existe un angle de contact unique. Or, du fait d'hétérogénéités de natures chimique ou géométrique présentes sur la surface, cet angle peut varier. Il est alors possible de vérifier l'homogénéité de la surface en



mesurant les angles d'avancée et de reculée. L'angle d'avancée est mesuré lorsque du liquide est ajouté à la goutte qui gonfle progressivement (cf. Figure IV- 9- a). Au contraire, l'angle de reculée est mesuré lorsque le liquide est aspiré réduisant progressivement le volume de la goutte (cf. Figure IV- 9- b).

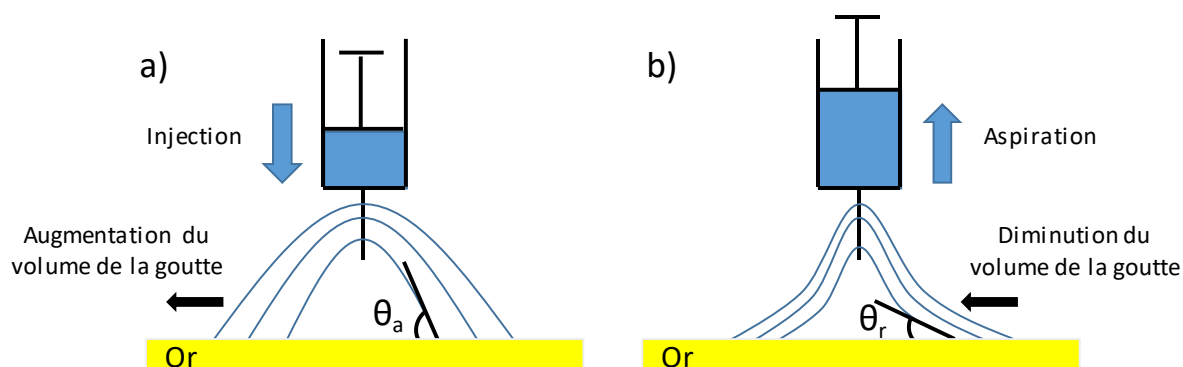


Figure IV- 9 : Angles de contact – a) D'avancée et – b) De reculée

Les analyses ont été réalisées sur l'instrument Digidrop de la société GBX Instrument. L'angle de contact statique a été mesuré après le dépôt d'une goutte d'eau distillée en salle blanche (température fixée à 22 °C). L'hystérésis de l'angle de contact a permis d'avoir une première information quant à la rugosité de la surface de départ. Ainsi, l'angle d'avancée a été mesuré à 90° et l'angle de reculée a été évalué à 70°. Ces valeurs mènent à l'obtention d'une hystérésis d'angle de contact égale à 20°, ce qui correspond à une rugosité moyenne. La valeur d'angle de contact statique mesurée sur la surface d'or est de 71°. Cette valeur est cohérente avec les valeurs rencontrées dans la littérature qui se situent autour de 80°¹¹¹. Toutefois, certaines études ont montré des mesures d'angle de contact statique inférieures et pouvant être égales à 70,2°¹¹², ce qui nous permet de valider l'angle de contact que nous avons mesuré.

IV.3.2.2 Greffage de la SAM

Notre protocole est basé sur les travaux précédemment réalisés par Armelle Montrose¹¹³. Le protocole établi débute par la formation d'une SAM à partir d'un mélange de deux thiols différents. L'usage d'un mélange de thiols, contrairement à une SAM composée d'un seul thiol, semble offrir un plus grand degré de contrôle des propriétés de la couche comme la structure et la mouillabilité^{114–117}.

Le mélange choisi fait intervenir deux alcane-thiols. Le premier est composé d'une chaîne de 11 carbones et d'un groupement carboxyle, l'acide 11-mercaptoundécanoïque (11-MUA) de formule initiale $\text{SH}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$ (cf. Figure IV- 10- a). Cette molécule servira au greffage des protéines. Le second est quant à lui composé d'une chaîne de 6 carbones et d'un groupement hydroxyle, le 6-mercaptohexanol (6-MCH) de formule initiale $\text{SH}-(\text{CH}_2)_6-\text{OH}$

(cf. Figure IV- 10- b). Le choix d'une chaîne plus courte pour ces molécules permet d'éviter les effets stériques lors de la phase d'activation et lors de la phase de greffage des protéines. De plus, la fonction alcool, hydrophile, permet de réduire l'adsorption non spécifique des molécules sur la surface¹⁰⁷.

La formation de la SAM a été réalisée sur la surface d'or présentée dans le paragraphe précédent. Une goutte de solution d'éthanol absolu comprenant une concentration de 2 mM de 6-MCH et de 0,1 mM de 11-MUA a été déposée sur la surface d'or. La surface a été immergée pendant une durée de 18 h à température ambiante et à l'abri des UV (pour éviter une dégradation de la couche de thiols par rupture des liaisons S-Au). La surface a ensuite été rincée abondamment à l'éthanol puis nettoyée dans un bain d'éthanol placé sous ultrasons pendant 5 minutes avant d'être séchée sous pistolet azote. La SAM formée est schématisée en Figure IV- 10- c.

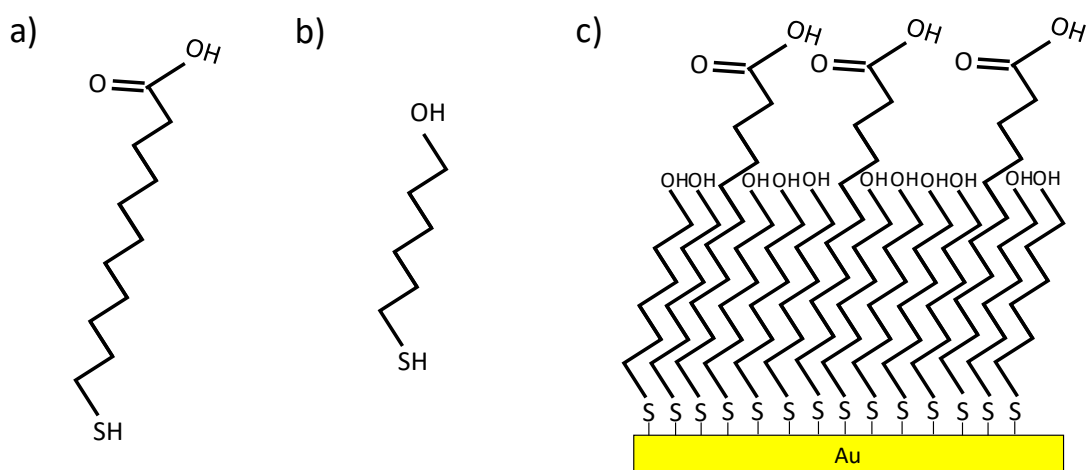
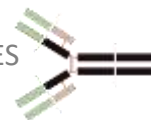


Figure IV- 10 : Molécules d'alcane-thiol utilisées pour réaliser la monocouche auto-assemblée - a) Acide 11-mercaptoundécanoïque (11-MUA) dont le groupement orienté vers les biomolécules est un acide carboxylique – b) 6-mercaptohexanol (6-MCH) dont le groupement orienté vers les biomolécules est un alcool – c) SAM complète formée à partir du mélange des deux alcane-thiols

La formation de la SAM a été caractérisée par mesure d'angle de contact statique. Ce dernier passe ainsi de 71° à 20°, ce qui montre un changement d'état de surface et confirme la formation de la SAM.

IV.3.2.3 Activation de la surface et greffage de l'anticorps

Le protocole se poursuit par l'activation de la SAM par dépôt d'une goutte, sur la surface d'or, de mélange EDC / NHS à des concentrations respectives de 75 mM et 15 mM¹¹³. La réaction a lieu en milieu aqueux (eau déionisée (DI)) pendant 30 minutes à température ambiante, T_{amb} . L'activation terminée, la surface est rincée à l'eau DI. Cette étape ne peut pas être caractérisée



par les méthodes précédemment utilisées. En effet, la mesure d'angle de contact nécessite de déposer un liquide sur la surface activée ce qui dégraderait les fonctions d'intérêt. Seule la caractérisation du greffage peut permettre de déterminer si l'activation est efficace ou non.

Le greffage de l'anticorps a été réalisé après activation de la surface. Comme évoqué en partie III.2.2, le choix s'est porté sur les anticorps anti-CD45. Deux stratégies de greffage ont été employées. La première implique l'utilisation d'anticorps primaires liés à un fluorochrome : *Alexa Fluor® 647 anti-mouse CD45 Antibody fluorescent* (excitation entre 633 et 635 nm et émission à 668 nm). Le choix de ce fluorochrome se justifie par le fait que nous souhaitons utiliser un fluorochrome adapté à notre résine, le DF, qui auto-fluoresce dans le vert (excitation à 470 nm et émission autour des 550 nm). La deuxième stratégie implique l'utilisation d'anticorps primaires non marqués (*Purified anti-mouse CD45 Antibody*) et d'anticorps secondaires anti-IgG liés à un fluorochrome FITC. Bien que sachant que ce fluorochrome n'est pas adapté à notre matériau, nous avons choisi de l'utiliser car nos outils sont adaptés pour son observation mais également parce que nos premières expériences ne font pas intervenir la résine.

Dans les deux cas, la première étape de greffage est la même et consiste au dépôt d'une goutte de solution d'anticorps dans du tampon PBS 1x (pour rappel, composé de 2-5 % de BSA, 2mM d'EDTA et 2 mM de NaN_3) à une concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$ a été déposée sur la surface activée. Le tout a été placé au réfrigérateur (4 °C) pour une durée de 18 h. Une fois le greffage terminé, la surface a été rincée au PBS 1x puis séchée avec de l'azote. Dans le premier cas (greffage de l'anticorps marqué en fluorescence), le protocole s'arrête à cette étape. Dans l'autre cas, une étape supplémentaire, ayant pour but l'interaction avec l'anticorps secondaire, est requise. Une solution d'anticorps secondaires marqués en fluorescence a ainsi été déposée sur la surface sur laquelle ont été greffés les anticorps primaires. Les anticorps secondaires ont été mis en solution dans du PBS 1x à une concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$. Le tout a été placé au réfrigérateur (4 °C) pour une durée de 18 h. Une fois l'interaction terminée, la surface a été rincée au PBS 1x puis séchée à l'azote.

La caractérisation de ces surfaces a cette fois été réalisée par une observation en fluorescence. Dans le premier cas, celui faisant intervenir le fluorochrome *Alexa Fluor® 647*, aucun signal n'a été détecté, ce qui a permis de mettre en évidence le fait que le fluorochrome n'est pas adapté à nos outils. Dans l'autre cas, celui faisant intervenir le fluorochrome FITC, la visualisation de la fluorescence n'a pas permis de conclure quant au greffage des anticorps. Ceci peut venir soit du fait que les anticorps ne se sont pas greffés, soit du phénomène d'extinction de fluorescence dû à la présence de l'or¹¹⁸.

IV.3.3 Bilan

A ce stade, il est difficile de conclure quant à l'efficacité du protocole de fonctionnalisation que nous utilisons. Bien que les caractérisations réalisées sur les premières étapes indiquent que des changements d'état de surface ont bien lieu, de nombreuses questions restent encore en suspens : quelle est la qualité de la SAM ? Est-elle adaptée pour le greffage des anticorps sélectionnés ? Les paramètres d'activation et de greffage des anticorps sont-ils adaptés ?

Pour répondre à ces questions, nous avons tout d'abord orienté nos travaux sur les étapes d'activation et de greffage des anticorps. En effet, les travaux actuels faisant suite aux travaux réalisés par Armelle Montrose¹¹³, nous avons considéré que le dépôt de la SAM était opérationnel. Nous avons alors concentré nos efforts d'une part sur l'optimisation des conditions de greffage des anticorps et d'autre part sur l'optimisation du ratio 6-MCH/11-MHA de la SAM.

L'optimisation des conditions de greffage des anticorps a été effectuée sur une SAM « de référence » développée à FEMTO-ST et déjà validée dans un grand nombre d'applications. Ces travaux ont été réalisés à FEMTO-ST, en collaboration avec l'équipe de W. Boireau. Les résultats ont ensuite été transposés et validés sur nos propres SAM.

A terme, la combinaison des expériences menées hors et dans le LAAS-CNRS aboutissent à un protocole de fonctionnalisation de surface permettant d'obtenir un greffage d'anticorps maximal.

L'objectif final étant de caractériser le comportement des cellules sur une surface fonctionnalisée avec le protocole optimisé, nous avons réalisé une première expérience visant à déterminer la faisabilité du *cell rolling* avec des anticorps anti-CD45.

IV.4 Optimisation du protocole de fonctionnalisation de surface par analyse d'interactions moléculaires *via* la résonance de plasmons de surface

IV.4.1 Optimisation des paramètres de greffage des anticorps anti-CD45

Les premières expériences, réalisées avec l'aide de l'équipe BioMicrodevices à FEMTO ST, Besançon, sont basées sur des mesures par résonance de plasmons de surface.



IV.4.1.1 Détection des interactions biomoléculaires par résonance de plasmons de surface

La méthode de résonance de plasmons de surface (ou SPR pour *Surface Plasmon Resonance*) est une technique optique de détection permettant l'étude des mécanismes biochimiques et des interactions entre différentes biomolécules. Sur le principe, cette méthode se base sur le suivi des changements d'indice de réfraction à la surface d'un capteur.

Le capteur est constitué d'un substrat de verre sur lequel a été déposée une fine couche d'or (quelques nm d'épaisseur). Le capteur est ensuite placé entre un prisme et un milieu aqueux : nous nous plaçons alors dans le cas d'une configuration Kretschmann (configuration la plus courante et que nous utiliserons pour nos expériences). La résonance de plasmons de surface se produit alors lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique traverse le prisme puis le capteur recouvert d'une fine couche d'or (Figure IV- 11).

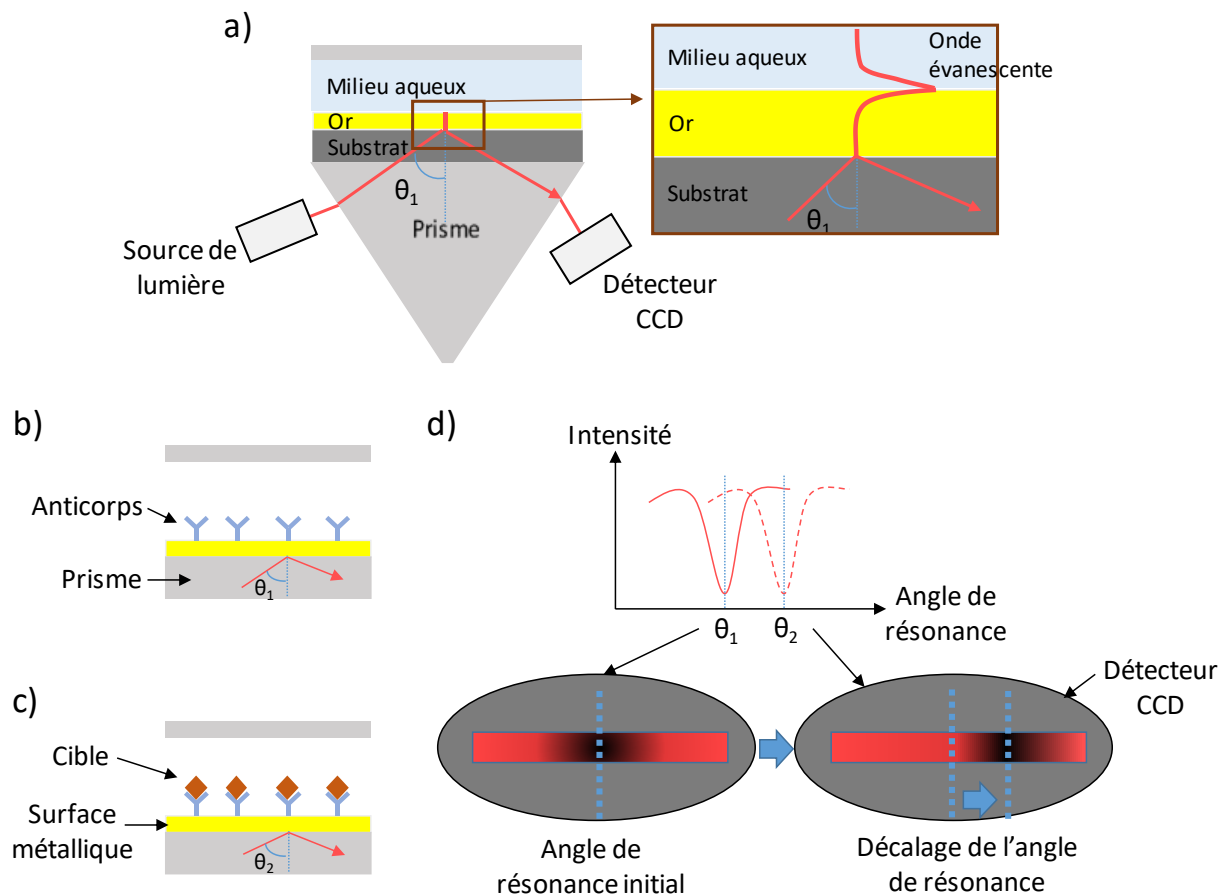


Figure IV- 11 : Principe de la SPR - a) Visualisation de l'onde évanescente à l'origine de la résonance de plasmons de surface - b) Canal microfluidique avant injection de la cible – c) Canal microfluidique après injection de la cible qui se lie aux anticorps présents à la surface métallique – d) Représentation du déplacement de l'angle de résonance après greffage

Ce phénomène trouve son origine dans les différences d'indices de réfraction entre les milieux, ce qui est expliqué par les lois de Snell-Descartes. Lorsqu'un faisceau de lumière atteint la surface métallique sous un angle inférieur à l'angle critique, la lumière est à la fois réfléchi et réfractée. Dans le cas d'un angle d'incidence (arrivant à la surface métallique) supérieur à l'angle critique, le faisceau subit une réflexion totale. Dans le cas précis d'une réflexion interne totale, une des composantes électromagnétiques de la lumière, une onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde (Figure IV- 11- a). Les électrons libres à la surface métallique absorbent alors les photons incidents de l'onde évanescente. A partir de ce moment, les électrons oscillent et entrent en résonance : c'est la naissance de la résonance plasmonique de surface. Les photons couplés aux électrons libres de la surface métallique ne peuvent plus participer au phénomène de réflexion interne totale menant alors à une diminution d'intensité dans le faisceau de lumière réfléchi (Figure IV- 11- c).

L'angle incident, ou angle de résonance, requis pour maintenir la résonance plasmonique de surface est très sensible aux changements d'indice de réfraction à la surface du capteur. Or, lorsqu'une interaction moléculaire se produit à l'interface entre l'or et la solution aqueuse (comme illustré en Figure IV- 11- b), l'indice de réfraction est modifié entraînant une modification de l'angle de résonance (Figure IV- 11- c). La variation d'angle de résonance étant directement proportionnelle à la masse des biomolécules interagissant avec la surface d'or, il est possible de suivre en temps réel les interactions, sur une profondeur inférieure à 300 nm¹¹⁹⁻¹²¹, des molécules et ce, sans marquage. En SPR, 1.10^{-4} degré de variation d'angle correspond à 1 RU et à 1 pg de biomolécules/mm² ^{122,123}.

Les expériences qui seront présentées dans la suite de ce chapitre ont été menées sur les instruments SPR BiacoreT200 et Biacore 2000. Le capteur est un support en verre recouvert d'or sur lequel quatre canaux microfluidiques sont individualisés, comme schématisé en Figure IV- 12. Il est possible de réaliser des analyses identiques ou totalement différenciées dans les quatre canaux. Le résultat apparaît alors comme un graphique d'une réponse (exprimée en RU) en fonction du temps (exprimé en secondes).

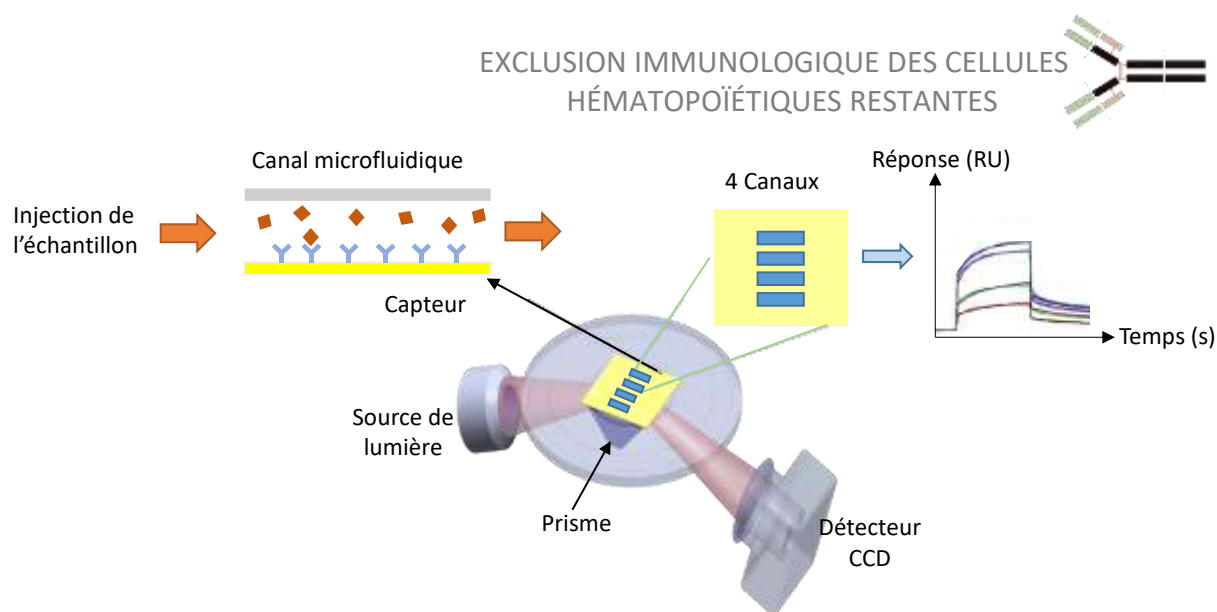


Figure IV- 12 : Principe de la SPR – L'échantillon est injecté dans les canaux microfluidiques (une puce en comporte 4). Grâce à une interrogation angulaire, le système peut indiquer s'il y a interaction moléculaire ou non. Le graphique obtenu, correspondant à une réponse en fonction du temps, permet de quantifier la masse de biomolécules greffées par unité de surface.

La méthode d'imagerie par résonance de plasmons de surfaces (ou SPRi pour *Surface Plasmon Resonance imaging*) est basée sur le même principe que celui utilisé pour l'analyse SPR. Cependant SPR et SPRi diffèrent. En effet, la méthode de SPR consiste à effectuer une interrogation angulaire pour suivre les variations d'indice de réfraction dues aux interactions biomoléculaires. Dans le cas de l'imagerie SPR, l'angle de résonance est fixe : ce sont les variations de réflectivité induites par la variation d'angle de résonance qui sont mesurées.

A la différence des puces utilisées pour la SPR, les puces dédiées à l'analyse par SPRi ne comportent qu'une seule chambre fluide (cf. schéma en Figure IV- 13- a). L'imagerie SPR permet ainsi de mesurer la variation de réflectivité moyenne de zones dont la position et les dimensions sont sélectionnées par l'utilisateur. Ces zones sont de forme circulaire et ont un diamètre compris entre 30 μm et 8 mm. Le choix de l'angle de résonance initial étant le même pour toutes les zones sélectionnées, il doit être adapté à toutes les zones sélectionnées par l'utilisateur. Une fois l'angle de travail fixé, l'échantillon peut être injecté.

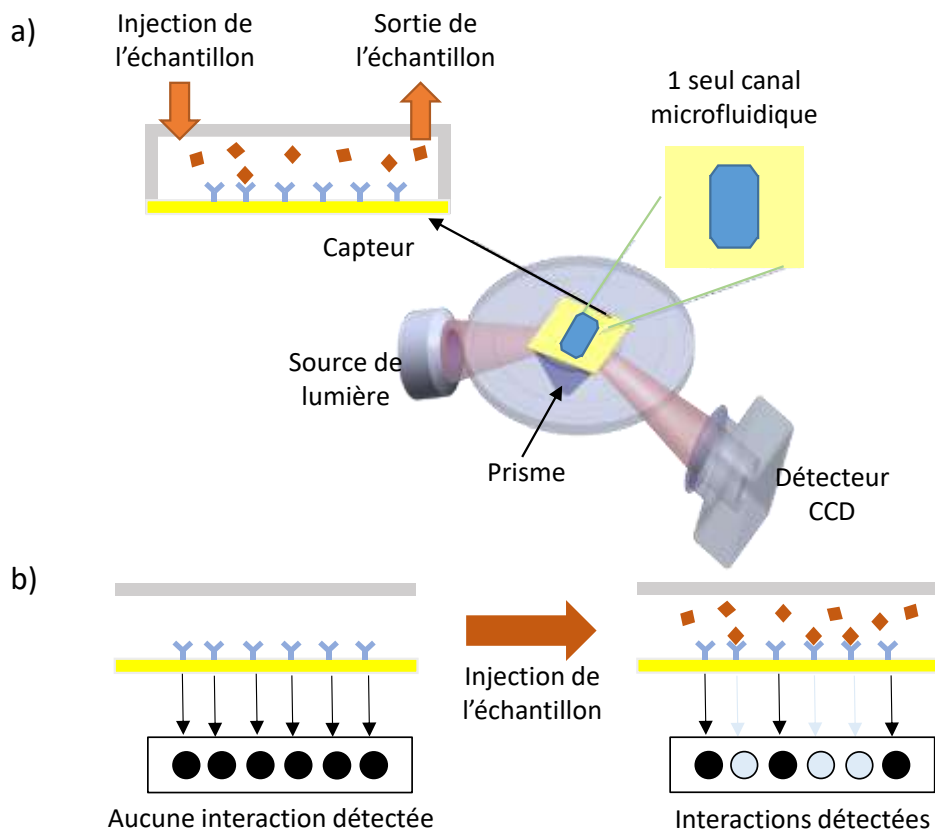
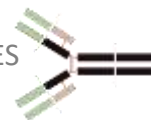


Figure IV- 13 : Principe de la SPRi – a) L'échantillon est injecté dans une chambre fluidique unique. Via une analyse par interrogation en réflectivité, le système peut indiquer s'il y a interaction moléculaire ou non – b) Lorsqu'il n'y a pas d'interaction, l'image reste noire – c) Lorsqu'il y a interaction, le changement de réflectivité est traduit par un changement de valeur d'intensité des pixels

Au cours de l'injection de l'échantillon, les interactions moléculaires induisent une variation localisée de l'indice optique perturbant la résonance de plasmons de surface. En résulte alors une modification de l'intensité du faisceau réfléchi qui apparaît en temps réel sur l'image visualisée. Avant interaction, l'intensité du faisceau réfléchi est au plus bas (angle de résonance initial) : l'image est noire, tous les pixels prennent la valeur d'intensité la plus basse. Après interaction, l'intensité du faisceau réfléchi change entraînant une modification de la valeur d'intensité des pixels. Ce phénomène est schématisé en Figure IV- 13- b.

Les expériences de SPRi qui seront présentées dans la suite de cette partie ont été menées sur l'instrument SPRi, Plex II (Horiba) – 2009.

Les parties suivantes présentent les résultats obtenus grâce à des analyses SPR et SPRi réalisées avec les anticorps de rat anti-souris CD45. Les greffages ont été effectués sur des surfaces de référence (expériences menées à FEMTO ST, Besançon) et sur nos propres surfaces (expériences menées au CRCT, Toulouse).



IV.4.1.2 Détermination du pH de greffage optimal

De nombreux paramètres influent sur la qualité du greffage des anticorps. Le pH de la solution dans laquelle les anticorps sont mis en solution en fait partie. Le pH modifie l'ionisation de fonctions chimiques (par exemple -COOH et -NH_2), ce qui peut notamment entraîner une modification des interactions entre molécules et pouvant également mener, à terme, à la dénaturation des protéines.

Il est possible de déterminer, par analyse SPR, le pH optimal de greffage des anticorps. Pour ce faire, des tests consistant à quantifier la densité de molécules greffées en faisant varier ce paramètre ont été effectués. Pour cette étude, nous avons utilisé les anticorps de rat anti-souris CD45, les avons mis en solution en tampon acétate de sodium (10 mM) et avons fait varier le pH.

Pour effectuer les tests, nous avons utilisé une surface préparée par FEMTO ST : cette préparation inclut le dépôt d'or sur une surface de verre et le dépôt d'une SAM. Cette dernière diffère de la nôtre par la longueur des chaînes aliphatiques utilisées. Un alcane-thiol composé d'une chaîne de 16 carbones et d'un groupement carboxyle, l'acide 16-mercapto-1-hexadécanoïque (16-MHA) de formule initiale $\text{SH-(CH}_2\text{)}_{15}\text{-COOH}$ remplace le 11-MUA. Un alcane-thiol composé d'une chaîne de 11 carbones et d'un groupement hydroxyle, le 11-mercapto-1-undécanol (11-MUOH) de formule initiale $\text{SH-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-OH}$ remplace le 6-MCH.

Avant analyse SPR, la SAM a été activée par dépôt d'une goutte du mélange EDC/Sulfo-NHS (100 mM/ 400 mM dans de l'eau DI) durant 30 minutes à température ambiante. Une fois activée, la surface a été placée dans le support de puce dédié et la puce finale a été placée dans l'instrument de SPR Biacore™ 2000 (GE). Le dispositif final présente alors quatre canaux microfluidiques indépendants les uns des autres, permettant d'effectuer quatre lots de tests différents. Dans notre cas, nous avons fait le choix de tester les quatre pH suivants : pH = 4, pH = 5, pH = 5,5 et pH = 6.

Dans un premier temps, un tampon de course est injecté durant quelques secondes à un débit de 10 $\mu\text{L/min}$. Si aucune dérive n'est constatée, le signal de réponse obtenu (qui est constant) est pris comme signal de référence (indiqué en Figure IV- 14 entre les temps -50 et 0 s). Le tampon de course utilisé dans le cas de cette étude est le PBS 1x, pH 7,4. Le tampon de course et la solution tampon dans laquelle les anticorps sont mis en solution sont différents, ce qui explique la chute du signal constatée dès l'injection au temps 0 (Figure IV- 14). L'expérience se poursuit par l'injection simultanée des quatre solutions (solution tampon d'acétate de sodium (10 mM) à pH égal à 4, 5, 5,5 ou 6) contenant les anticorps anti-CD45 dans les canaux.

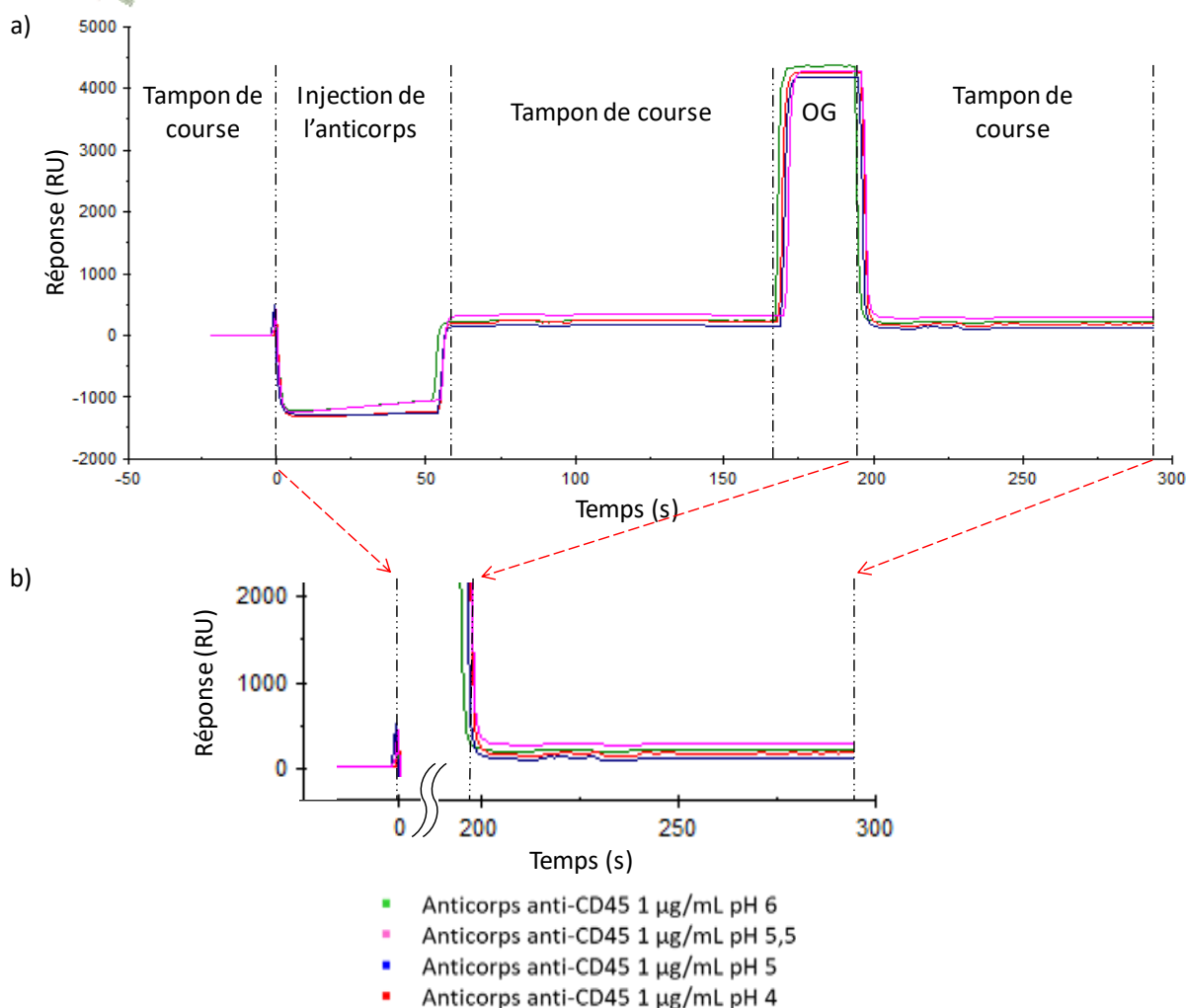


Figure IV- 14 : Réponse SPR (Biacore™ 2000 (GE)) du test permettant de déterminer le pH de greffage optimal réalisé sur 4 solutions d'anticorps de rat anti-souris CD45 dans des solutions de différents pH (pH = 4, pH = 5, pH = 5,5 et pH = 6) – a) Réponse globale obtenue après greffage des anticorps et nettoyage de la surface – b) Zoom sur la réponse de référence et les réponses finales permettant de conclure quant au pH le plus adapté pour le greffage des anticorps

La concentration en anticorps a alors été fixée à 1 $\mu\text{g/mL}$ et la vitesse d'injection a été fixée à 10 $\mu\text{L/min}$ pendant 1 minute. Cette expérience n'ayant pas pour but la détermination de la densité de greffage maximale dans les différentes conditions de pH, nous avons effectué le greffage sur une minute, ce qui permet déjà d'accéder à l'information souhaitée. Les résultats alors obtenus sont exprimés en unité de résonance (RU) qui est une fonction du temps (cf. Figure IV- 14). Pour éliminer les anticorps adsorbés à la surface mais non greffés, la puce est ensuite nettoyée pendant 30 secondes à un débit de 10 $\mu\text{L/min}$ à l'Octyl- β -D-Glucopyranoside (OG) à 40 mM, un détergent non ionique. Une fois le nettoyage à l'OG terminé, le tampon de course est injecté, terminant le processus.

Pour déterminer la condition optimale, il faut comparer la valeur prise pour référence (0 RU dans notre cas) et les réponses obtenues après le nettoyage de la surface à l'OG. Les quatre



courbes présentées en Figure IV- 14 rassemblent ces résultats. La courbe bleue, correspondant au pH = 5, indique une réponse de 143 RU soit 0,143 ng d'anticorps/mm². Cette réponse est plus faible que celle des courbes correspondant aux pH égaux à 4 (courbe rouge) et à 6 (courbe verte) dont les réponses sont respectivement de 153 RU (0,153 ng d'anticorps/mm²) et de 209 RU (0,209 ng d'anticorps/mm²). La courbe rose, correspondant au pH = 5,5 offre la meilleure réponse : 275 RU soit 0,275 ng d'anticorps/mm². Le pH permettant le greffage d'une plus forte densité de molécules est donc le pH égal à 5,5.

Afin de connaître la densité maximale de greffage dans ces conditions, la solution d'anticorps de rat anti-souris CD45 de concentration égale à 2 µg/mL a été injectée à un débit de 10 µL/min pendant 10 minutes. Les augmentations de la concentration en anticorps et de la durée d'injection par rapport à l'expérience précédente ont pour but d'atteindre la saturation de la surface. Cette dernière est alors obtenue après environ 7 minutes d'injection, ce qui est visible en Figure IV- 15 entre les temps 0 et 420 s. La surface a ensuite été nettoyée par injection d'OG : toutes les molécules non adsorbées ont alors été retirées. La réponse finale, suite au nettoyage, indique le greffage effectif en anticorps. Cette réponse est de 2620 RU (2,620 ng d'anticorps/mm²). Il est alors possible de déduire le nombre de molécules greffées sur la surface. Le poids moléculaire d'un anticorps IgG étant de l'ordre de 150 kDa (avec 1 Da = 1 g/mol), nous obtenons $10,5 \cdot 10^9$ sites d'accroche par mm².

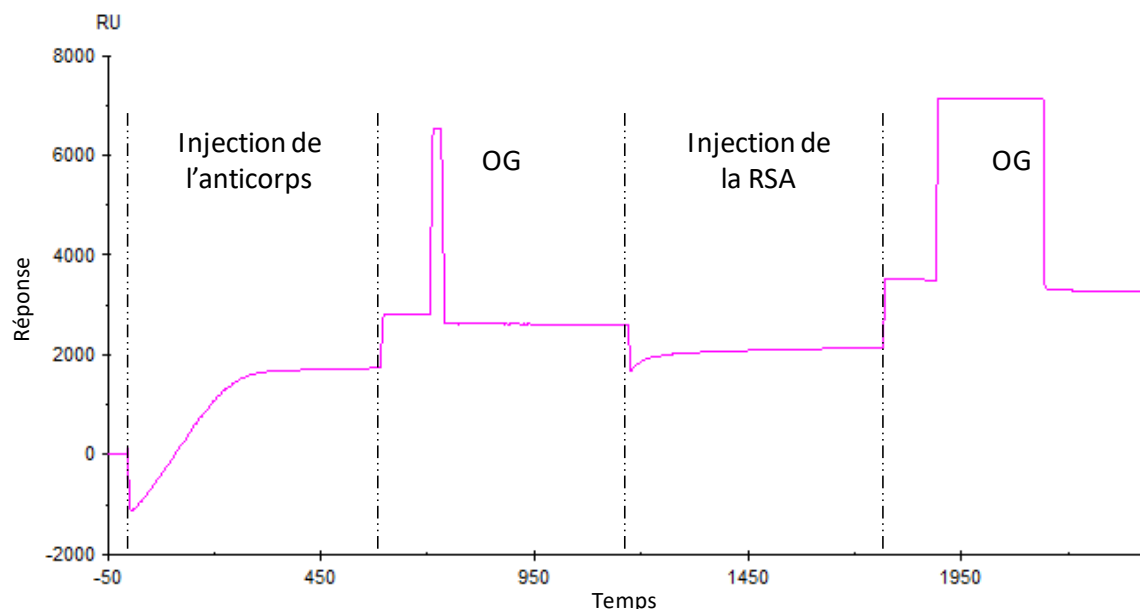


Figure IV- 15 : Réponse SPR (Biacore™ 2000 (GE)) du test d'immobilisation de deux protéines. La première étape (entre les temps 0 et 1400 s) concerne le greffage et le nettoyage de l'anticorps de rat anti-souris CD45 mis en solution à une concentration de 2 µg/mL en tampon acétate de sodium (10 mM) à pH égal à pH 5,5. La deuxième étape (à partir du temps 1401 s) concerne le greffage et le nettoyage de la RSA mise en solution à une concentration de 200 µg/mL en tampon acétate de sodium (10 mM) à pH égal à 4,5

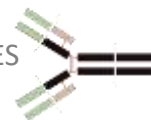
Bien que le greffage paraisse excellent, il est possible qu'il ne soit pas optimal et que de nombreux sites actifs (-COOH activés) restent toujours disponibles. Pour vérifier cela, le test d'immobilisation de l'anticorps a été directement suivi par un test d'immobilisation d'une albumine et plus particulièrement de la RSA (*Rat Serum Albumin*). La RSA, protéine extraite du sérum de rat et initialement sous forme de cristaux, est dissoute dans une solution d'acétate de sodium (10 mM) à pH 4,5. La solution finale, de concentration égale à 200 µg/mL a été injectée à un débit de 10 µL/min pendant 10 minutes. Dans ce cas, la saturation a été obtenue bien plus rapidement, après une minute environ (cf. Figure IV- 15 entre les temps 970 et 1030 s). Le nettoyage à l'OG a constitué la dernière étape. Pour connaître le greffage effectif en albumine, nous avons pris pour référence la réponse obtenue après greffage et nettoyage de l'anticorps de rat anti-souris CD45. En partant de la valeur de référence, 2620 RU, nous avons pu déduire la densité de greffage en albumine. La réponse finale étant de 3300 RU, nous avons déduit que le greffage en albumine est faible : 680 RU (0,680 ng d'anticorps/mm²), indiquant que très peu de sites actifs restaient disponibles après le greffage des anticorps. Il est également possible de déduire le nombre de molécules d'albumine greffées sur la surface. Le poids moléculaire d'une molécule d'albumine étant de l'ordre de 66 kDa, nous obtenons 60.10⁶ sites d'accroche par mm², ce qui, encore une fois, est très faible comparé au nombre d'anticorps anti-CD45 présents.

Une dernière expérience est nécessaire pour pouvoir complètement conclure sur le test d'immobilisation précédemment étudié : caractériser le greffage de l'albumine seule. Ce test constitue un témoin négatif et permet de faire le comparatif entre le greffage de l'albumine en présence et en l'absence d'anticorps. L'albumine a été injectée selon les mêmes conditions que présentées précédemment : mêmes concentration, débit et temps d'injection. La réponse finale obtenue est de 2000 RU après rinçage à l'OG, ce qui indique une haute densité de greffage de la protéine sur la surface. Dans ce cas, nous obtenons 1,8.10¹⁰ sites d'accroche par mm², indiquant que le greffage de l'anticorps anti-CD45 est efficace.

Les tests de SPR ainsi réalisés permettent de formuler deux conclusions. La première est que le pH optimal, celui pour lequel la densité de greffage est maximale, est égal à 5,5. La deuxième est que le greffage de l'anticorps de rat anti-souris CD45 permet d'obtenir une excellente densité de greffage (2,620 ng d'anticorps/mm²) et que peu de sites actifs restent disponibles.

IV.4.1.3 Détermination de la concentration adaptée en anticorps pour un greffage optimal lors d'une fonctionnalisation en bain

Tout au long de cette étude, nous avons cherché à développer un protocole de fonctionnalisation de surface en immergeant nos échantillons dans différents bains. Cette méthode de fonctionnalisation, réalisée « en statique », s'oppose directement à la



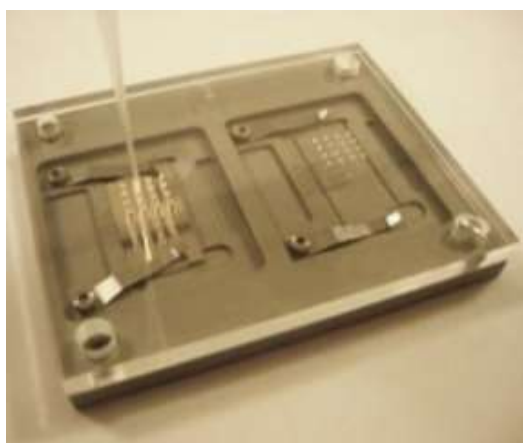
fonctionnalisation en flux. Les deux méthodes diffèrent également par leurs paramètres qui ne peuvent être transposés directement entre les deux méthodes.

Divers paramètres comme la concentration en anticorps ou encore le temps de greffage que nous avons utilisés pour réaliser les expériences de greffage en SPR ne peuvent pas être appliqués dans le cas d'une fonctionnalisation en bains. Nous conservons toutefois la valeur du pH de la solution qui a été optimisée pour obtenir un greffage d'anticorps maximal.

Parmi les paramètres de greffage, la concentration initiale en anticorps exerce une forte influence sur l'efficacité de greffage c'est pourquoi nous avons choisi de l'étudier. Une méthode adaptée à la comparaison de l'efficacité de greffage de diverses solutions d'anticorps (de concentration ou pH différents) est l'analyse par SPRi. Cette méthode, au contraire de la SPR, offre la possibilité d'évaluer simultanément un grand nombre d'éléments (analyse multiplexée) grâce notamment à une grande surface d'analyse (7 mm x 6 mm).

En effet, grâce aux outils développés par l'équipe BioMicrodevices de FEMTO ST¹²⁴, il est possible de réaliser, sur une même surface, une matrice de gouttes ou *spots* d'anticorps où chaque *spot* correspond à une condition. Un exemple de dispositif de *spotting* développé à FEMTO ST ainsi que le réseau final de gouttes correspondant sont rassemblés en Figure IV- 16. Il est également possible d'adapter le nombre de *spots* pour tester autant de conditions que souhaité et pour avoir plusieurs fois la même condition afin d'assurer la reproductibilité et la fiabilité des résultats.

a)



b)

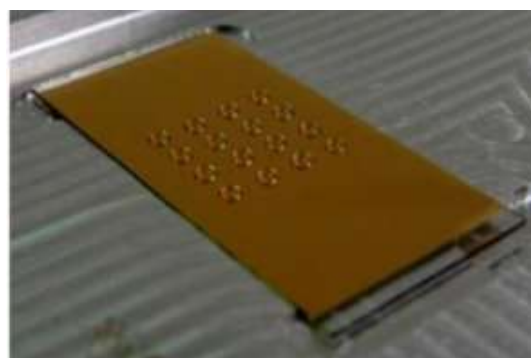


Figure IV- 16 : a) Image du *spotter* utilisé pour déposer les gouttes de 300 nL de solutions d'anticorps. Le dispositif comprend un logement permettant de bloquer la surface d'or avec des bras métalliques ainsi qu'un guide en plexiglas permettant de guider le cône d'une micropipette – b) Image d'une matrice de 16 gouttes ¹²⁴

Pour réaliser cette expérience, nous avons à nouveau utilisé une surface réalisée par FEMTO ST Engineering (dépôt d'or sur lame de verre et dépôt de la SAM). La SAM a ensuite été activée par dépôt d'une goutte du mélange EDC/Sulfo-NHS (100 mM/ 400 mM dans l'eau DI) durant

30 minutes à température ambiante. Une fois la surface activée, vient l'étape de greffage des anticorps. Pour cela, nous avons fait le choix d'utiliser une matrice comportant 16 *spots* (la même que celle présentée en Figure IV- 16), ce qui a permis de tester 6 conditions différentes à minima deux fois (soit deux *spots* au minimum pour chaque condition). Le volume de solution déposée est de 300 nL pour chaque goutte. Les paramètres ayant été amenés à varier sont la concentration en anticorps et le pH de la solution. Les concentrations ont été fixées à 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL ou 200 µg/mL d'anticorps de rat anti-souris CD45 dans une solution d'acétate de sodium (10 mM) à pH = 5,5 et 10 µg/mL ou 500 µg/mL dans une solution de PBS 1x à pH = 7,4. La répartition des 6 groupes de conditions est schématisée en Figure IV- 17. Des *spots* ont également été pris sur la surface pour servir de référence.

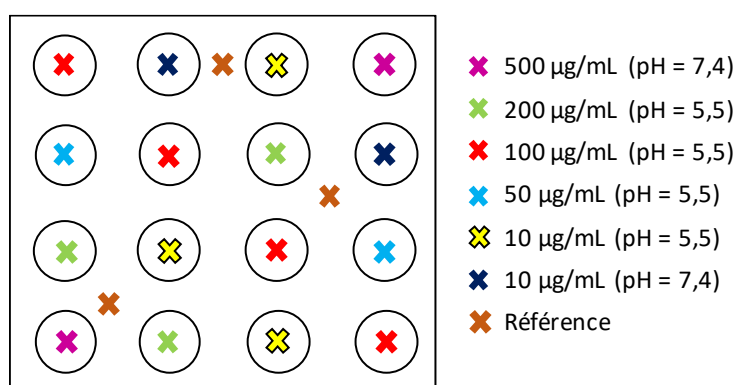


Figure IV- 17 : Répartition des 6 groupes de conditions sur 16 *spots* selon deux paramètres : concentration en anticorps et pH de la solution. Indication des *spots* de référence pris aléatoirement sur la surface

Une fois les solutions déposées, le dispositif est placé dans un récipient lui-même placé dans un bac à ultrasons (Elma) réglé à une fréquence de 37 kHz et à 30 % de sa puissance maximale. L'agitation s'effectue pendant 30 minutes à une température de 20 °C. Cette étape permet d'augmenter les performances d'interactions biologiques en générant des mouvements fluidiques à l'intérieur des gouttes. Les travaux réalisés à ce sujet à Femto ST¹²⁴ indiquent que, suite à l'agitation, le greffage est homogène sur la totalité du spot. Après incubation, la surface n'est ni rincée ni séchée et ce, afin d'éviter de générer des coulures (greffage des anticorps sur les zones où la surface est encore activée et libre) et ainsi obtenir des *spots* très propres. La surface fonctionnalisée est alors directement montée sur un prisme de verre à l'aide d'une huile de couplage d'indice 1,65 puis l'ensemble est placé dans le SPRI-Plex II d'Horiba-Scientifique.

L'expérience est amorcée par une injection de quelques secondes de tampon de course, dans ce cas du PBS 1x, pH 7,4. Elle se poursuit par deux nettoyages par injection d'une solution d'OG à 40 mM pendant 30 secondes à un débit de 50 µL/min pour retirer les molécules non adsorbées. Par la suite, l'injection d'une solution de RSA à 20 µg/mL à un débit de 10 µL/min



permet de mettre en évidence les *spots*. En effet, grâce à l'image différentielle, les zones où la RSA se greffe, c'est-à-dire partout où il reste des sites actifs, peuvent être distinguées des zones où elle ne se greffe pas (zones saturées en anticorps), ce qui est mis en avant en Figure IV- 18. La Figure IV- 18- a correspond à l'image en temps réel de l'injection de la protéine : ni les *spots* ni le greffage de la RSA ne sont visibles. La Figure IV- 18- b correspond à l'image différentielle : les zones où la protéine se greffe sont blanches et les zones où elle ne se greffe pas (saturées par les anticorps), restent noires. La Figure IV- 18- c rappelle quant à elle les positions des différents *spots* selon la condition qu'ils représentent.

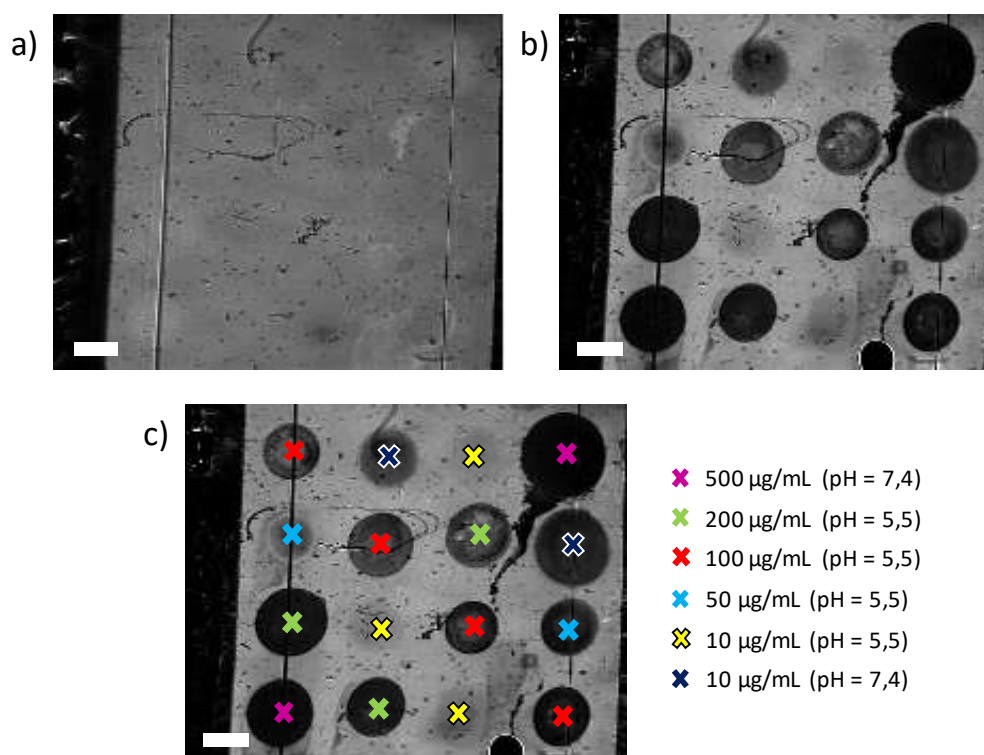


Figure IV- 18 : Résultats de l'analyse par SPRi au cours de l'injection de RSA (concentrée à 20 µg/mL en tampon acétate de sodium (10 mM) à pH égal à 4,5) à un débit de 10 µL/min – a) Image réelle lors du greffage de la RSA – b) Image différentielle – c) Rappel de la localisation des différentes conditions. La barre d'échelle est de 1 mm

Quelques premières conclusions peuvent être faites *via* l'observation de ces images et notamment sur l'efficacité du greffage des anticorps dans les 16 *spots* réalisés. Il apparaît déjà que certains *spots* ont presque disparu : sur les 16 initialement déposés, seuls 13 se distinguent parfaitement de la surface. Cela indique donc que certaines conditions n'ont pas permis d'obtenir un greffage efficace des anticorps puisque la majorité des sites est occupée par la RSA. Il apparaît également que les spots n'ont pas fusionné et qu'une seule coulée a été générée. Cette dernière n'a toutefois pas eu d'impact sur les *spots* alentours puisqu'elle n'est rattachée qu'à un seul *spot*.

La surface est ensuite nettoyée à l'OG (40 mM, pendant 30 secondes, à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$) pour retirer les protéines non greffées de manière covalente. L'image finalement obtenue est indiquée en Figure IV- 19- a. De même qu'observé avant nettoyage de la surface, seuls 13, voire même 12 des 16 *spots* sont visibles. La Figure IV- 19- b rappelle l'emplacement des différentes conditions testées. Il apparaît nettement que les conditions les moins adaptées correspondent à une concentration en anticorps égale à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans une solution d'acétate de sodium (10 mM) à pH égal à 5,5. Il apparaît également que la condition 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en solution PBS 1x, pH 7,4, conduit à l'obtention d'une meilleure densité de greffage que la solution de même concentration en solution acétate de sodium (10 mM) à pH égal à 5,5. Cependant, les résultats ne sont pas reproductibles : la densité de greffage diffère fortement d'un *spot* à l'autre. Ces premiers résultats ne sont pas satisfaisants, c'est pourquoi ces conditions ne seront pas retenues pour le protocole de fonctionnalisation final.

Parmi les conditions restantes, celle correspondant à la concentration de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans la solution de PBS 1x, pH 7,4, fournit les *spots* les plus homogènes et présentant le greffage le plus dense. Il en est de même pour la condition associée à la concentration de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en solution acétate de sodium (10 mM) à pH égal à 5,5. En effet, les *spots* correspondants sont globalement homogènes et la densité de greffage semble être très proche de celle obtenue avec la concentration maximale (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Au vu du peu de différence entre les résultats de greffage obtenus avec ces deux conditions, celle nécessitant le plus de ressources, c'est-à-dire celle associée à la plus forte concentration (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) peut être abandonnée. Pour terminer, la condition correspondant à la concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en solution acétate de sodium (10 mM) à pH égal à 5,5 permet d'obtenir un greffage homogène et des résultats reproductibles. Cette condition est donc retenue et intégrée dans notre protocole de fonctionnalisation.

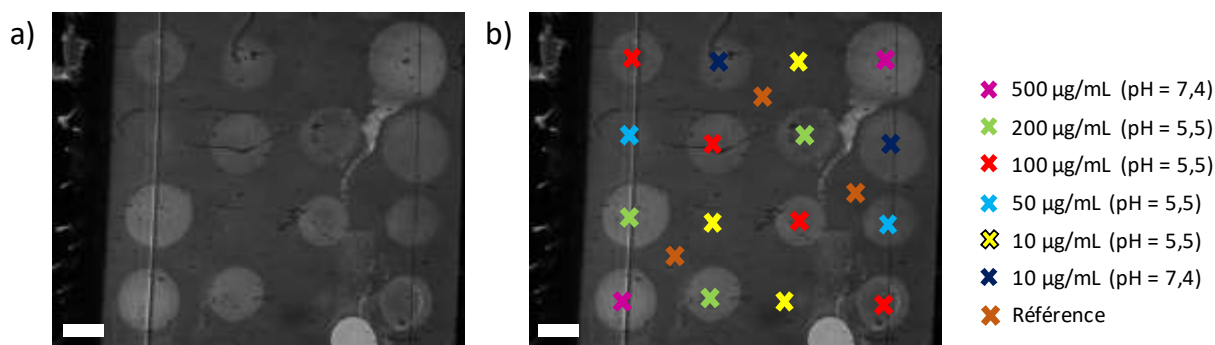
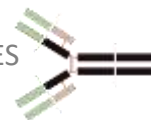


Figure IV- 19 : Résultats de l'analyse par SPRI pendant l'injection de PBS 1x - a) Image différentielle - b) Mise en évidence des groupes de gouttes déposées sur le substrat correspondant aux 6 conditions testées et à la référence prise aléatoirement sur la surface. La barre d'échelle est de 1 mm



Cette étude qualitative a permis de déterminer la concentration en anticorps optimale menant à l'obtention d'une haute densité de greffage et d'un greffage homogène et reproductible. Le protocole de fonctionnalisation intégrera ainsi les paramètres établis précédemment : les anticorps seront mis en solution à une concentration de 100 µg/mL dans une solution tampon d'acétate de sodium (10 mM) à pH égal à 5,5.

Les études réalisées à FEMTO ST nous ont permis de définir, sur une surface de référence, certains paramètres de greffage optimaux. Dans une démarche visant à la continuité des travaux réalisés à PharmadeV et au LAAS, nous avons décidé de transposer le protocole optimisé sur notre SAM.

IV.4.1.4 Détermination du ratio optimal en thiols

Les expériences précédemment réalisées ont ainsi mené à l'optimisation de certains paramètres du protocole de fonctionnalisation de surface. Toutefois, les résultats ont été obtenus à partir d'une SAM dont les molécules, les thiols, diffèrent de celles que nous utilisons. En effet, le traitement de surface réalisé à FEMTO ST implique les molécules 11-MUOH et 16-MHA alors que nous utilisons les molécules 6-MCH et 11-MHA. Cette SAM comporte une autre différence : le ratio en thiols, autrement dit, le % de MCH par rapport aux MUA. En effet, les précédents développements ont été effectués sur une surface comportant 3 % de 16-MHA et 97 % de 11-MUOH. Dans notre cas, les premières expériences ont été réalisées sur une SAM légèrement différente comportant 5 % de 11-MCH et 95 % de 6-MUA.

L'objectif des expériences décrites dans cette partie est de déterminer le ratio en thiols (% en 6-MCH et 11-MUA) optimal, c'est-à-dire celui qui permettrait d'obtenir la meilleure densité de greffage tout en intégrant au protocole de fonctionnalisation les paramètres optimisés à FEMTO ST. Pour ce faire, trois SAM présentant des ratios en thiols différents ont été testées. Les trois ratios testés sont les suivants : 1:10 (0,2 mM de 11-MUA et 2 mM de 6-MCH), 1:20 (0,1 mM de 11-MUA et 2 mM de 6-MCH) et 1:32 (0,03 mM de 11-MUA et 0,97 mM de 6-MCH).

Les tests ont été menés au Pôle Technologique du CRCT (Plateau Imagerie Cellulaire / Plateau Interactions Moléculaires) à Toulouse. Le protocole de fonctionnalisation a été appliqué sur des surfaces adaptées aux outils Biacore T200 et achetées auprès de la société GE Healthcare. Ces surfaces sont des lames de verre sur lesquelles a été déposée une fine couche d'or.

Le traitement de ces surfaces débute par un nettoyage de la surface à l'éthanol 70 % avec un tissu dédié au nettoyage des objectifs pour microscope. Cette première étape permet de retirer les poussières présentes sur la surface. Le dépôt de la SAM s'effectue en suivant, par immersion de la surface (surface en verre orientée vers le fond du bécher pour permettre le greffage des molécules sur la couche d'or) dans un bain contenant un mélange de thiols

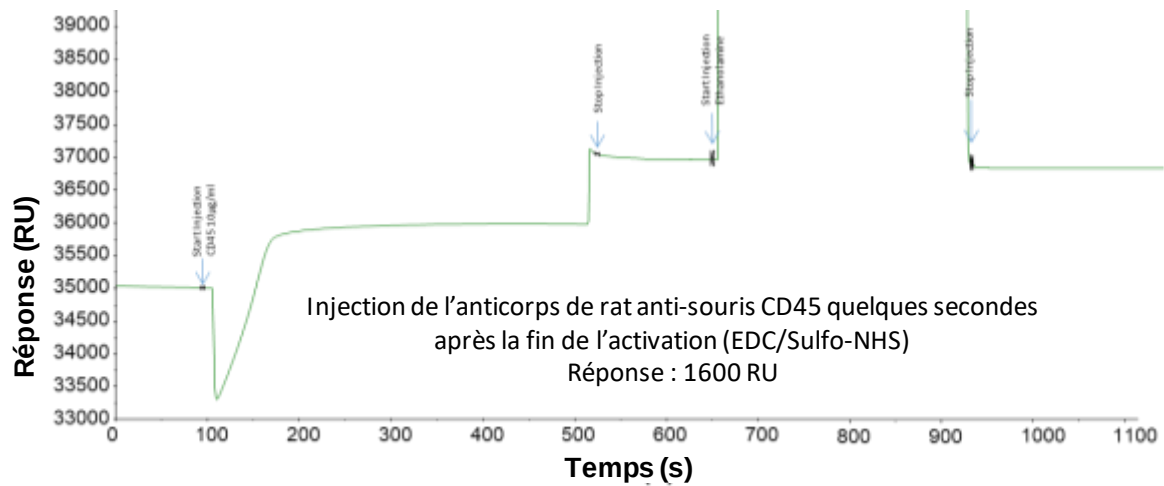
11-MUA et 6-MCH dilués dans de l'éthanol absolu. Le greffage s'effectue pendant 18 h à T_{amb} et à l'abri des UV. La surface est ensuite rincée sous jet d'éthanol 70 % puis nettoyée en bain d'éthanol 70 % sous ultrasons pendant 5 minutes. La surface est finalement séchée à l'azote et conservée à l'abri des UV.

Une fois prête, la surface est placée dans le support de puce adéquat avant d'être positionnée dans l'instrumentation SPR. Une fois la puce en place, l'instrumentation SPR est amorcée par une injection de quelques secondes de tampon de course, dans ce cas le tampon GE Healthcare Life Sciences™ HBS-EP 10x (contenant 0,1 M HEPES, 1,5 M NaCl, 30 mM EDTA, 0,5 % de surfactant v/v P20). La surface est ensuite activée par injection du mélange EDC/Sulfo-NHS (100 mM/ 400 mM dans de l'eau DI) à un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 7 minutes. Ces étapes sont suivies par l'injection à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 10 minutes de la solution d'anticorps de rat anti-souris CD45 de concentration égale à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampon acétate de sodium (10 mM, pH 5,5). L'expérience se termine par une injection d'éthanolamine (1 M à pH = 8,5) pendant 7 minutes à un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ qui permet de désactiver les esters encore actifs.

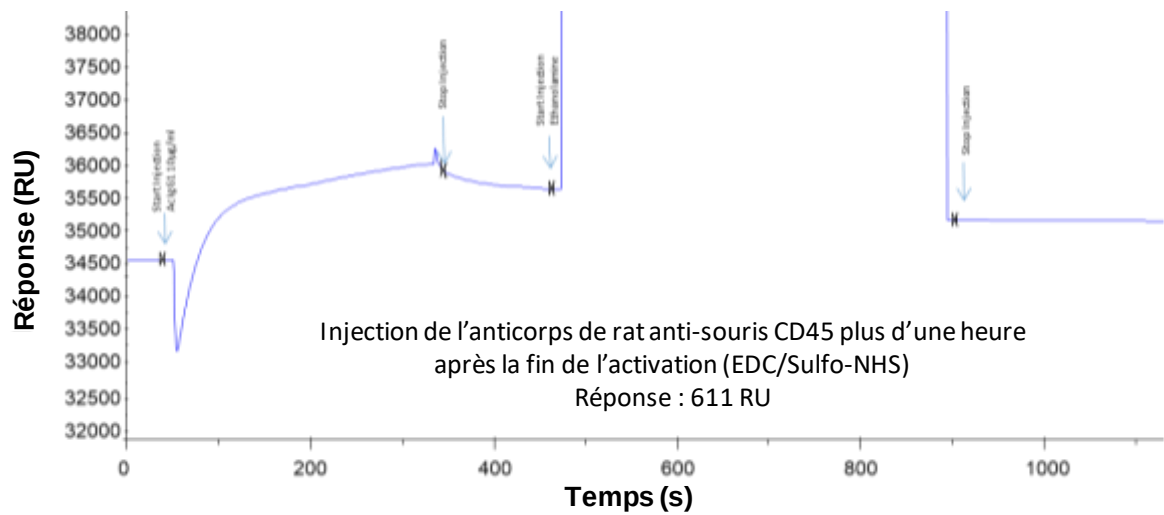
Les résultats obtenus ont tout d'abord permis d'établir le fait qu'une durée trop importante entre l'activation et le greffage des anticorps conduit à une réduction significative de la densité de greffage des anticorps. Les courbes présentées en Figure IV- 20 correspondent aux réponses obtenues après greffage de l'anticorps puis passivation à l'éthanolamine à des temps différents après la fin de l'activation. Ces mesures ont été effectuées sur une même surface dont la SAM comporte un ratio en thiols égal à 1:32. La courbe verte (Figure IV- 20- a) correspond au cas où les anticorps ont été injectés directement après activation. Dans ce cas, la réponse est de l'ordre des 1600 RU (soit 1,600 ng d'anticorps/ mm^2). La densité de greffage chute brutalement après une attente d'une heure entre la fin de l'activation de la surface et l'injection des anticorps, ce qui est indiqué par la courbe bleue (Figure IV- 20- b). Dans ce cas la réponse est de seulement 611 RU (0,611 ng d'anticorps/ mm^2). La densité de greffage est encore un peu plus impactée par une attente dépassant l'heure et demie : 422 RU (0,422 ng d'anticorps/ mm^2). Il apparaît ainsi nettement qu'il est important de réaliser le greffage des anticorps dès la fin de l'étape d'activation pour obtenir une densité de greffage maximale. Dans le cas contraire, l'ester est hydrolysé pour redonner l'acide carboxylique de départ et il faut recommencer l'activation.



a)



b)



c)

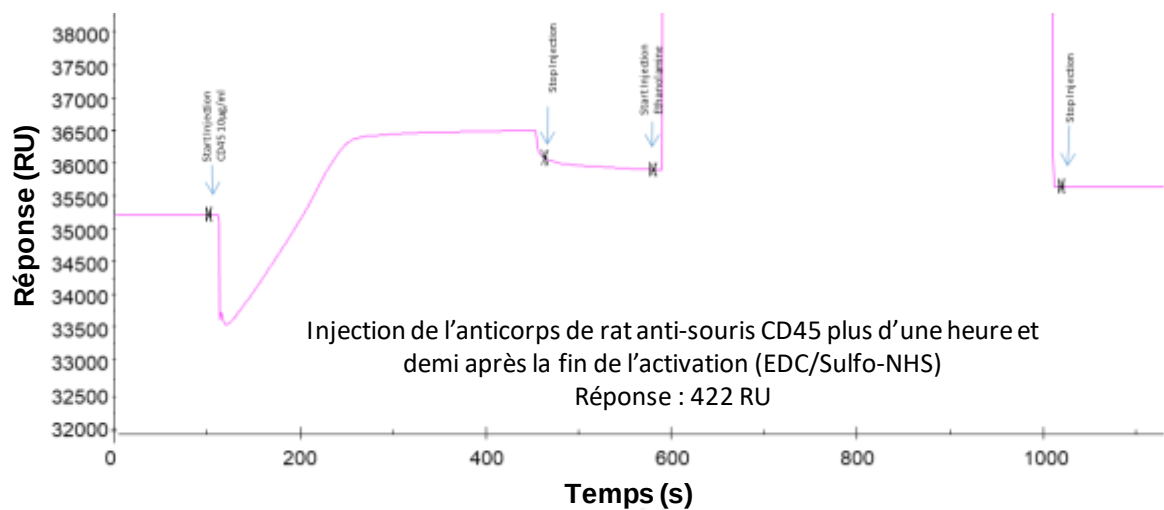


Figure IV- 20 : Réponse SPR après greffage des anticorps de rat anti-souris CD45 sur une SAM activée comportant un ratio en thiols égal à 1:32 – a) Cas du greffage réalisé après quelques secondes d'activation – b) Cas du greffage réalisé après un peu plus d'une heure de la fin de l'activation de la surface – c) Cas du greffage réalisé après plus d'une heure et demi de la fin de l'activation de la surface

Les différents essais ont également permis de déterminer le ratio en thiols conduisant à la meilleure densité de greffage. Le ratio 1:20 est celui qui permet d'obtenir la meilleure densité de greffage. En effet, comme indiqué en Figure IV-21, la réponse finale, obtenue après passivation de la surface à l'éthanolamine est de 2000 RU (soit 2,000 ng d'anticorps/mm²). Le nombre de sites d'accroche ainsi généré est de $8 \cdot 10^9$ sites par mm², ce qui est très proche des résultats obtenus sur la surface de référence, pour rappel se référer à la partie **IV.4.1.2**.

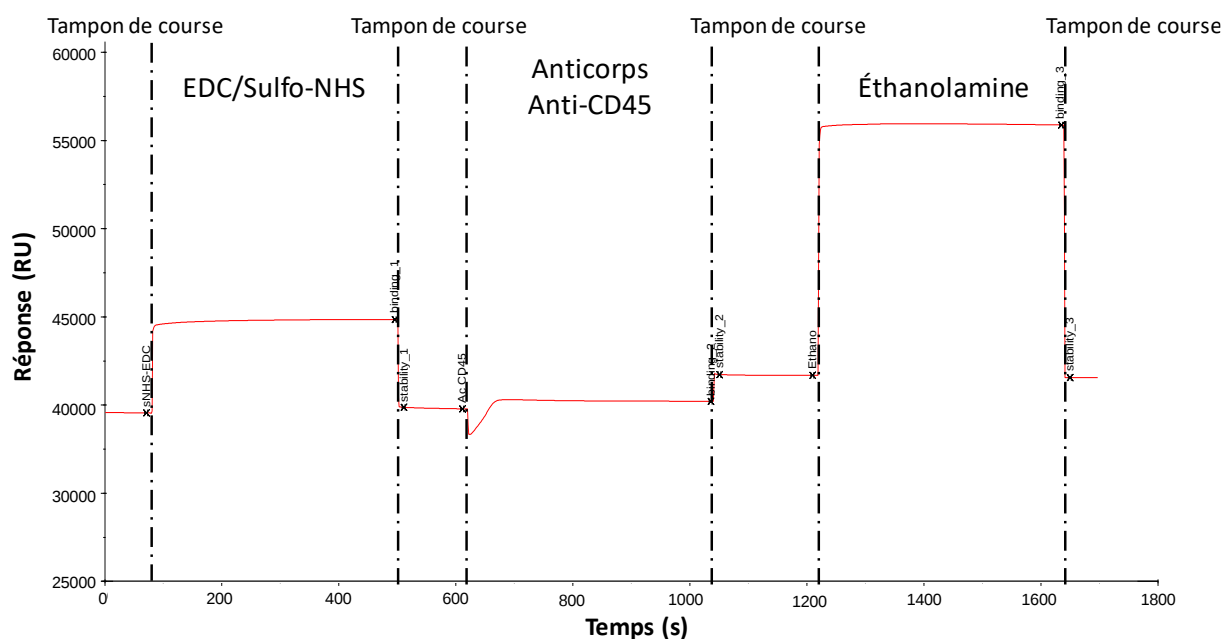


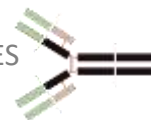
Figure IV-21 : Analyse SPR du greffage des anticorps de rat anti-souris CD45 sur une surface dont la SAM a été préparée avec un ratio en thiols 1:20 (0,1 mM de 11-MUA et 2 mM de 6-MCH)

Les ratios 1:10 et 1:32, dont les réponses sont rassemblées en annexe **IV/ Détermination du ratio en thiols adapté à un greffage en anticorps optimal – courbes annexes**, fournissent quant à eux des réponses plus faibles et respectivement égales à 1300 RU (soit 1,300 ng d'anticorps/mm²) et 1600 RU (soit 1,600 ng d'anticorps/mm²).

Notre protocole de fonctionnalisation mettra donc en jeu une SAM de ratio en thiols 1:20 (0,1 mM de 11-MUA et 2 mM de 6-MCH).

IV.4.1.5 Bilan

Les analyses SPR et SPRI du greffage des anticorps de rat anti-souris CD45 ont permis de valider trois paramètres du protocole de fonctionnalisation. Ces paramètres concernent deux étapes du protocole : la formation de la SAM et le greffage des anticorps. Pour rappel, nous cherchons à réaliser un protocole de fonctionnalisation en immergeant nos échantillons, soit une fonctionnalisation en bains, ce qui a impliqué d'adapter certains paramètres.



Il a ainsi été démontré, sur une surface de référence recouverte d'or, que le greffage des anticorps est optimal dans le cas d'une concentration de 100 µg/mL dans une solution tampon d'acétate de sodium (10 mM) à pH égal à 5,5. Il a également été démontré que le meilleur greffage des anticorps (mis en solution dans le tampon acétate) a été obtenu après la formation d'une SAM dont le ratio en thiols (11-MUA et 6-MCH) est 1:20 (0,1 mM de 11-MUA et 2 mM de 6-MCH). Pour finir, nous avons constaté que l'activation de surface est plus efficace dans le cas de l'utilisation du mélange EDC/Sulfo-NHS à des concentrations respectives de 400 mM et 100 mM. Tous ces paramètres ont ainsi été inclus dans notre protocole de fonctionnalisation final.

IV.4.2 Optimisation du protocole de fonctionnalisation de surface par analyse en fluorescence

En parallèle des travaux menés à l'aide des techniques de SPR et SPRI, nous avons mis en place une méthode de validation par fluorescence. Cette dernière a le double avantage de nous permettre de nous affranchir d'équipements non disponibles au laboratoire et d'anticiper des études ultérieures que nous avons à mener sur des puces microfluidiques.

Les surfaces impliquées pour ces expériences diffèrent des surfaces précédemment employées puisqu'elles ne nécessitent pas la présence d'or. Ce dernier étant à l'origine du phénomène d'extinction de la fluorescence, il est apparu nécessaire de dissocier, dans un premier temps, fluorescence et surface d'or. Ainsi, nous avons testé le protocole de fonctionnalisation sur des surfaces de verre silanisé.

IV.4.2.1 Caractérisation du protocole de fonctionnalisation sur une surface de référence

La caractérisation en fluorescence du protocole de fonctionnalisation de surface est rendue difficile par le phénomène d'extinction de fluorescence. Nous avons alors choisi de caractériser le protocole de fonctionnalisation sur des surfaces de verre silanisé. Les travaux qui seront présentés dans cette partie ont été réalisés avec la collaboration d'Emmanuelle Trevisiol, chargée de recherche au LAAS-CNRS.

Les silanes, comme les thiols comportent 3 parties : le groupement composé d'une fonction alcoxysilane permettant l'accroche covalente de la molécule sur la surface, le squelette et le groupement permettant l'accroche des biomolécules. Bien que le protocole de greffage des silanes sur le verre soit différent de celui du greffage des thiols sur l'or, le principe reste le même. En effet, de même que pour les thiols, le groupement devant s'accrocher sur le support se lie de façon covalente à la surface, dans ce cas le verre. Les groupements devant permettre le greffage des biomolécules sont quant à eux orientés vers l'extérieur. Pour une raison d'économie de temps, nous n'avons pas réalisé nous-même le greffage des silanes sur des

surfaces en verre et avons acheté des surfaces auprès de la société PolyAn. Deux types de silanes ont été employés : des silanes dont le groupement devant permettre l'accroche de l'anticorps est soit une fonction carboxyle (schématisation en Figure IV- 22- a) soit une fonction époxyde (schématisation en Figure IV- 22- b).

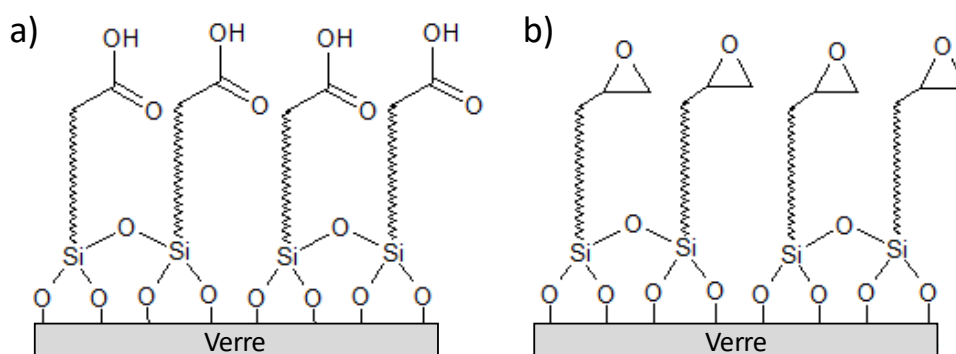


Figure IV- 22 : Lames de verre fonctionnalisées – a) Par un groupement carboxyle – b) Par un groupement époxyde

Les lames comportant les fonctions carboxyles ont pour rôle la caractérisation du protocole de fonctionnalisation dans son ensemble : de l'activation au greffage des anticorps secondaires. Les lames comportant les fonctions époxydes permettent quant à elles de caractériser l'efficacité de greffage des anticorps et deviennent ainsi un témoin positif de l'accroche des anticorps sur une surface.

Afin d'optimiser l'espace de travail offert par les lames et de tester plusieurs paramètres, nous avons utilisé des puits pour définir différentes zones. Les lames de verre silanisé (de dimensions 25 mm x 75 mm x 1 mm) peuvent accueillir 4 puits carrés dont la surface libre intérieure (surface pouvant être fonctionnalisée) est de 1 cm². Les puits sont schématisés en bleu-gris sur la Figure IV- 23.

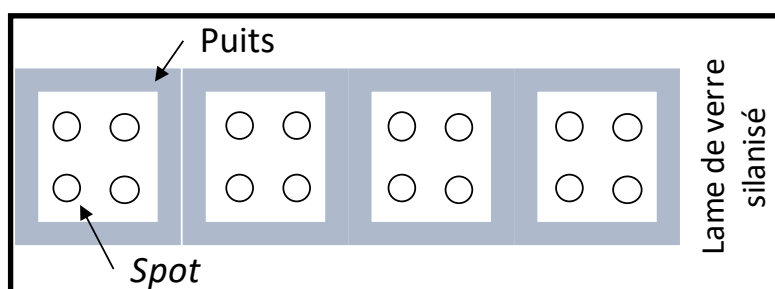
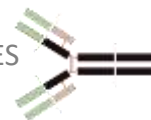


Figure IV- 23 : Schématisation d'une lame de verre silanisé sur laquelle ont été positionnés 4 puits de surface intérieure disponible égale à 1 cm² et localisation des 4 gouttes d'anticorps par puits

Les lames et plus particulièrement chaque puits a été fonctionnalisé selon le protocole adapté au groupement permettant l'accroche de l'anticorps. Dans le cas de la lame présentant un



groupement carboxyle, le protocole débute par l'activation de la surface par dépôt d'une goutte du mélange EDC/Sulfo-NHS (100 mM / 400 mM dans l'eau DI) durant 30 minutes à T_{amb} . La surface est ensuite rincée sous jet d'eau ultra pure puis séchée sous azote. Vient ensuite le greffage des anticorps. Bien que ne possédant pas d'outil pour réaliser une matrice de *spots*, nous avons pu tester 4 conditions différentes dans chaque puits en déposant des gouttes de 500 nL. Les puits et l'emplacement des 16 *spots*, soit 4 *spots* par puits, sont schématisés en Figure IV- 23. Dans un premier puits, nous avons vérifié l'influence de la concentration en anticorps primaires de rat anti-souris/humain CD45R/B220 en tampon acétate de sodium (10 mM) à pH 5,5. Dans un deuxième puits, nous avons fait varier la concentration en anticorps primaire de rat anti-souris/humain CD45R/B220 en tampon PBS 1x. Le fait de pouvoir déposer 4 *spots* par puits permet de tester 4 concentrations différentes : 0 $\mu\text{g/mL}$ (solution tampon sans anticorps), 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ et 150 $\mu\text{g/mL}$. Dans un troisième puits, nous avons choisi de répéter la condition 100 $\mu\text{g/mL}$ dans chacune des solutions tampon : 2 *spots* correspondent au tampon acétate de sodium (10 mM) à pH 5,5 et 2 *spots* correspondent au tampon PBS 1x. Enfin, dans le dernier puits, nous avons voulu réaliser un témoin positif en greffant l'anticorps secondaire FITC de chèvre anti-rat IgG à une concentration fixée à 50 $\mu\text{g/mL}$ aussi bien en tampon acétate de sodium (10 mM) à pH égal à 5,5 (2 *spots* pour cette condition) qu'en tampon PBS 1x (2 *spots* pour cette condition). Le greffage des anticorps a été réalisé sur une durée de 3 h à T_{amb} . Une goutte de solution de BSA (*Bovine Serum Albumin* ou Sérum de Vœu Foetal) à 20 mg/mL est ensuite directement déposée sur la surface. Cette étape permet de passiver la surface en empêchant de futurs greffages non spécifiques, notamment celui de l'anticorps secondaire. Cette étape est réalisée à T_{amb} sur une durée de 30 minutes. Le rinçage de la solution de BSA s'effectue par retrait du liquide par pipette puis par dépôt d'une goutte de PBS 1x (cette étape est répétée 3 fois). A ce stade, il est important de ne pas sécher la surface pour préserver la couche d'anticorps. La dernière étape consiste à injecter une solution d'anticorps secondaires : l'anticorps FITC de chèvre anti-rat IgG à une concentration de 1 $\mu\text{g/mL}$ en tampon PBS 1x pendant 30 minutes. La lame est finalement immergée dans un bain de PBS 1x puis séchée sous pistolet azote.

Dans le cas de la surface comportant un groupement époxyde, l'étape d'activation n'est pas nécessaire. Cette étape est donc retirée du protocole de fonctionnalisation de surface. Les autres étapes sont quant à elles identiques à celles décrites précédemment.

Les lames ont ensuite été analysées par le scanner InnoScan® 1100 de la société Innopsys. Équipé de trois sources d'excitation laser, cet outil peut analyser l'intégralité d'une lame. Parmi les trois longueurs d'onde d'excitation disponibles (488 nm, 532 nm et 635 nm), celle que nous retenons est 488 nm. Cette longueur d'onde est très proche de la longueur d'onde d'excitation du fluorochrome FITC qui est de 490 nm. Il est également possible, grâce à cet outil, d'affiner l'analyse en choisissant une bande passante. Le fluorochrome FITC émet entre

475 et 650 nm et possède un pic d'émission à 521 nm. Pour réaliser nos analyses nous avons alors choisi comme valeur centrale 510 nm et une bande passante de 20 nm. L'image scannée est alors analysée informatiquement et une valeur d'intensité est attachée à chaque pixel. L'analyse de la puce peut ainsi se faire de manière qualitative par comparaison visuelle des échantillons mais également de manière quantitative par mesure des intensités (soit de façon ponctuelle, soit sur une zone sélectionnée).

Dans un premier temps, la lame de verre présentant les groupements époxydes a permis de caractériser la capacité d'accroche des anticorps. Cette première expérience a démontré que, dans nos conditions (autrement dit, avec le protocole de fonctionnalisation que nous avons choisi), les anticorps n'ont aucune difficulté à se greffer sur une surface fonctionnalisée.

Nous avons par la suite cherché à caractériser le greffage des anticorps sur la lame de verre présentant les groupements carboxyles. Les résultats de cette expérience sont rassemblés en Figure IV- 24. Une image de la lame entière a tout d'abord été prise pour déterminer la position des éléments d'intérêt à analyser (puits et *spots*). Une fois les éléments d'intérêt détectés, une analyse par puits, de chaque *spot* et donc plus localisée, a été effectuée. Dans chaque cas, une première analyse visuelle a été faite puis a été complétée par une mesure d'intensité. Cette mesure correspond à la moyenne des valeurs d'intensité prises par tous les pixels de la zone sélectionnée. Dans un premier temps, la valeur de l'intensité moyenne de chaque *spot* est comparée à la valeur de l'intensité moyenne prise par la surface et qui constitue la référence. Suite à cela, les intensités moyennes des 4 *spots* d'un même puits peuvent être comparées entre elles. Les résultats présentés en suivant sont divisés en cadres de couleur. Chaque cadre représente un puits, chaque puits rassemblant différentes conditions de greffage.

Le premier cadre, le cadre rouge, est associé au greffage de l'anticorps secondaire FITC de chèvre anti-rat IgG mis en solution à une concentration fixée à 50 µg/mL soit en solution tampon acétate de sodium (10 mM), pH 5,5 (2 *spots* de gauche) soit en PBS 1x (2 *spots* de droite). Il apparaît que l'anticorps secondaire se greffe parfaitement et ce, quelle que soit la solution tampon dans laquelle il est mis en solution. Le greffage semble visuellement meilleur pour le tampon acétate de sodium. Ceci est confirmé par les mesures d'intensité réalisées sur chacun des 4 *spots*. Dans le cas d'une mise en solution en tampon acétate de sodium, l'intensité moyenne relative des deux *spots* est de 46900 unités arbitraires (UA) tandis que l'intensité moyenne relative pour une mise en solution en tampon PBS 1x est 31590 (UA). Ces mesures confirment ainsi que le greffage est meilleur dans le cas d'une mise en solution des anticorps en tampon acétate de sodium à pH 5,5. Les observations permettent également de montrer que la BSA a effectivement passivé la surface. Si tel n'avait pas été le cas, l'anticorps secondaire se serait greffé, de façon non spécifique, sur la surface entre les *spots* d'anticorps.

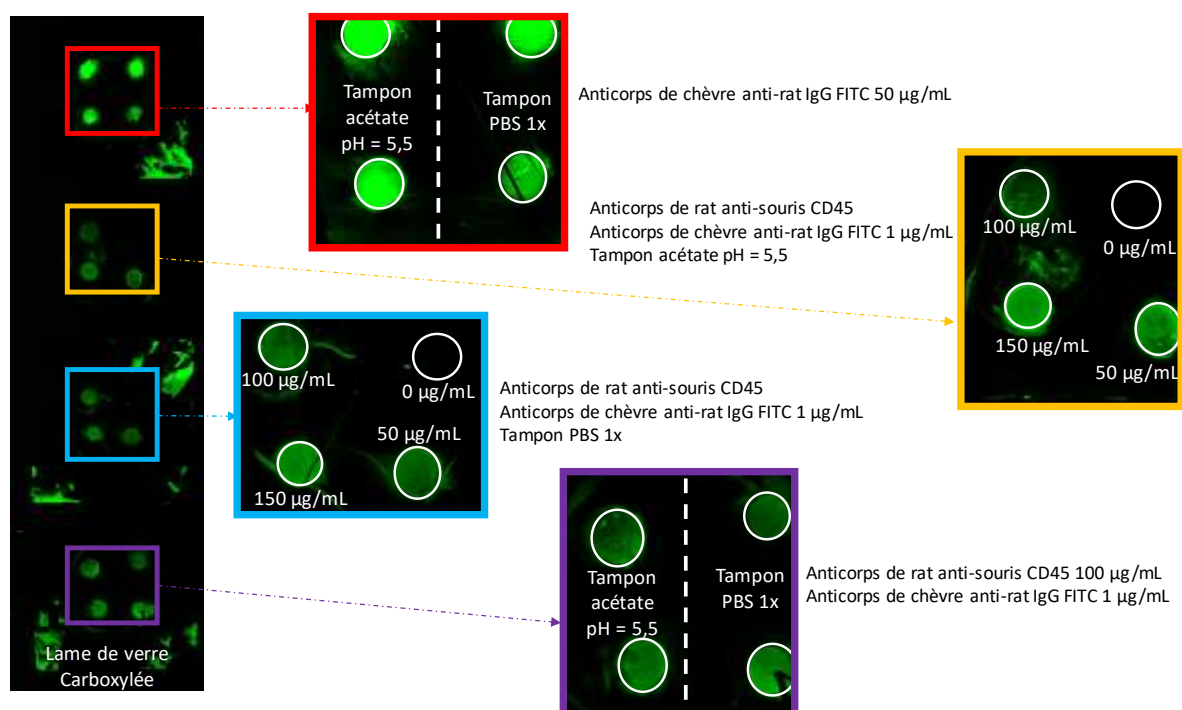


Figure IV- 24 : Test sur lame de verre carboxylée de la société PolyAn pour vérifier le protocole de greffage et la solution tampon (pH de greffage) - Cadre rouge : témoin positif pour le greffage des anticorps secondaires FITC de chèvre anti-rat IgG dans deux solutions tampon PBS 1x ou acétate de sodium (10 mM, pH = 5,5) – Cadres jaune et bleu : greffage des anticorps de rat anti-souris CD45 à différentes concentrations (0, 50, 100 et 150 µg/mL) mis en solution dans la solution tampon acétate de sodium (10 mM, pH = 5,5) (cadre jaune) ou PBS 1x (cadre bleu) - Cadre violet : Vérification du greffage de l'anticorps de rat anti-souris CD45 mis en solution à 100 µg/mL dans le tampon acétate ou le PBS 1x

Le cadre jaune est pour sa part associé au greffage des anticorps primaires (de rat anti-souris/humain CD45R/B220) mis en solution en tampon acétate de sodium (10 mM), pH égal à 5,5. Le *spot* de référence, celui correspondant à la concentration 0 µg/mL montre que l'anticorps secondaire n'a pas interagi. Il apparait nettement que la concentration 150 µg/mL mène à une haute et homogène densité de greffage, ce qui est traduit par une intensité lumineuse de moyenne relative égale à 19600 UA. Les résultats obtenus avec la concentration 50 µg/mL sont légèrement inférieurs, ce qui est confirmé par une intensité moyenne relative de 15300 UA. La concentration 100 µg/mL fournit quant à elle la densité de greffage la plus faible et dont la valeur de l'intensité moyenne relative est de 8300 UA.

Le cadre bleu est associé au greffage des anticorps primaires mis en solution à différentes concentrations en tampon PBS 1x. Cette fois encore, l'action de la BSA a permis d'éviter un greffage non spécifique de l'anticorps secondaire. En termes de greffage, la concentration 150 µg/mL mène à une haute densité de greffage, ce qui est traduit par une intensité

lumineuse dont la moyenne relative est égale à 16600 UA. Les concentrations 100 $\mu\text{g/mL}$ et 50 $\mu\text{g/mL}$ conduisent quant à elles à des densités de greffage plus faibles et dont les valeurs d'intensité moyenne relative sont respectivement 11100 UA et 10900 UA.

Pour finir, le cadre violet est associé au greffage des anticorps primaires mis en solution à une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ en solution tampon acétate de sodium et en solution tampon PBS 1x. Comme observé dans les trois précédents cadres, la BSA a permis d'éviter le greffage non spécifique des anticorps secondaires. Il apparaît également que les greffages aussi bien en tampon acétate de sodium que PBS 1x sont très proches. Dans le cas d'une mise en solution en tampon acétate de sodium, l'intensité moyenne relative des deux *spots* est de 10700 UA tandis que la moyenne pour une solution de PBS 1x est de 11700 UA.

Ces résultats confirment à nouveau que le protocole de fonctionnalisation est fiable et reproductible. En effet, les anticorps, que ce soit les anticorps primaires ou secondaires se greffent sur la surface activée. De plus, la BSA a permis d'empêcher l'interaction non spécifique des anticorps secondaires conduisant à l'obtention de zones fonctionnalisées propres et nettes. L'influence du pH et donc de la solution tampon dans laquelle les anticorps sont mis en solution semble relativement faible bien que la solution tampon acétate de sodium conduise globalement à une meilleure densité de greffage. Ce dernier point a été confirmé par les valeurs d'intensité moyenne prises sur chaque *spot*. Pour finir, il apparaît que la concentration joue faiblement sur l'intensité des *spots* et donc sur le greffage des anticorps. Nous en concluons que travailler à une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ permet de limiter la consommation en anticorps sans pour autant dégrader les performances de greffage.

Avant de conclure définitivement sur cette partie, il est important de préciser qu'une dernière expérience a été réalisée et ce, afin de complètement valider notre protocole. Pour ce faire, nous avons caractérisé le greffage des anticorps sur une surface comprenant des groupements carboxyles non activés. Contrairement à la caractérisation du greffage sur une surface comprenant des fonctions époxydes, cette expérience constitue un témoin négatif du greffage des anticorps.

Pour réaliser cette expérience, la surface a subi le même protocole de fonctionnalisation que la surface présentant des fonctions époxydes (c'est-à-dire ne faisant pas intervenir l'étape d'activation de surface). Les résultats sont présentés en Figure IV- 25. Il apparaît que, quelle que soit la condition considérée, les anticorps ne se sont pas ou très peu greffés sur la surface. Ces observations confirment que l'étape d'activation est indispensable pour un greffage des protéines et valide notre protocole de fonctionnalisation de surface.

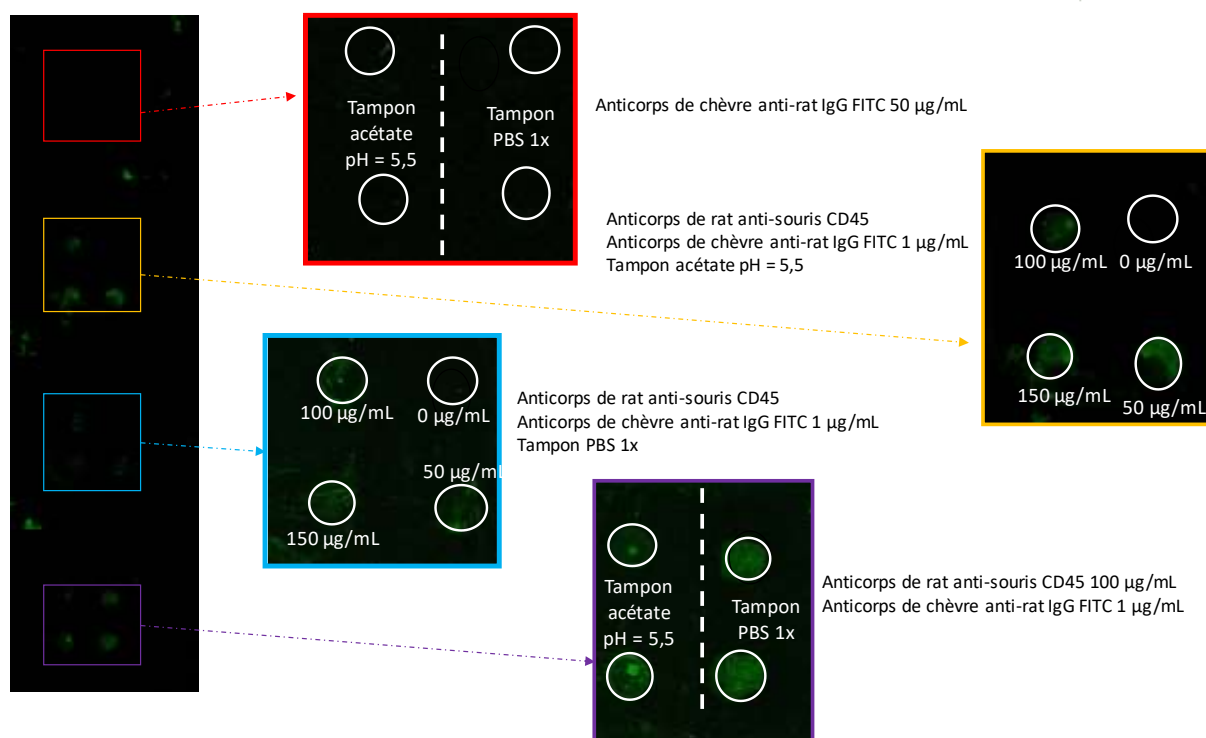
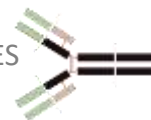


Figure IV- 25 : Test sur lame de verre carboxylée de la société PolyAn non activée - Cadre rouge : témoin positif pour le greffage des anticorps secondaires FITC de chèvre anti-rat IgG dans deux solutions tampon PBS 1x ou acétate de sodium (10 mM, pH = 5,5) – Cadres jaune et bleu : greffage des anticorps de rat anti-souris CD45 à différentes concentrations (0, 50, 100 et 150 µg/mL) mis en solution dans la solution tampon acétate de sodium (10 mM, pH = 5,5) (cadre jaune) ou PBS 1x (cadre bleu) - Cadre violet : Vérification du greffage de l'anticorps de rat anti-souris CD45 mis en solution à 100 µg/mL dans le tampon acétate ou le PBS 1x

Cette expérience a donc permis de valider visuellement, avec les instruments disponibles au LAAS-CNRS, le greffage de l'anticorps primaire et sa reconnaissance par l'anticorps secondaire, ce dernier étant lié à un fluorochrome.

IV.4.2.2 Bilan

Ces dernières expériences ont permis non seulement de valider le greffage des anticorps en fluorescence mais ont également permis de fixer définitivement le protocole de fonctionnalisation final.

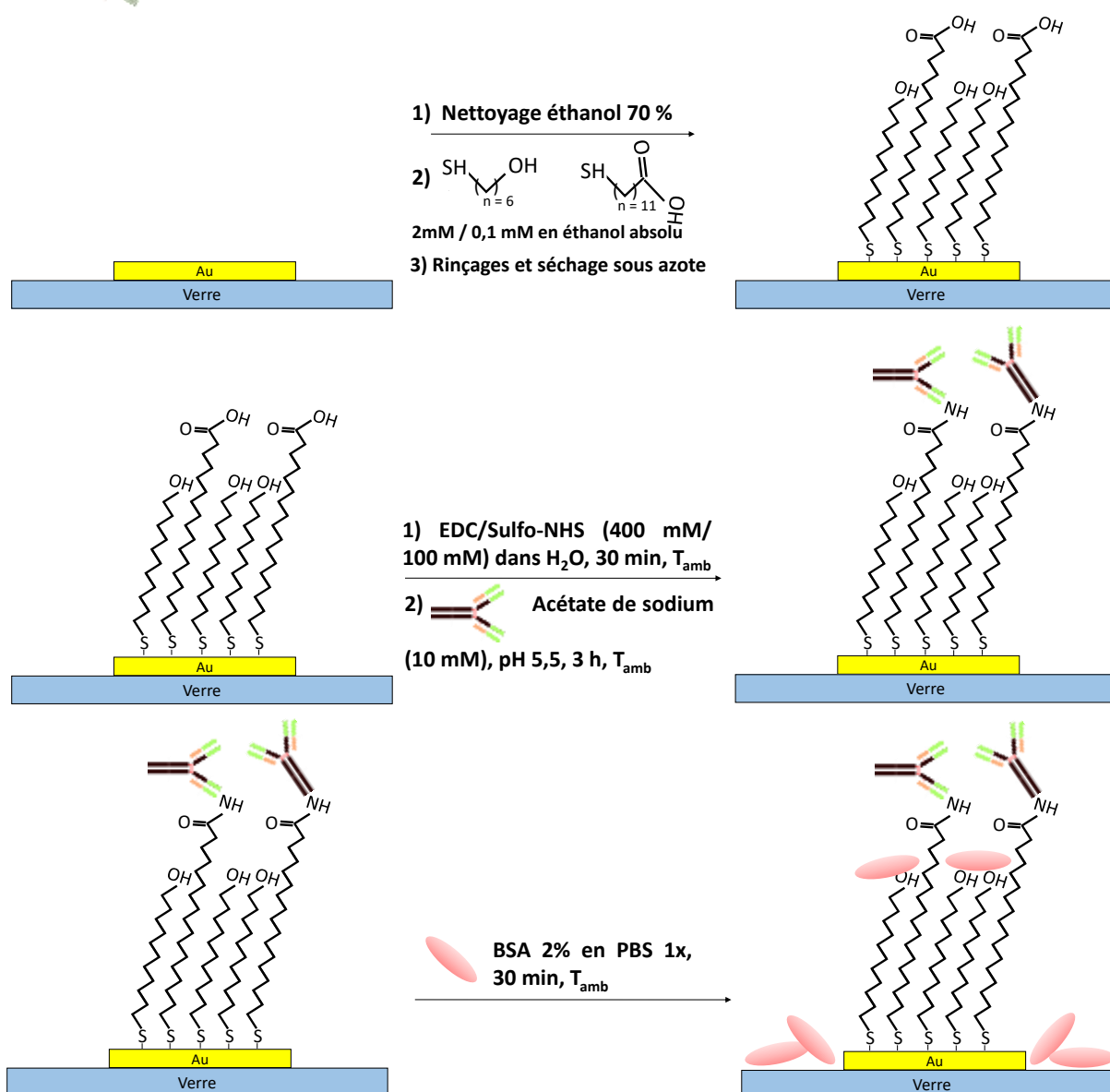


Figure IV- 26 : Schéma du protocole de fonctionnalisation de surface final visant au greffage des anticorps anti-CD45 pour permettre le *rolling* des leucocytes et l'isolement total des cellules souches adipeuses¹²⁵

Ce protocole comprend une première étape de formation d'une monocouche auto-assemblée, une SAM, sur une surface d'or nettoyée au préalable sous ultrasons dans un bain d'éthanol. Cette SAM est issue de la réaction entre l'or et les thiols 6-mercaptohexanol (6-MCH) et acide 11-mercaptoundécanoïque (11-MUA) mis en solution dans l'éthanol absolu et dont les concentrations sont respectivement 0,1 mM et 2 mM (ratio 1:20). Une fois la SAM formée (après 18 h à l'abri des UV et à T_{amb}) et rincée (bain d'éthanol 70 % et ultrasons), elle est activée. L'activation se fait dans un bain contenant les molécules EDC (400 mM dans l'eau DI) et Sulfo-NHS (100 mM dans l'eau DI) pendant une durée de 30 minutes à T_{amb} . La surface est juste séchée avant d'être fonctionnalisée par les anticorps. Ces derniers, mis en solution à une concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampon acétate de sodium (10 mM) à pH égal à 5,5, se



greffent sur une durée de 3 h à T_{amb} . Pour finir, la surface est bloquée par greffage de BSA mise en solution en tampon PBS 1x à une concentration de 20 mg/mL. Cette dernière est laissée pendant 30 minutes à T_{amb} . La surface est finalement rincée au PBS 1x. Telle que préparée, la surface est prête pour accueillir des cellules (en particulier des leucocytes) voire même les faire rouler.

Les étapes du protocole de fonctionnalisation de surface en bain sont rassemblées dans le schéma Figure IV- 26.

IV.5 Ouverture vers le *cell rolling*

Les expériences menées précédemment ont permis de converger vers un protocole de fonctionnalisation reproductible et fiable. L'objectif final étant de faire rouler les cellules hématopoïétiques (en particulier les globules blancs) sur une surface fonctionnalisée, nous avons cherché à vérifier s'il est effectivement possible de faire rouler des leucocytes sur une telle surface. Pour ce faire, nous nous sommes aidés de la SPRi pour visualiser en temps réel les interactions entre biomolécules et à terme, le *cell rolling*.

IV.5.1 *Cell rolling* en SPRi

De nombreux paramètres influent sur la capacité d'une cellule à rouler sur une surface. Parmi ces paramètres, nous avons choisi d'étudier l'influence, sur le comportement des cellules, de la densité de ligands disponibles sur la surface fonctionnalisée. Pour ce faire, nous avons étudié, par SPRi, le comportement de cellules sur une surface comportant différentes densités d'anticorps.

Ainsi, pour éviter que la surface ne soit saturée en anticorps, la solution doit contenir un mélange d'anticorps et d'albumine (BSA) qui sont incubés simultanément. En effet, les deux protéines entrent en compétition pour se greffer sur la surface : l'albumine peut prendre la place des anticorps sur des sites actifs. Afin de moduler la densité d'anticorps greffés, nous avons testé différentes conditions mettant en jeu différents ratios en protéines : 100 % d'anticorps ; un ratio 1:1 en anticorps / albumine ; un ratio 1:4 en anticorps / albumine et un ratio 1:19 en anticorps / albumine. Pour réaliser les solutions, nous avons fixé la concentration en anticorps à 100 $\mu\text{g/mL}$, soit une concentration molaire de $6,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol/mL}$ et avons adapté la concentration en albumine pour respecter les ratios fixés.

Une fois les anticorps greffés en matrice de gouttes, la surface est placée dans l'instrumentation SPRi qui est amorcée par injection d'un tampon de course, le PBS 1x, pH 7,4 dans ce cas. L'expérience se poursuit par deux injections successives d'une solution de RSA à 200 $\mu\text{g/mL}$ à un débit de 50 $\mu\text{L/min}$ pendant 5 minutes. Cela permet de recouvrir

complètement la surface en protéines et éviter qu'à posteriori les cellules ne se greffent de manière non spécifique à la surface. La Figure IV- 27- a correspond à l'image en temps réel de l'injection de la protéine : les *spots* sont presque tous visibles. La Figure IV- 27- b correspond à l'image différentielle : les zones où la RSA se greffe sont blanches et les zones où elle ne se greffe pas (saturés par les anticorps/albumine), restent noires. Cette image montre que le greffage des anticorps / albumine a été efficace dans tous les *spots* : la RSA se greffe très peu dans les *spots* alors qu'elle sature la surface. Cette image montre également quelques coulures où les anticorps se sont peut-être greffés et qui seront à même d'accueillir des cellules par la suite. La Figure IV- 27- c rappelle quant à elle les positions des différents *spots* selon la condition qu'ils représentent.

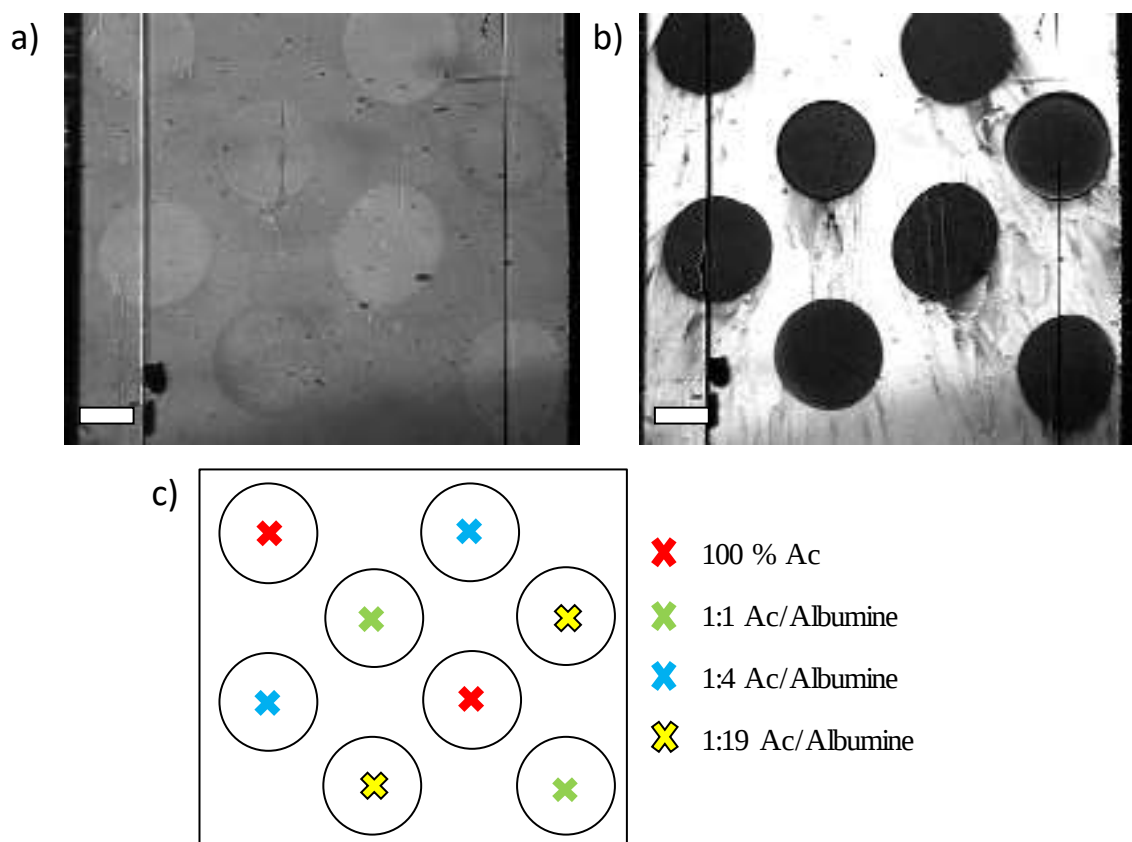
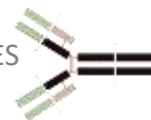


Figure IV- 27 : Résultats de l'analyse par SPRi au cours de l'injection de RSA (concentrée à 2 mg/mL en tampon acétate de sodium (10 mM) à pH égal à 4,5) à un débit de 10 μ L/min – a) Image réelle lors du greffage de la RSA – b) Image différentielle – c) Rappel de la localisation des différentes conditions. Les barres d'échelle sont de 1 mm

Une fois la surface saturée en RSA, des lymphocytes T, leucocytes compatibles avec les anticorps de rat anti-souris/humain CD45R/B220, ont été injectés. La concentration en lymphocytes T a été fixée arbitrairement à 100 000 cellules/mL en solution PBS 1x et le débit d'injection des cellules a été fixé à 10 μ L/min sur une durée de 10 minutes. A un tel débit, les



cellules parviennent à interagir avec la surface, comme l'illustre la Figure IV- 28- a : chaque zone blanche correspond à une interaction entre la surface et des biomolécules. Nous faisons l'hypothèse que chaque point blanc correspond à une cellule. Il apparaît ainsi que les cellules ne se sont pas greffées sur la surface : cette dernière a donc été parfaitement saturée par la RSA. De plus il est visible que les cellules se sont massivement greffées sur un *spot* : celui correspondant à la solution contenant 100 % d'anticorps (rappel de l'emplacement des *spots* en Figure IV- 28- b). Les lymphocytes T parviennent également à se greffer sur les autres *spots* mais en moindre quantité.

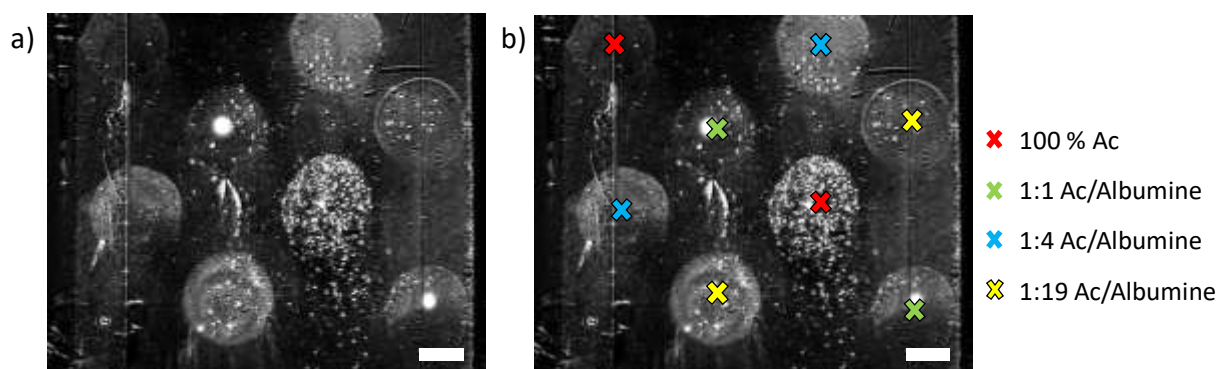


Figure IV- 28 : Résultats de l'analyse par SPRi après injection des lymphocytes T mis en solution en PBS 1x à une concentration de 100 000 cellules/mL – a) Image différentielle – b) Mise en évidence des 4 groupes de gouttes déposées sur le substrat

Suite au greffage des cellules et afin d'initier le mouvement de *cell rolling*, une solution de PBS 1x a été injectée à différents débits allant de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ à 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$. Entre 10 et 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, aucun mouvement de cellule n'a été observé. Ce n'est que lors du passage de 50 à 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ que de nombreux mouvements ont été constatés. Du fait du changement brutal de débit, de nombreuses cellules se sont décrochées de la surface. Ce changement brutal de débit a également permis d'initier un mouvement s'apparentant au *rolling* chez certaines cellules. Ce mouvement a ensuite été accentué par l'augmentation du débit à 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ entraînant l'accélération du déplacement de ces mêmes cellules. Le mouvement s'apparentant au *rolling* a été observé aussi bien dans le *spot* le plus encombré (100 % d'anticorps) que sur le reste de la surface (*spots* moins encombrés et coulures). Toutefois, la distance parcourue par les cellules sur le *spot* le plus encombré est d'au maximum 20 μm : les cellules se détachent sans s'être beaucoup déplacées. Cette distance est bien inférieure à celle parcourue par une cellule roulant sur des zones où l'anticorps est moins représenté. En effet, cette distance peut atteindre jusqu'à 160 μm avant que la cellule ne se décroche.

De plus, il semble que les cellules se décrochant du *spot* encombré dégradent la surface au moment de leur départ, ce qui est illustré en Figure IV- 29. Les deux cellules mises en avant en Figure IV- 29- a laissent une marque après leur départ, illustré en Figure IV- 29- b. Il semble

peu probable que les cellules se soient dégradées et qu'une partie soit restée sur la surface. Cette trace peut être due à une dégradation de la surface fonctionnalisée due à un arrachement des anticorps.

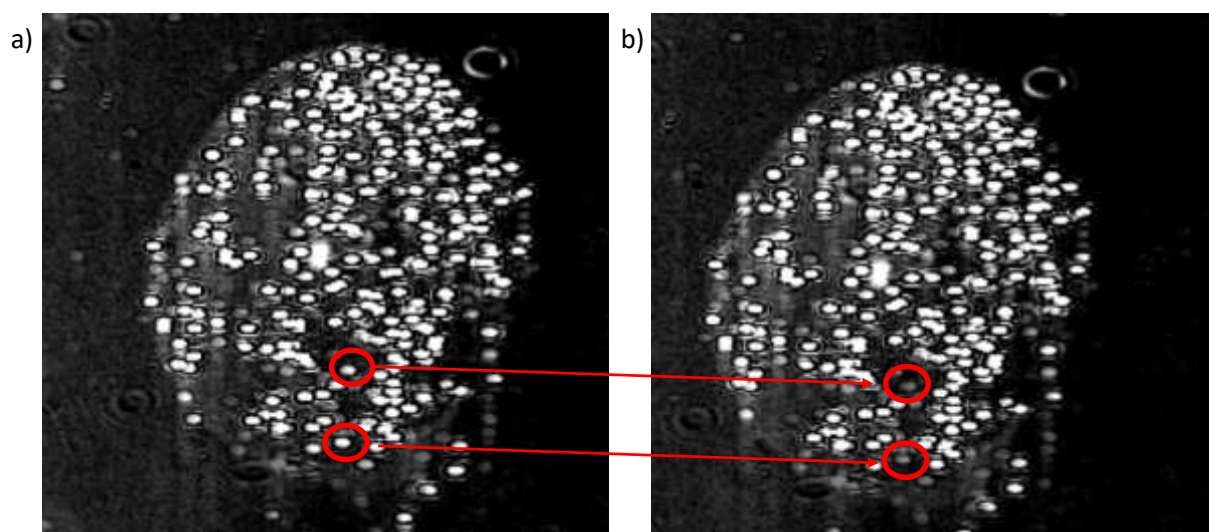


Figure IV- 29 : Zoom sur le *spot* le plus encombré (par des lymphocytes T) correspondant à la condition « 100 % d'anticorps » au cours d'une injection de PBS 1x à un débit de 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ – a) Image de référence – b) Image prise 1 minute et 30 secondes après l'image de référence : les interactions entre les cellules entourées et la surface ne sont plus les mêmes. Les cellules qui se sont décrochées de la surface semblent avoir laissé une trace et impacté la surface

Pour finir, le débit a été augmenté jusqu'à 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$ pour mettre en mouvement les cellules restées accrochées. Malgré un tel débit, de nombreuses cellules sont restées statiques et ne se sont pas décrochées montrant la force de l'interaction entre l'anticorps et l'antigène.

IV.5.2 Bilan

Cette expérience confirme le fait que des lymphocytes peuvent effectivement rouler sur une surface fonctionnalisée avec des anticorps anti-CD45. Cette expérience montre également l'importance de la densité de greffage des anticorps sur le comportement des cellules. Une densité de greffage en anticorps trop importante conduit à un faible déplacement des cellules qui semblent en plus dégrader la surface. Au contraire, une densité plus faible, due à un greffage compétitif entre anticorps et protéine bloquante (une albumine) conduit à un mouvement de cellules sur une plus longue distance et sans impact pour la surface. Toutefois, cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. Il est nécessaire de renouveler ce test pour définir les concentrations ainsi que les débits les plus adaptés à notre application.

Pour finir, d'autres expériences devront être menées sur d'autres types cellulaires et sur des surfaces de référence. Il faudra ainsi étudier le comportement d'autres leucocytes ainsi que des cellules ne présentant pas le marqueur CD45, comme par exemple les ASCs, sur une



surface fonctionnalisée avec des anticorps anti-CD45. Il faudra également caractériser le comportement de tous ces types sur une surface de référence, c'est-à-dire faisant intervenir la P-sélectine, protéine sur laquelle la preuve de concept a déjà été réalisée.

IV.6 Conclusion et perspectives

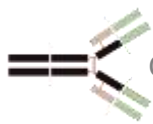
Ce chapitre fait état des développements réalisés pour obtenir un dispositif permettant l'isolement complet des cellules souches adipeuses et ce, par exclusion immunologique des cellules hématopoïétiques. Pour réaliser cette exclusion, nous nous sommes inspirés d'un phénomène biologique ayant lieu dans les vaisseaux sanguins : le *cell rolling*. Nous avons également pris en compte le fait que les ASCs ne possèdent pas d'antigène spécifique. Ainsi, au lieu de cibler les ASCs nous avons choisi de cibler les leucocytes : l'isolement a été une fois de plus réalisé par déplétion des cellules ne présentant pas d'intérêt pour notre étude.

De nombreuses étapes sont nécessaires pour parvenir à l'obtention d'un dispositif permettant de copier le phénomène de *cell rolling* : fonctionnalisation de surface, caractérisation, fabrication, etc. Les travaux présentés dans ce chapitre ont porté sur le développement d'un protocole de fonctionnalisation faisant intervenir les anticorps anti-CD45, anticorps spécifiques des leucocytes. Pour ce faire, deux études ont été parallèlement menées : l'une permettant d'optimiser les paramètres *via* analyse par résonance de plasmons de surface et l'autre *via* caractérisation en fluorescence.

De la première étude ont été déduits certains paramètres de greffage. Ainsi, pour une fonctionnalisation par immersion des dispositifs (fonctionnalisation en bains), le pH de la solution dans laquelle les anticorps sont mis en solution, la concentration en anticorps, le ratio en thiols ainsi que l'étape d'activation ont été optimisés afin d'obtenir la meilleure densité d'anticorps sur la surface. En parallèle, *via* la deuxième étude, les modifications apportées au protocole ont pu être validées par une analyse en fluorescence. Ces deux études ont ainsi mené à l'obtention d'un protocole de fonctionnalisation permettant un greffage optimal des anticorps anti-CD45.

Bien que le *cell rolling* n'ait pu être réalisé dans nos dispositifs, nous avons pu vérifier la faisabilité de ce phénomène, sur une surface de référence. Un mouvement s'apparentant à du *cell rolling* a ainsi été constaté, ce qui est prometteur pour la suite du développement du dispositif.

Pour finir, toutes ces expériences ont été menées dans le but de greffer un maximum d'anticorps sur la surface. Or, il est apparu que la densité de ligand joue un rôle sur la capacité des cellules à rouler sur une surface fonctionnalisée. Ce paramètre n'est pas le seul à impacter le *cell rolling* : densité des récepteurs présents sur la surface des cellules, constantes



d'association et de dissociation, forces hydrodynamiques appliquées, etc., ont eux aussi une forte influence. L'obtention d'un dispositif permettant d'exclure par voie immunologique les cellules hématopoïétiques nécessite encore l'optimisation de nombreux paramètres.

Conclusion générale

Les cellules souches adipeuses possèdent un fort potentiel pour des applications en médecine régénératrice puisqu'elles sont multipotentes, facilement accessibles, présentes en grande quantité dans le tissu adipeux et que leur prélèvement engendre peu d'inconfort chez le patient. De plus, elles semblent être impliquées dans des mécanismes biologiques complexes, comme le diabète, et pourraient constituer un biomarqueur de certains désordres métaboliques. Ces cellules ouvrent ainsi de nombreuses et nouvelles perspectives pour le diagnostic voire le pronostic de certaines maladies qui font actuellement des ravages, comme le diabète qui deviendra la 7ème cause de décès en 2030 selon l'OMS.

Toutefois, bien que l'hypothèse de l'implication des ASCs dans ces mécanismes complexes ait été établie, les mécanismes de migration de ces cellules depuis le tissu adipeux vers d'autres tissus sont encore loin d'être compris. Il a certes été démontré que les cellules étaient capables de migrer depuis le tissu adipeux vers le système lymphatique mais rien ne permet de dire comment elles atteignent les autres tissus.

Cette étude s'est alors articulée autour d'une **hypothèse : la circulation des ASCs dans le sang**. Cette dernière a été fortement remise en question par diverses études. Certaines équipes scientifiques affirment que les ASCs se rencontrent effectivement dans le sang périphérique, d'autres le réfutent et les dernières modèrent leurs propos en confirmant leur présence en très faible proportion (cellules rares) dans le cas particulier où le corps est sujet à une maladie. Les méthodes ou outils de tri cellulaire jusqu'à présents utilisés ne semblent donc pas assez performants ou pas adaptés pour conclure quant à la présence des ASCs dans le sang. Intervient alors la microfluidique, science se situant à la croisée de la biologie, de la physique, de la chimie et de l'ingénierie. Cette science permet de pallier les limitations rencontrées avec les méthodes classiques de tri cellulaire et pourrait, à terme, permettre de percer les secrets de la migration des ASCs.

Ces travaux s'inscrivent dans ce contexte. L'objectif de cette étude était de **développer un dispositif microfluidique capable de déterminer si les ASCs circulent effectivement dans le sang. Ce dispositif devait être capable de collecter des cellules rares et ce, dans le but final de réaliser des diagnostics voire des pronostics du diabète de type 2.**

Pour ce faire, nous avons dû établir une stratégie d'isolement des ASCs. L'état de l'art réalisé dans le **Chapitre I** a montré qu'il existe un large choix de méthodes permettant l'isolement de cellules rares. Afin d'obtenir un dispositif facilement exploitable et le moins encombrant et contraignant possible, nous nous sommes focalisés sur les méthodes microfluidiques de tri passives et les méthodes de tri par voie immunologique. Malgré cette restriction, de nombreuses méthodes s'offraient encore à nous. De plus, elles nécessitaient de connaître les propriétés intrinsèques des cellules : taille, densité, déformabilité, protéines sur la membrane, etc., ce qui n'avait été que partiellement étudié jusqu'alors. Le manque de connaissances sur les propriétés physiques intrinsèques des ASCs et l'absence de marqueurs biologiques

spécifiques nous ont rapidement orientés vers une stratégie de tri comportant plusieurs critères de séparation.

Nous avons démontré que le diamètre des ASCs est compris entre **10 et 25 μm** . Les ASCs se confondent parfaitement, en termes de taille, aux leucocytes mais se distinguent nettement de la population cellulaire qui représente plus de 99 % des cellules du sang : les globules rouges.

La connaissance du diamètre des cellules a été décisive dans le choix de la stratégie d'isolement des ASCs. Cette dernière est basée sur une double déplétion :

- Étape 1 : Élimination des cellules de diamètre inférieur à 10 μm (globules rouges, plaquettes et quelques leucocytes).
- Étape 2 : Élimination des cellules hématopoïétiques par exclusion immunologique.

La première étape, dont le principe est détaillé au **Chapitre II**, est basée sur la filtration hydrodynamique. L'objectif de ce module est le prétraitement des échantillons biologiques et leur purification par élimination des globules rouges, des plaquettes et de quelques globules blancs de diamètre inférieur à 10 μm . Pour ce faire, nous avons fabriqué un dispositif microfluidique selon un procédé de laminage successif de couches de films secs photosensibles. Afin de nous affranchir de certaines contraintes de design, nous avons optimisé ce procédé de fabrication et l'avons adapté à notre application.

La filtration, dont les résultats sont présentés dans le **Chapitre III**, a tout d'abord été testée sur des échantillons synthétiques, c'est-à-dire mettant en jeu des billes fluorescentes en polystyrène de diamètre calibré. Ces premières caractérisations ont permis d'optimiser le dispositif et d'en valider le principe de fonctionnement. Les expériences ont ensuite porté sur des échantillons biologiques. Dès lors, taux de filtration des cellules de diamètre inférieur à 10 μm , taux de récupération des cellules de diamètre supérieur à 10 μm et viabilité cellulaire ont été étudiés. Les expériences menées sur une première version de dispositif (comportant 30 canaux latéraux) ont permis de montrer la capacité du module à filtrer les cellules de diamètre 10 μm et à récupérer 100 % des cellules d'intérêt. Les taux de filtration des cellules de diamètres inférieur à 10 μm étant alors trop variables et surtout très insuffisants (entre 24 et un peu plus de 60 %) ont conduit à l'optimisation du dispositif qui a vu son nombre de canalisations latérales augmenter de 30 à 100. Il s'est alors avéré que le dispositif est capable de filtrer plus de 99,9 % des cellules de diamètre inférieur à 10 μm à partir d'un sang humain ou murin aussi bien dilué que complet. L'échantillon alors obtenu est presque totalement purifié des globules rouges, plaquettes et est parfaitement exploitable pour la suite de l'étude. **Nous avons ainsi validé le premier module de filtration.**

La suite de l'étude, présentée dans le **Chapitre IV**, détaille la méthode choisie pour le deuxième module et décrit les résultats associés. Ce deuxième et dernier module a pour objectif d'exclure par voie immunologique les cellules hématopoïétiques qui se mêlent aux ASCs une fois la filtration effectuée dans le premier module. Pour concevoir ce dispositif, nous avons pris en compte le fait que les ASCs ne possèdent pas d'antigène spécifique et avons choisi de cibler les leucocytes *via* les anticorps anti-CD45. De plus, nous nous sommes inspirés d'un phénomène biologique ayant lieu dans les vaisseaux sanguins : le *cell rolling*. Afin de parvenir à l'obtention d'un module capable de copier ce phénomène biologique naturel, de nombreuses étapes sont nécessaires et parmi elles se trouvent l'étape de fonctionnalisation de surface. Les résultats présentés dans ce chapitre font état des expériences menées afin d'optimiser le protocole de fonctionnalisation de surface. Ainsi, deux études ont été parallèlement menées : l'une permettant d'optimiser les paramètres *via* l'analyse par résonance de plasmons de surface et l'autre *via* la caractérisation en fluorescence. Ces deux études ont conduit à l'obtention d'un protocole menant au greffage d'une haute densité d'anticorps. Pour finir, bien que le *cell rolling* n'ait pu être réalisé dans nos dispositifs, nous avons pu vérifier la faisabilité de ce phénomène avec nos anticorps, sur une surface de référence. Un mouvement s'apparentant à du *cell rolling* a été constaté, laissant présager la faisabilité du *cell rolling* avec nos anticorps.

En résumé, ce travail a mené au développement d'un premier module de filtration viable, robuste, reproductible, capable de prétraiter un échantillon de sang complet et de le purifier de plus de 99,9 % des cellules de diamètre inférieur à 10 μm . Ce travail a également mené à l'optimisation du protocole de fonctionnalisation de surface qui doit, à terme, permettre de parfaire l'isolement des ASCs par exclusion des cellules hématopoïétiques restantes.

Par la suite, il sera nécessaire d'étudier la sensibilité du premier module en déterminant s'il existe une concentration en cellules d'intérêt limite, concentration en dessous de laquelle le dispositif est incapable de récupérer les cellules d'intérêt. De plus, il sera important d'approfondir l'étude menée sur la viabilité cellulaire. En effet, il est apparu que le premier module a une légère influence sur la prolifération cellulaire. D'autres études de l'impact de la filtration et plus tard de l'exclusion par voie immunologique sont indispensables.

Pour finir, le protocole de fonctionnalisation a été optimisé dans le but d'obtenir la densité de greffage la plus haute possible. Or, il est apparu que la densité de ligand joue un rôle sur la capacité des cellules à rouler sur une surface fonctionnalisée. Ce paramètre n'est pas le seul à impacter le *cell rolling* : densité des récepteurs présents sur la surface des cellules, constantes d'association et de dissociation, forces hydrodynamiques appliquées, etc., ont eux aussi une forte influence. L'obtention d'un dispositif capable d'exclure par voie immunologique les cellules hématopoïétiques nécessite donc l'optimisation de nombreux paramètres

Annexes

III-A/ Évolution du dispositif

Comme évoqué en **III.2.1**, de nombreuses améliorations ont été apportées au dispositif. Ces améliorations ont toutefois été apportées de façon progressive afin de pouvoir mesurer l'effet de chaque amélioration sur les performances du dispositif.

La Figure III- A- 1- 1 correspond à la toute première version du dispositif. Pour rappel, le design de cette dernière comporte un canal principal connecté à une entrée, dans laquelle est injecté l'échantillon et une sortie, dite principale, qui collecte les cellules de diamètre supérieur à 10 μm . Ce design comporte également 20 canaux latéraux connectés orthogonalement au canal principal et rattachés à une sortie, dite latérale, qui récolte les particules de diamètre inférieur à 10 μm .

Suite aux simulations réalisées sur COMSOL 5.2 (pour rappel, se référer à la partie **III.2.1**), nous avons développé plusieurs générations de puces. Nous avons dans un premier temps conservé la structure initiale du design et avons modifié l'angle d'inclinaison des canaux latéraux. Ce dispositif est indiqué en Figure III- A- 1- 2.

Par la suite, nous avons amélioré le design (Figure III- A- 1- 3) en conservant le même nombre de canaux latéraux mais en ajoutant deux ouvertures fluidiques : une sortie latérale et une entrée principale. En parallèle, nous avons développé un dispositif conservant la structure initiale mais dont le nombre de canaux latéraux a été augmenté à 30 (Figure III- A- 1- 4).

Toutes ces améliorations ont conduit au dispositif optimisé présenté en Figure III- A- 1- 5 et dont les caractéristiques ont été détaillées en partie **III.4.1**. L'ultime version, présentée en Figure III- A- 1- 6, est basée sur le même design que celui présenté en Figure III- A- 1- 5 à la différence qu'il comporte 100 canaux latéraux.

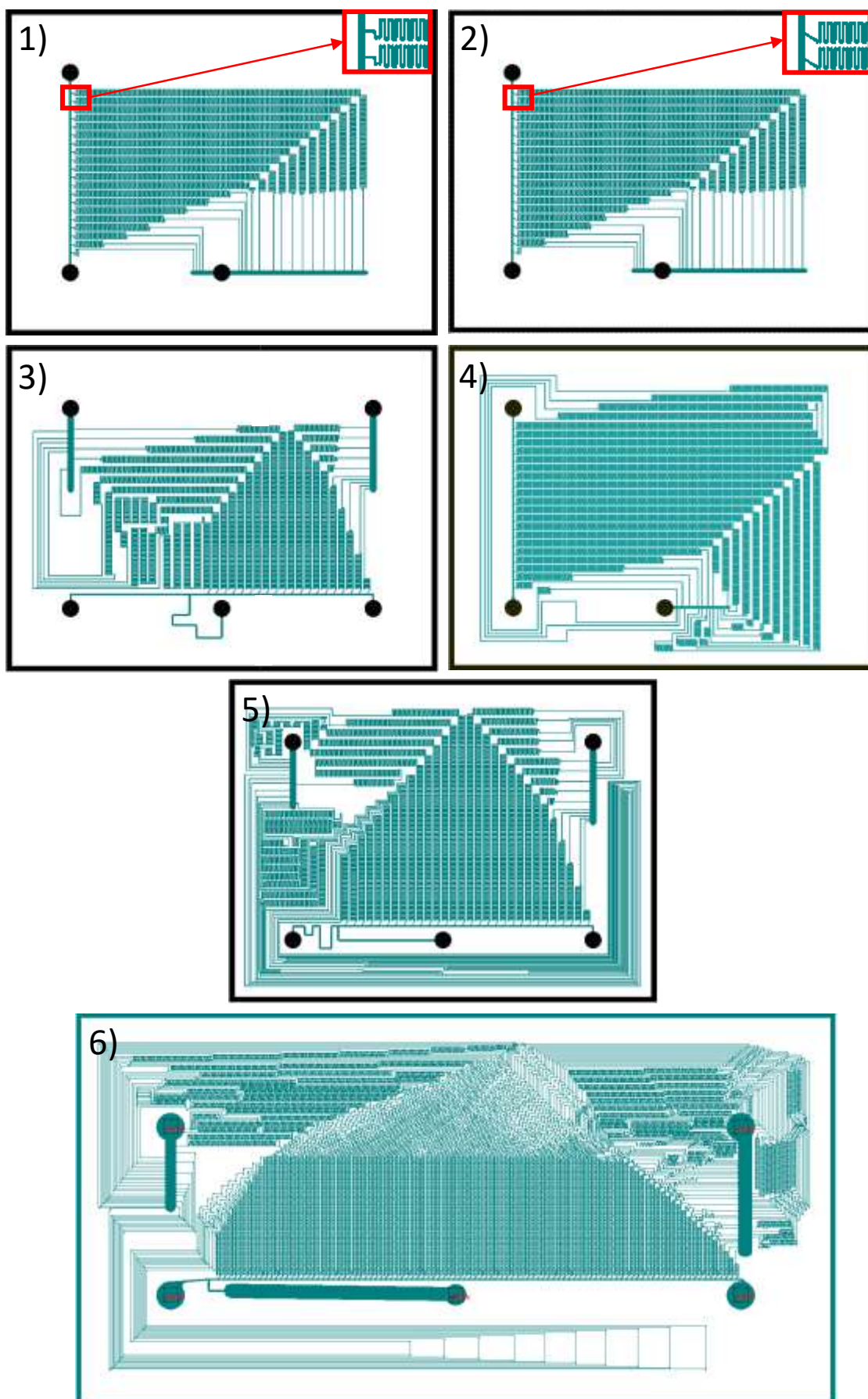


Figure III- A- 1 : Évolution du design du dispositif destiné à la filtration hydrodynamique

III-B/ Justification des hypothèses pour la *margination*

La vérification de l'hypothèse de *margination* a tout d'abord nécessité de délimiter les limites de notre système. Nous avons ainsi choisi d'étudier le comportement de particules isolées (devant représenter des globules rouges en très faible concentration dans nos dispositifs) soumises à un écoulement de type Poiseuille dans un canal microfluidique.

Pour ce faire, nous nous sommes inspirés des travaux de Losserand *et al.*⁸³ mais avons toutefois simplifié le modèle. En effet, nous avons commencé par déterminer les forces s'appliquant sur les particules. Nous avons alors seulement pris en compte la force de portance et la force de traînée. Nous avons en contrepartie négligé certains aspects comme notamment la déformabilité des globules rouges (ce qui a été pris en compte dans l'étude réalisée par Losserand *et al.*) ou encore les collisions entre particules que nous avons considérées comme négligeables pour notre étude.

Ainsi, les expressions des forces prises en compte pour cette étude sont :

Force de traînée

La force de traînée traduit la force de frottement qu'exerce le fluide sur la particule en écoulement. Cette force, qui s'oppose au mouvement de la particule, peut être exprimée selon l'expression découlant de la loi de Stokes⁵⁷ :

$$F_{drag} = 3\pi\mu Dv$$

Avec μ la viscosité dynamique du fluide, D le diamètre de la particule en écoulement et v la vitesse du fluide.

Force de portance

La force de portance traduit la force subie par un corps en mouvement dans un fluide qui s'exerce perpendiculairement à la direction du mouvement. Dans notre cas, nous prenons en compte la force due à la répulsion de la particule loin des parois.

Divers travaux ont porté sur la définition de l'expression de la force de portance pouvant s'appliquer sur une particule dans un écoulement (écoulement de type Poiseuille) dans un microcanal. Nous avons ainsi effectué un choix entre les différentes expressions présentées en suivant.

$$F_l = \frac{\mu^2 Y^2 R \kappa^{3/4}}{w_0^{7/4} \sqrt{d_0}} \quad \text{I. Cantat et C. Misbah 1999¹²⁶}$$

$$F_l = \alpha \mu v \frac{R_\alpha^4}{h_0^3} \quad \text{U. Seifert 1999¹²⁷}$$

$$F_l = 0,45 \pi \mu_{plasma} \dot{\gamma} \frac{R_0^4}{h^2} \quad \text{U. Seifert 2001⁸⁶}$$

$$F_l = \mu \dot{\gamma} \frac{R^3}{h} f(1 - v) \quad \text{M. Abkarian 2001¹²⁸}$$

Pour déterminer l'expression la plus adaptée à notre problématique, nous avons choisi de comparer les résultats de simulations de la trajectoire de particules dans un microcanal dont les dimensions correspondent à celles du canal principal dans le cas d'un dispositif comportant 30 canalisations latérales (pour rappel, se référer à la partie **III.2.2**) aux résultats obtenus par Losserand *et al.* Les premiers résultats alors obtenus ont indiqué que les expressions définies par I. Cantat et C. Misbah et par M. Abkarian ne sont pas adaptées. Nous nous sommes alors focalisés sur les deux expressions définies par U. Seifert (1999¹²⁷ et 2001⁸⁶).

Nous avons analysé les trajectoires d'une particule en faisant varier la force de portance appliquée et sa position initiale. Nous avons par la suite comparé les trajectoires obtenues à la trajectoire définie avec le modèle de référence. Les Figure III- B- 1, Figure III- B- 2 et Figure III- B- 3 rassemblent les résultats de ces simulations.

La Figure III- B- 1 rassemble les trajectoires d'une particule initialement positionnée très proche de la paroi du canal microfluidique : le centre de la particule est à une distance de moins de 10 μm de la paroi. Trois trajectoires différentes ont alors été définies et correspondent chacune à une force de portance différente. La première trajectoire (Figure III- B- 1- **A**) implique la première expression de force de portance définie par U. Seifert¹²⁷, la deuxième (Figure III- B- 1- **B**) implique la deuxième expression définie par U. Seifert⁸⁶ et la dernière (Figure III- B- 1- **C**) correspond à la moyenne des deux précédentes expressions. Afin de comparer ces trajectoires à la trajectoire de référence, un calcul d'erreur relative a été effectué (selon l'Équation (III-2)).

$$e(\%) = \frac{|y_{théorique} - y_{calcul}|}{y_{théorique}} * 100 \quad \text{(III-2)}$$

Il apparait ainsi que le modèle le plus fidèle au modèle théorique implique la force de portance moyenne (Figure III- B- 1- **C**). Toutefois, une analyse des erreurs relatives et plus

particulièrement des erreurs relatives sur la distance d'intérêt (400 μm , soit la distance entre deux canaux latéraux) met en avant le fait que la force la plus adaptée est la première force de portance.

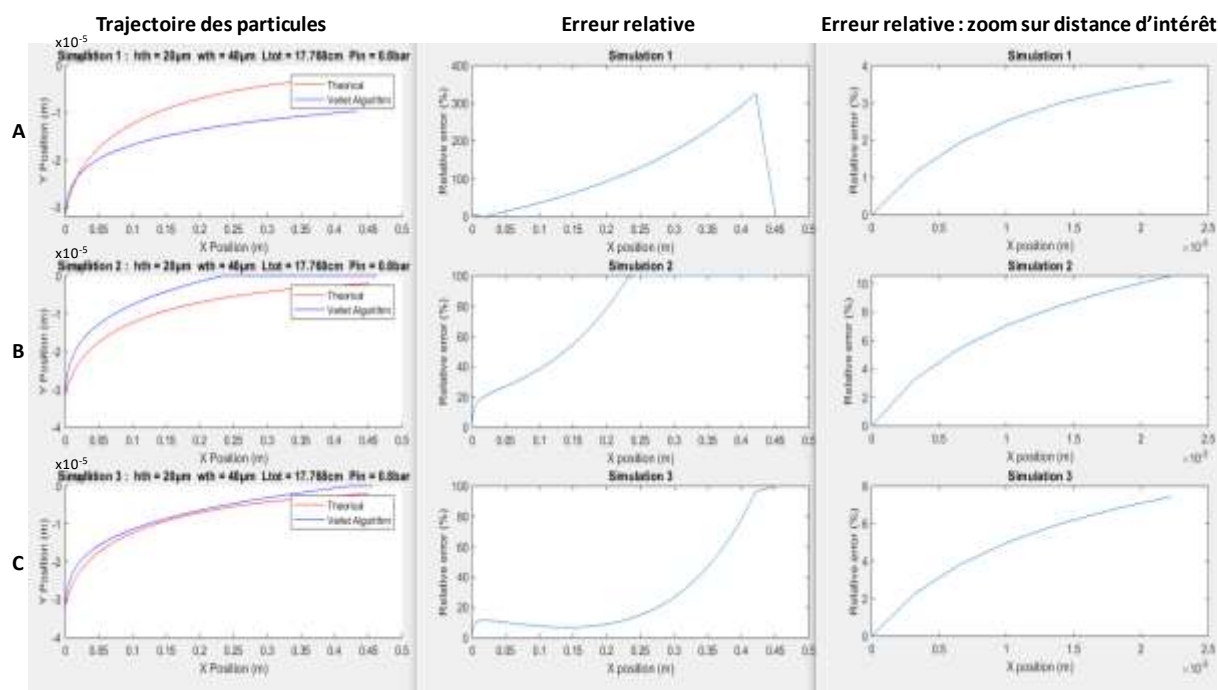


Figure III- B- 1 : Comparaison de la trajectoire d'une particule, initialement positionnée à une distance inférieure à 10 μm de la paroi du canal microfluidique, soumise à différentes forces de portance et détermination des erreurs relatives associées – **A** Comparaison entre la force de portance de référence et la force de portance définie par U. Seifert 1999¹²⁷ – **B** Comparaison entre la force de portance de référence et la force de portance définie par U. Seifert 2001⁸⁶ – **C** Comparaison entre la force de portance de référence et la force de portance correspondant à la moyenne des deux forces de portance de U. Seifert

En parallèle, nous avons étudié les trajectoires d'une particule initialement positionnée à une distance intermédiaire entre le centre du canal microfluidique et la paroi : le centre de la particule est à une distance d'environ 25 μm de la paroi. Les résultats sont rassemblés en Figure III- B- 2. De même que précédemment, l'influence des trois forces de portance a été étudiée et les résultats ont été comparés au modèle de référence. Dans ce cas, il apparaît à nouveau que la force de portance la plus adaptée est la force de portance moyenne, ce qui est corrélé par le calcul de l'erreur relative qui montre que les deux modèles fournissent des résultats quasiment identiques.

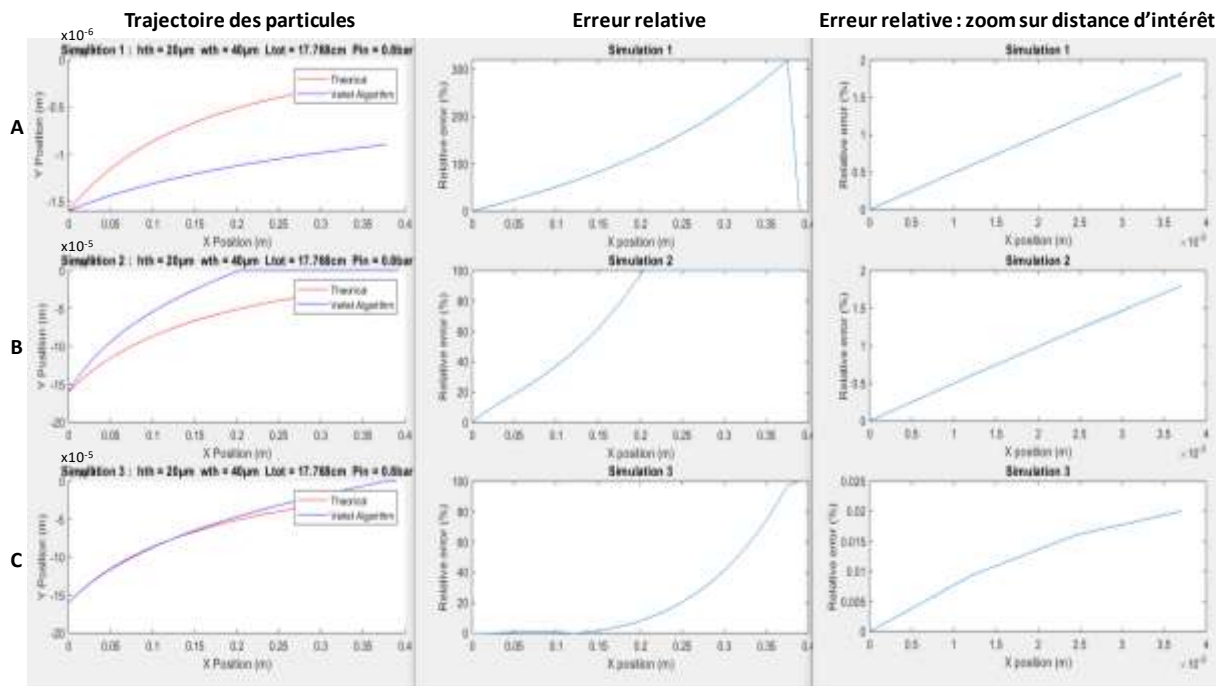


Figure III- B- 2 : Comparaison de la trajectoire d'une particule, initialement positionnée à une distance de près de 25 μm de la paroi du canal microfluidique, soumise à différentes forces de portance et détermination des erreurs relatives associées – **A** Comparaison entre la force de portance de référence et la force de portance définie par U. Seifert 1999¹²⁷ – **B** Comparaison entre la force de portance de référence et la force de portance définie par U. Seifert 2001⁸⁶ – **C** Comparaison entre la force de portance de référence et la force de portance correspondant à la moyenne des deux forces de portance de U. Seifert

Pour finir, nous avons cherché à étudier les trajectoires d'une particule initialement positionnée très proche du centre du canal microfluidique : le centre de la particule est à une distance de moins de 10 μm du centre du canal. Les résultats associés sont rassemblés en Figure III- B- 3. Dans ce cas également, il apparaît que la force de portance la plus adaptée est la force de portance moyenne, ce qui est corrélé par le calcul de l'erreur relative qui montre que les deux modèles fournissent des résultats quasiment identiques.

Bien que la force de portance moyenne semble être la plus adaptée à l'étude de la trajectoire des particules et ce, quelle que soit sa position initiale, nous avons choisi de travailler avec la première expression définie par U. Seifert (1999¹²⁷). Ce choix se justifie par le fait que nous souhaitons déterminer si les globules rouges s'éloignent suffisamment des parois pour ne pas être aspirés par les canaux latéraux. Ainsi, il semble plus cohérent de prendre en compte la force la plus adaptée dans le cas où la particule est la plus proche de la paroi du canal microfluidique. De plus, bien qu'elle paraisse moins adaptée dans les autres cas, l'erreur relative reste très faible.

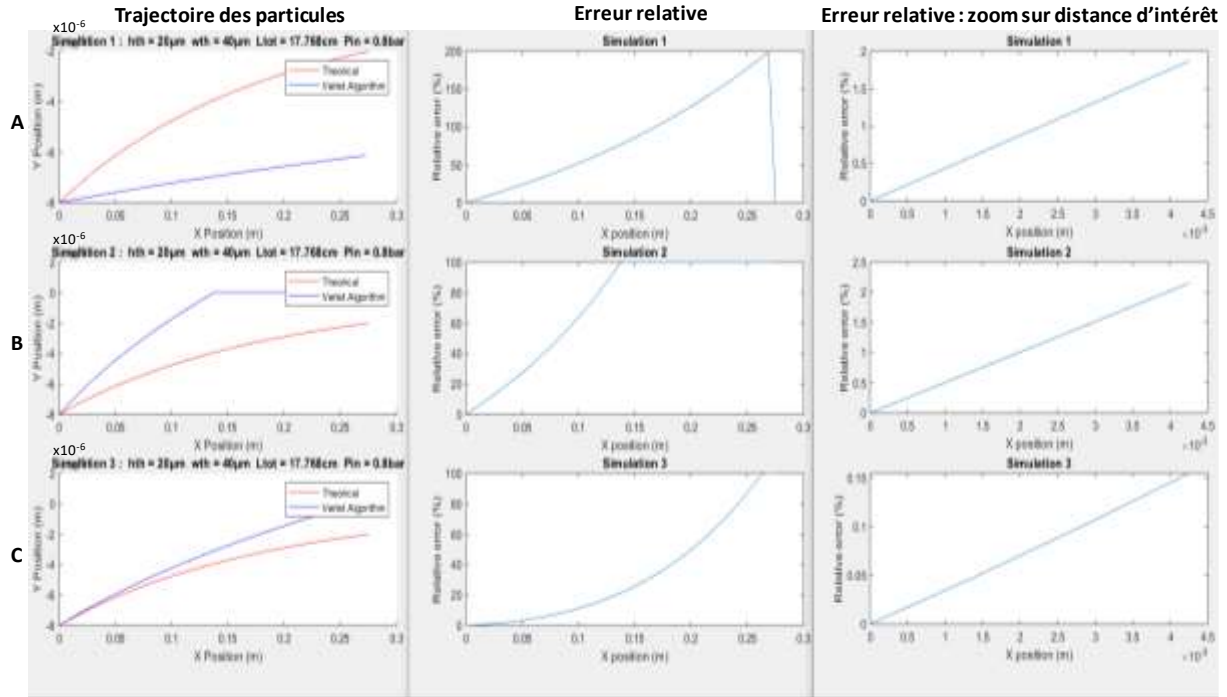


Figure III- B- 3 : Comparaison de la trajectoire d'une particule, initialement positionnée proche du centre du canal microfluidique, soumise à différentes forces de portance et détermination des erreurs relatives associées – **A** Comparaison entre la force de portance de référence et la force de portance définie par U. Seifert 1999¹²⁷ – **B** Comparaison entre la force de portance de référence et la force de portance définie par U. Seifert 2001⁸⁶ – **C** Comparaison entre la force de portance de référence et la force de portance correspondant à la moyenne des deux forces de portance de U. Seifert

Pour simuler l'écoulement de particules (devant simuler les globules rouges dans notre dispositif) dans un écoulement de type Poiseuille dans un canal microfluidique, nous avons donc choisi de travailler en appliquant aux particules les forces suivantes :

- Force de traînée : $F_{drag} = 3\pi\mu Dv$

- Force de portance : $F_l = \alpha\mu v \frac{Ra^4}{h_0^3}$

III-C/ Résultats FACS après filtration de sang de souris

Dans le cas de la filtration de l'échantillon murin, les résultats sont plus difficilement exploitables du fait d'une lyse des globules rouges survenue au cours de la préparation d'échantillon (avant analyse au FACS). Cette lyse intervient ainsi après la filtration (elle n'est donc pas due à la filtration) et se traduit par une répartition des globules rouges peut cohérente. En effet, le nuage de points violets, représentant la population des globules rouges, est très différent du nuage de points obtenu avec l'échantillon humain (pour rappel voir les Figure III- 26 et Figure III- 29) et traduit l'impact du protocole de préparation sur les cellules (fenêtres A en Figure III- C- 1- a, Figure III- C- 1- b, Figure III- C- 3- a et Figure III- C- 3- b). Ainsi, nous ne pourrions conclure sur la capacité de filtration des globules rouges. Toutefois, de la même façon qu'avec les échantillons humains, il nous est possible d'extraire certaines informations notamment sur la capacité du dispositif à enrichir l'échantillon d'intérêt en globules blancs.

Pour commencer, dans le cas d'une filtration dans un dispositif comportant 30 canaux latéraux, les globules rouges (ceux n'ayant pas lysé), marqués par l'anticorps anti-Ter119, sont présents aussi bien en sortie principale qu'en sortie latérale (fenêtres B en Figure III- C- 1- a et Figure III- C- 1- b). Les globules blancs, marqués par l'anticorps anti-CD45, sont quant à eux très faiblement représentés en sortie latérale (fenêtre D en Figure III- C- 1- a) et très fortement représentés en sortie principale (fenêtre D en Figure III- C- 1- b).

En effet, la lyse des globules rouges a permis de mettre en évidence l'enrichissement en globules blancs. La Figure III- C- 2 montre que près de 40 % des cellules constituant l'échantillon obtenu en sortie principale (échantillon d'intérêt) sont des globules blancs. Ainsi, ce dispositif, bien que ne permettant pas d'obtenir un échantillon exploitable (car trop riche en globules rouges), permet d'enrichir l'échantillon d'intérêt en globules blancs.

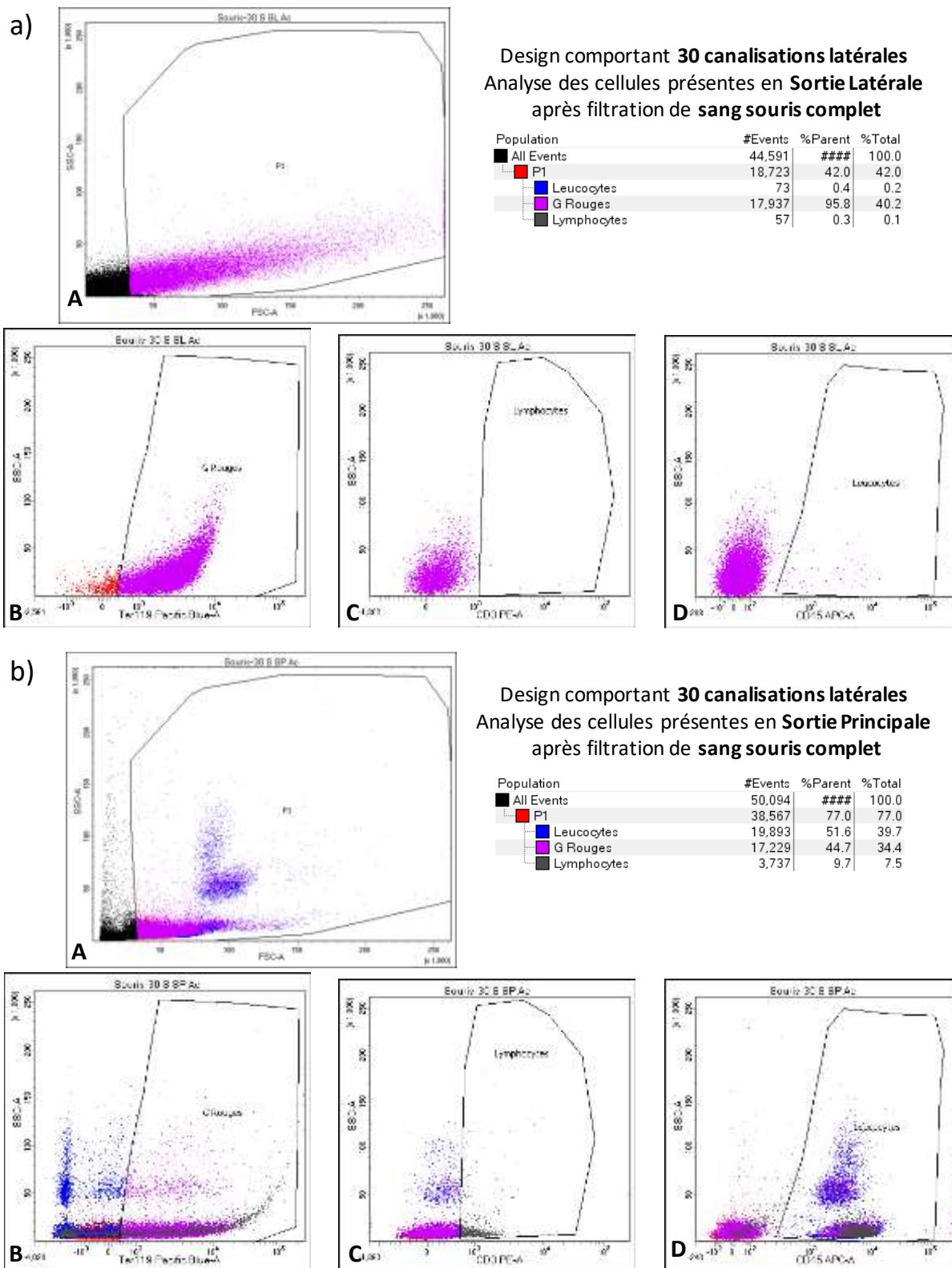


Figure III- C- 1 : Résultats du tri par FACS après filtration de sang murin complet (non dilué) dans les dispositifs comportant **30 canaux latéraux** – a) Cas de la sortie principale où toutes les cellules de diamètre supérieur à 10 μm doivent être récoltées – b) Cas des sorties latérales où toutes les cellules de diamètre inférieur à 10 μm doivent être filtrées, retirées (globules rouges, plaquettes et quelques lymphocytes)

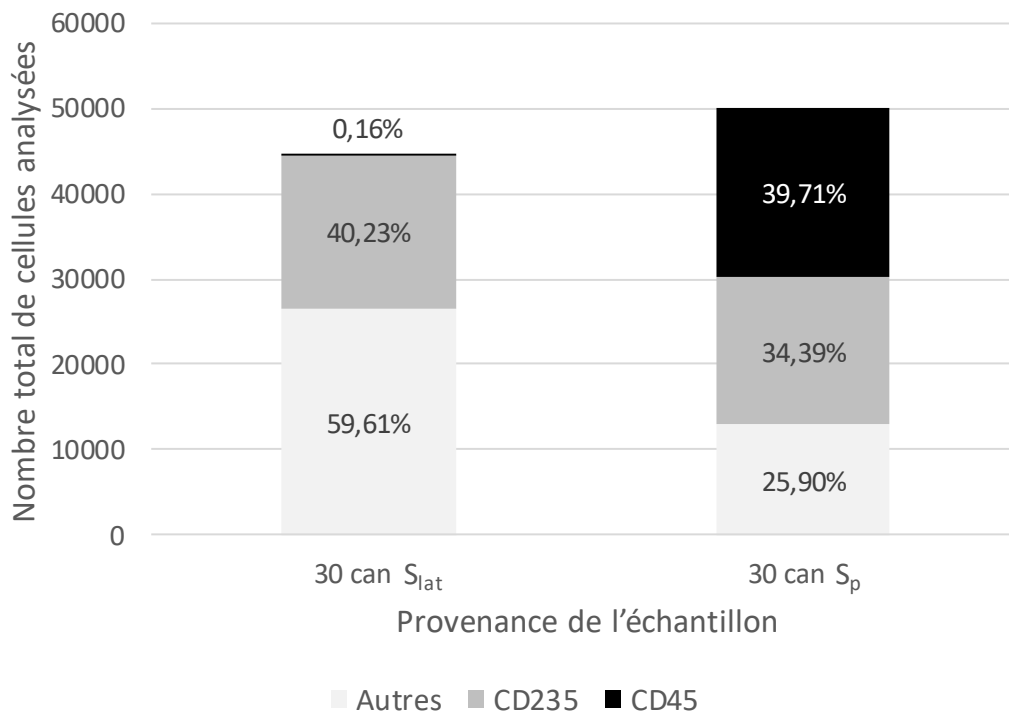


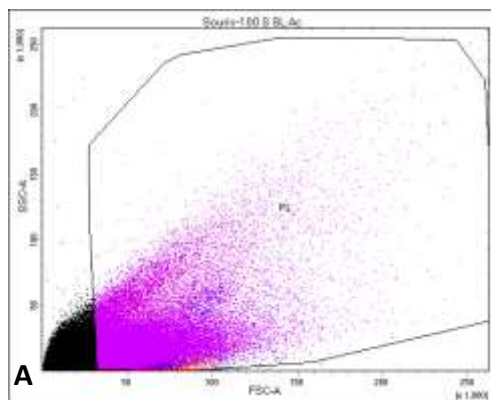
Figure III- C- 2 : Comparaison des échantillons récoltés en sortie principale (S_p) et en sortie latérale (S_{lat}) après filtration de sang de souris complet dans un dispositif comportant 30 canalisations latérales. Les pourcentages des différents types cellulaires sont fonction du marqueur cellulaire : CD235 = globules rouges, CD45 = globules blancs et « autres » = types cellulaires non marqués, débris, etc.

Les résultats de la filtration *via* un dispositif comprenant 100 canaux latéraux montrent quant à eux que les globules rouges, marqués par l'anticorps anti-Ter119, sont plus présents en sortie latérale qu'en sortie principale, ce qui est visible dans les fenêtres B en Figure III- C- 3- a et Figure III- C- 3- b.

En ce qui concerne les globules blancs, nous nous focaliserons sur la population obtenue en sortie principale (fenêtre D en Figure III- C- 3- b) puisque celle extraite par les sorties latérales mène à des résultats peu cohérents (fenêtre D en Figure III- C- 3- a). Ainsi, il apparaît que l'échantillon d'intérêt a été très fortement appauvri en globules rouges (dû en grande partie à la filtration mais également à la lyse cellulaire). Il apparaît également que les globules blancs (monocytes et granulocytes principalement), sont présents et enrichis, ce qui est confirmé par les résultats présentés en Figure III- C- 4.

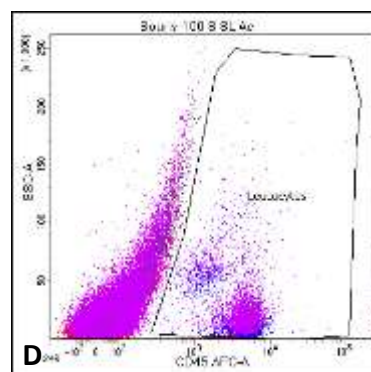
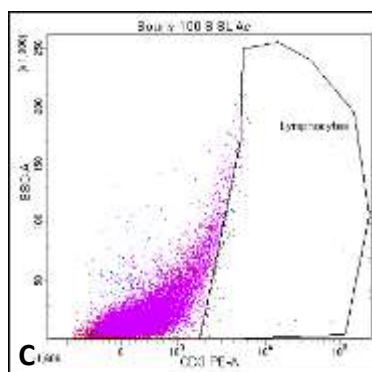
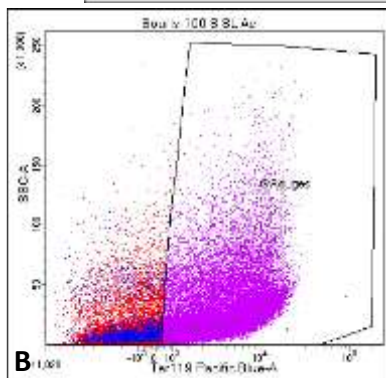
Ces derniers indiquent que l'échantillon est globalement constitué d'autant de globules blancs que de globules rouges. Ceci indique à nouveau un fort enrichissement permis par la filtration.

a)

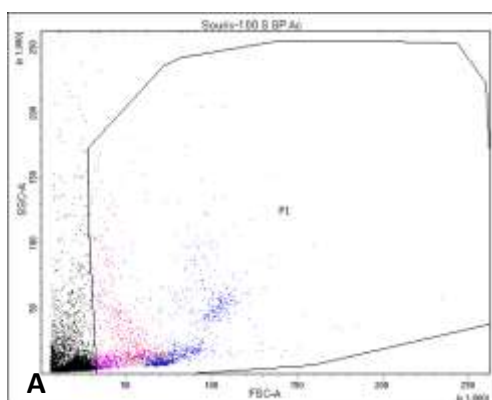


Design comportant **100 canalisations latérales**
Analyse des cellules présentes en **Sortie Latérale**
après filtration de **sang souris complet**

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	289,311	###	100.0
P1	86,195	29.8	29.8
Leucocytes	6,861	8.0	2.4
G Rouges	63,569	73.8	22.0
Lymphocytes	728	0.8	0.3



b)



Design comportant **100 canalisations latérales**
Analyse des cellules présentes en **Sortie Principale**
après filtration de **sang souris complet**

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	28,680	###	100.0
P1	2,056	7.2	7.2
Leucocytes	1,063	51.7	3.7
Lymphocytes-1	230	21.6	0.8
G Rouges	691	33.6	2.4
Lymphocytes	333	16.2	1.2

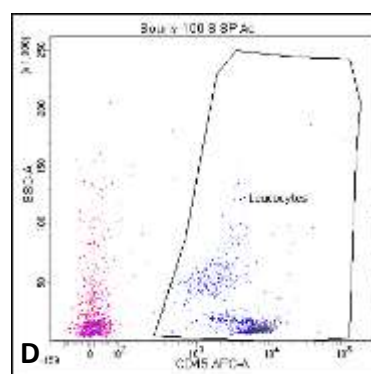
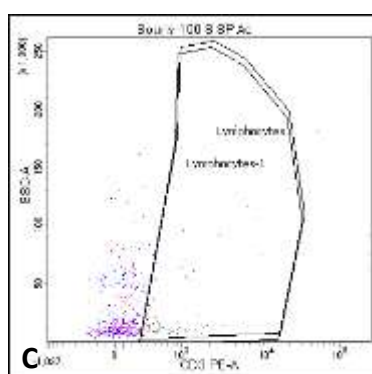
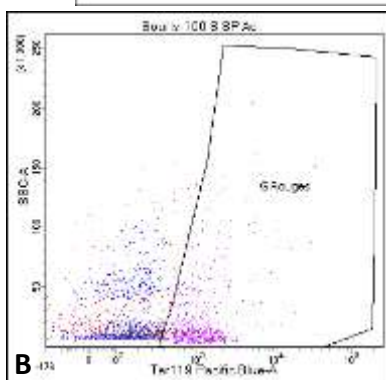


Figure III- C- 3 : Résultats du tri par FACS après filtration de sang murin complet (non dilué) dans les dispositifs comportant **100 canaux latéraux** – a) Cas de la sortie principale où toutes les cellules de diamètre supérieur à 10 µm doivent être récoltées – b) Cas des sorties latérales où toutes les cellules de diamètre inférieur à 10 µm doivent être filtrées, retirées (globules rouges, plaquettes et quelques lymphocytes)

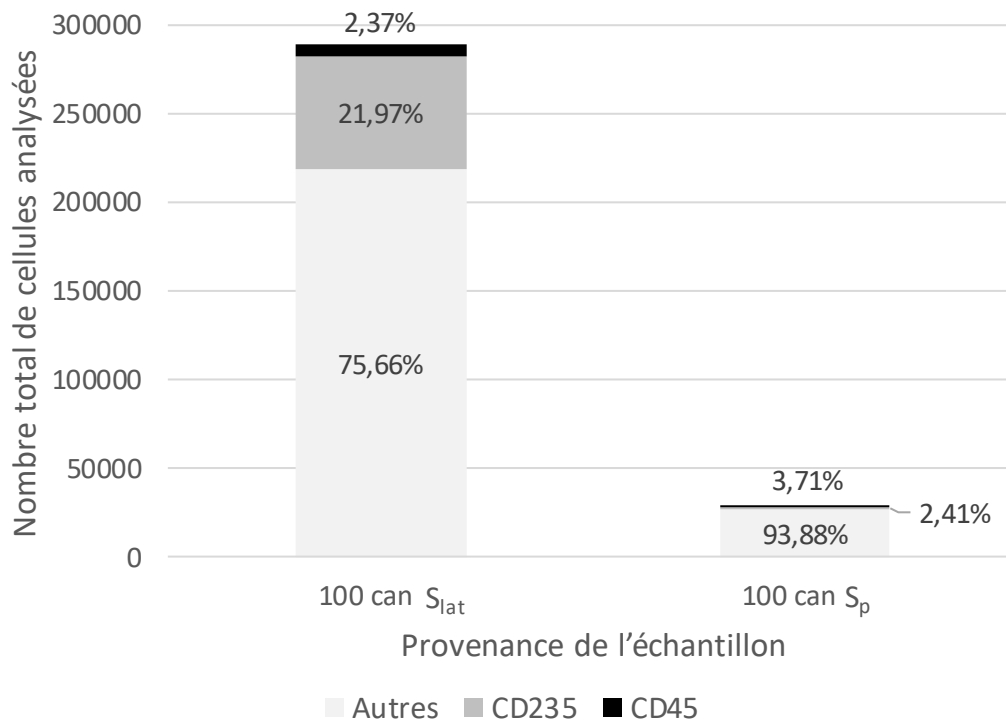
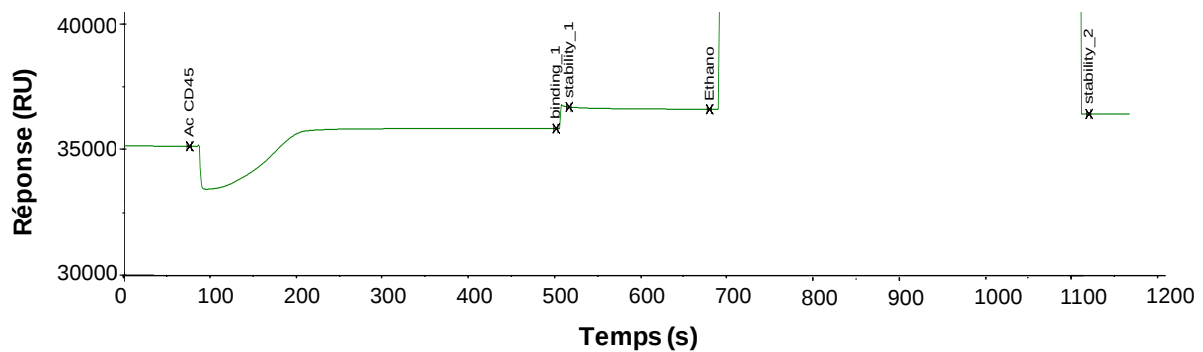
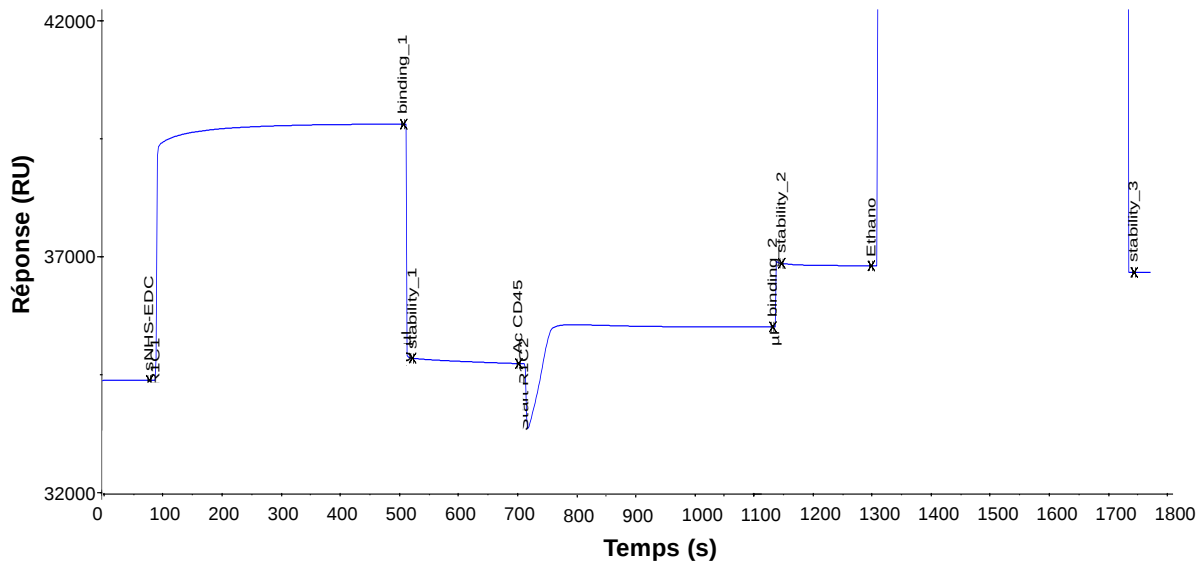


Figure III- C- 4 : Comparaison des échantillons récoltés en sortie principale (S_p) et en sortie latérale (S_{lat}) après filtration de sang de souris complet dans un dispositif comportant 100 canalisations latérales. Les pourcentages des différents types cellulaires sont fonction du marqueur cellulaire : CD235 = globules rouges, CD45 = globules blancs et « autres » = types cellulaires non marqués, débris, etc.

Ces résultats viennent ainsi en complément des analyses réalisées sur échantillon humain. Nous pouvons déduire de ces diverses expériences que les échantillons aussi bien humains que murins répondent, globalement, de façon similaire à la filtration. Les résultats alors obtenus montrent que les dispositifs comportant 100 canalisations latérales mènent à une filtration des globules rouges et à un enrichissement en globules blancs bien plus efficaces que ceux n'en comportant que 30.

IV/ Détermination du ratio en thiols adapté à un greffage en anticorps optimal – courbes annexes

Les courbes rassemblées dans cette annexe viennent en complément des analyses réalisées en partie IV.4.1.4.



Bibliographie



BIBLIOGRAPHIE

- 1 MJ Evans, Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos, <https://www.nature.com/articles/292154a0.pdf>, (accessed August 9, 2018).
- 2 G. R. Martin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1981, 78, 7634–7638.
- 3 J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones, *Science*, 1998, 282, 1145–1147.
- 4 K. Takahashi and S. Yamanaka, *Cell*, 2006, 126, 663–676.
- 5 K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka, *Cell*, 2007, 131, 861–872.
- 6 P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz and M. H. Hedrick, *Tissue Engineering*, 2001, 7, 211–228.
- 7 L. Luo and M. Liu, *J. Endocrinol.*, 2016, 231, R77–R99.
- 8 (PDF) Le tissu adipeux, https://www.researchgate.net/publication/299842733_Le_tissu_adipeux_couleur_localisation_fonctions_et_autres_donnees_nouvelles, (accessed January 21, 2019).
- 9 T. F. Hany, E. Gharehpapagh, E. M. Kamel, A. Buck, J. Himms-Hagen and G. K. von Schulthess, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2002, 29, 1393–1398.
- 10 W. D. van Marken Lichtenbelt, J. W. Vanhommerig, N. M. Smulders, J. M. A. F. L. Drossaerts, G. J. Kemerink, N. D. Bouvy, P. Schrauwen and G. J. J. Teule, *N. Engl. J. Med.*, 2009, 360, 1500–1508.
- 11 (PDF) Adipose Tissue Heterogeneity - Development and Application of Nonlinear Microscopy Methods, https://www.researchgate.net/publication/324476714_Adipose_Tissue_Heterogeneity_-_Development_and_Application_of_Nonlinear_Microscopy_Methods, (accessed February 11, 2019).
- 12 M. Démarchez, Biologie de la peau, <https://biologiedelapeau.fr/spip.php?article28>, (accessed February 5, 2019).
- 13 Netgen, Le tissu adipeux, <https://www.revmed.ch/RMS/2003/RMS-2424/22822>, (accessed February 6, 2019).
- 14 B. L. Wajchenberg, *Endocr Rev*, 2000, 21, 697–738.
- 15 J. Wu, P. Cohen and B. M. Spiegelman, *Genes Dev*, 2013, 27, 234–250.
- 16 M. Giralt and F. Villarroya, *Endocrinology*, 2013, 154, 2992–3000.
- 17 M. Gil-Ortega, L. Garidou, C. Barreau, M. Maumus, L. Breasson, G. Tavernier, C. F. García-Prieto, A. Bouloumié, L. Casteilla and C. Sengenès, *STEM CELLS*, 2013, 31, 1309–1320.
- 18 A. J. Becker, E. A. McCulloch and J. E. Till, *Nature*, 1963, 197, 452–454.
- 19 L. Bacakova, J. Zarubova, M. Travnickova, J. Musilkova, J. Pajorova, P. Slepicka, N. S. Kasalkova, V. Svorcik, Z. Kolska, H. Motarjemi and M. Molitor, *Biotechnology Advances*, 2018, 36, 1111–1126.



- 20 D.-C. Ding, H.-L. Chou, W.-T. Hung, H.-W. Liu and T.-Y. Chu, *Journal of Biomedical Science*, 2013, 20, 59.
- 21 L. E. Kokai, K. Marra and J. P. Rubin, *Translational Research*, 2014, 163, 399–408.
- 22 Rehman Jalees, Traktuev Dmitry, Li Jingling, Merfeld-Clauss Stephanie, Temm-Grove Constance J., Bovenkerk Jason E., Pell Carrie L., Johnstone Brian H., Considine Robert V. and March Keith L., *Circulation*, 2004, 109, 1292–1298.
- 23 A. C. Bowles, R. M. Wise and B. A. Bunnell, in *Mesenchymal Stem Cells and Immunomodulation*, eds. C. J. Malemud and E. Alsberg, Springer International Publishing, Cham, 2016, pp. 43–60.
- 24 T. Kotani, R. Masutani, T. Suzuka, K. Oda, S. Makino and M. Ii, *Sci Rep*, 2017, 7, 1–10.
- 25 B. Puissant, C. Barreau, P. Bourin, C. Clavel, J. Corre, C. Bousquet, C. Taureau, B. Cousin, M. Abbal, P. Laharrague, L. Penicaud, L. Casteilla and A. Blancher, *Br. J. Haematol.*, 2005, 129, 118–129.
- 26 Emerging Risk Factors Collaboration, N. Sarwar, P. Gao, S. R. K. Seshasai, R. Gobin, S. Kaptoge, E. Di Angelantonio, E. Ingelsson, D. A. Lawlor, E. Selvin, M. Stampfer, C. D. A. Stehouwer, S. Lewington, L. Pennells, A. Thompson, N. Sattar, I. R. White, K. K. Ray and J. Danesh, *Lancet*, 2010, 375, 2215–2222.
- 27 N. Liao, Y. Zheng, H. Xie, B. Zhao, Y. Zeng, X. Liu and J. Liu, *Stem Cell Research & Therapy*, DOI:10.1186/s13287-017-0743-7.
- 28 J. Szendroedi and M. Roden, *Curr. Opin. Lipidol.*, 2009, 20, 50–56.
- 29 A. Lettner and M. Roden, *Curr. Diab. Rep.*, 2008, 8, 185–191.
- 30 F. Guebre-Egziabher, P. M. Alix, L. Koppe, C. C. Pelletier, E. Kalbacher, D. Fouque and C. O. Soulage, *Biochimie*, 2013, 95, 1971–1979.
- 31 H. Loher, R. Kreis, C. Boesch and E. Christ, *Int J Mol Sci*, , DOI:10.3390/ijms17091554.
- 32 A. Girousse, M. Gil-Ortega, V. Bourlier, C. Bergeaud, Q. Sastourné-Arrey, C. Moro, C. Barreau, C. Guissard, J. Vion, E. Arnaud, J.-P. Pradère, N. Juin, L. Casteilla and C. Sengenès, *Cell Reports*, 2019, 27, 323-333.e5.
- 33 J. J. Alm, H. M. A. Koivu, T. J. Heino, T. A. Hentunen, S. Laitinen and H. T. Aro, *J. Orthop. Res.*, 2010, 28, 1634–1642.
- 34 C. A. Roufosse, N. C. Direkze, W. R. Otto and N. A. Wright, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, 36, 585–597.
- 35 C. Wan, Q. He and G. Li, *Journal of Orthopaedic Research*, 2006, 24, 610–618.
- 36 C. Schmidt-Lucke, F. Escher, S. Van Linthout, U. Köhl, K. Miteva, J. Ringe, T. Zobel, H.-P. Schultheiss and C. Tschöpe, Cardiac Migration of Endogenous Mesenchymal Stromal Cells in Patients with Inflammatory Cardiomyopathy, <https://www.hindawi.com/journals/mi/2015/308185/>, (accessed September 17, 2019).
- 37 M. Fernández, V. Simon, G. Herrera, C. Cao, Hd. Favero and J. Minguell, *Bone Marrow Transplant*, 1997, 20, 265–271.



- 38 N. J. Zvaifler, L. Marinova-Mutafchieva, G. Adams, C. J. Edwards, J. Moss, J. A. Burger and R. N. Maini, *Arthritis Res.*, 2000, 2, 477–488.
- 39 S. A. Wexler, C. Donaldson, P. Denning-Kendall, C. Rice, B. Bradley and J. M. Hows, *British Journal of Haematology*, 2003, 121, 368–374.
- 40 M. J. Hoogduijn, M. M. A. Verstegen, A. U. Engela, S. S. Korevaar, M. Roemeling-van Rhijn, A. Merino, M. Franquesa, J. de Jonge, J. N. Ijzermans, W. Weimar, M. G. H. Betjes, C. C. Baan and L. J. W. van der Laan, *Stem Cells Dev.*, 2014, 23, 2328–2335.
- 41 H. M. Lazarus, S. E. Haynesworth, S. L. Gerson and A. I. Caplan, *Journal of Hematotherapy*, 1997, 6, 447–455.
- 42 Y. Yang, D. Pang, C. Hu, Y. Lv, T. He, Y. An, Z. Tang and Z. Deng, *PLOS ONE*, 2015, 10, e0143368.
- 43 Q. He, C. Wan and G. Li, *STEM CELLS*, 2007, 25, 69–77.
- 44 Page 2, <https://francoisebonnete.monsite-orange.fr/themesderecherche/index.html>, (accessed July 29, 2019).
- 45 P. Engel, L. Boumsell, R. Balderas, A. Bensussan, V. Gattei, V. Horejsi, B.-Q. Jin, F. Malavasi, F. Mortari, R. Schwartz-Albiez, H. Stockinger, M. C. van Zelm, H. Zola and G. Clark, *The Journal of Immunology*, 2015, 195, 4555–4563.
- 46 R. Domenis, L. Lazzaro, S. Calabrese, D. Mangoni, A. Gallelli, E. Bourkoula, I. Manini, N. Bergamin, B. Toffoletto, C. A. Beltrami, A. P. Beltrami, D. Cesselli and P. Parodi, *Stem Cell Research & Therapy*, 2015, 6, 2.
- 47 P. Palumbo, F. Lombardi, G. Siragusa, M. G. Cifone, B. Cinque and M. Giuliani, *Int J Mol Sci*, DOI:10.3390/ijms19071897.
- 48 E. Raposio and N. Bertozzi, in *Current Protocols in Stem Cell Biology*, eds. M. Bhatia, A. G. Elefanty, S. J. Fisher, R. Patient, T. Schlaeger and E. Y. Snyder, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2017, pp. 1F.17.1–1F.17.12.
- 49 H. Cho, J. Kim, H. Song, K. Y. Sohn, M. Jeon and K.-H. Han, *The Analyst*, 2018, 143, 2936–2970.
- 50 H. Böhm, P. Anthony, M. R. Davey, L. G. Briarty, J. B. Power, K. C. Lowe, E. Benes and M. Gröschl, *Ultrasonics*, 2000, 38, 629–632.
- 51 J. Hultström, O. Manneberg, K. Dopf, H. M. Hertz, H. Brismar and M. Wiklund, *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2007, 33, 145–151.
- 52 D. R. Gossett, W. M. Weaver, A. J. Mach, S. C. Hur, H. T. K. Tse, W. Lee, H. Amini and D. Di Carlo, *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397, 3249–3267.
- 53 L. R. Huang, *Science*, 2004, 304, 987–990.
- 54 T. Kulrattanarak, R. G. M. van der Sman, C. G. P. H. Schroën and R. M. Boom, *Microfluidics and Nanofluidics*, 2011, 10, 843–853.
- 55 R. Vernekar, T. Krüger, K. Loutharback, K. Morton and D. W. Inglis, *Lab on a Chip*, 2017, 17, 3318–3330.



- 56 G.-Y. Kim, J.-I. Han and J.-K. Park, *BioChip J*, 2018, 12, 257–267.
- 57 J. Zhang, S. Yan, D. Yuan, G. Alici, N.-T. Nguyen, M. Ebrahimi Warkiani and W. Li, *Lab Chip*, 2016, 16, 10–34.
- 58 H. W. Hou, M. E. Warkiani, B. L. Khoo, Z. R. Li, R. A. Soo, D. S.-W. Tan, W.-T. Lim, J. Han, A. A. S. Bhagat and C. T. Lim, *Sci Rep*, 2013, 3, 1259.
- 59 C. Renier, E. Pao, J. Che, H. E. Liu, C. A. Lemaire, M. Matsumoto, M. Triboulet, S. Srivinas, S. S. Jeffrey, M. Rettig, R. P. Kulkarni, D. Di Carlo and E. Sollier-Christen, *NPJ Precis Oncol*, DOI:10.1038/s41698-017-0015-0.
- 60 S. Choi and J.-K. Park, *Lab on a Chip*, 2009, 9, 1962.
- 61 N. Norouzi, H. C. Bhakta and W. H. Grover, *PLoS One*, DOI:10.1371/journal.pone.0180520.
- 62 M. Yamada and M. Seki, *Lab on a Chip*, 2005, 5, 1233.
- 63 V. Murlidhar, M. Zeinali, S. Grabauskiene, M. Ghannad-Rezaie, M. S. Wicha, D. M. Simeone, N. Ramnath, R. M. Reddy and S. Nagrath, *Small*, 2014, 10, 4895–4904.
- 64 S. Bose, R. Singh, M. Hanewich-Hollatz, C. Shen, C.-H. Lee, D. M. Dorfman, J. M. Karp and R. Karnik, *Sci Rep*, DOI:10.1038/srep02329.
- 65 La microfluidique et les puces microfluidiques, <https://www.elveflow.com/fr/histoire-de-la-microfluidique-et-des-puces-microfluidiques/>, (accessed April 23, 2019).
- 66 P. Abgrall and A.-M. Gué, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2007, 17, R15–R49.
- 67 Y. Abbas, J. Miwa, R. Zengerle and F. von Stetten, *Micromachines*, 2013, 4, 80–89.
- 68 P. Abgrall, C. Lattes, V. Conédéra, X. Dollat, S. Colin and A. M. Gué, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2006, 16, 113–121.
- 69 P. Vulto, N. Glade, L. Altomare, J. Bablet, L. D. Tin, G. Medoro, I. Chartier, N. Manaresi, M. Tartagni and R. Guerrieri, *Lab on a Chip*, 2005, 5, 158.
- 70 R. Courson, S. Cargou, V. Conédéra, M. Fouet, M.-C. Blatché, C. L. Serpentine and A.-M. Gué, *RSC Advances*, 2014, 4, 54847–54853.
- 71 M. Fouet and P. Joseph, *Lab on a Chip*, 19.
- 72 R. Courson, in *Journées Nano, Micro et Optoélectronique (JNMO 2018)*, Agay (Var), France, 2018.
- 73 A. Accardo, R. Courson, R. Riesco, V. Raimbault and L. Malaquin, *Additive Manufacturing*, , DOI:10.1016/j.addma.2018.04.027.
- 74 M. Fouet, phd, Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2016.
- 75 M. Fouet, thèse, 234.
- 76 L. Lanotte, J. Mauer, S. Mendez, D. A. Fedosov, J.-M. Fromental, V. Claveria, F. Nicoud, G. Gompper and M. Abkarian, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113, 13289–13294.



- 77 R. Fåhræus and T. Lindqvist, *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 1931, 96, 562–568.
- 78 L. Dintenfuss, *Nature*, 1967, 215, 1099–1100.
- 79 T. M. Geislinger, B. Eggart, S. Braunmüller, L. Schmid and T. Franke, *Appl. Phys. Lett.*, 2012, 100, 183701.
- 80 Q. M. Qi and E. S. G. Shaqfeh, *Physical Review Fluids*, DOI:10.1103/PhysRevFluids.2.093102.
- 81 A. Jain and L. L. Munn, *PLoS ONE*, 2009, 4, e7104.
- 82 D. A. Fedosov, J. Fornleitner and G. Gompper, *Physical review letters*, 2012, 108, 028104.
- 83 S. Losserand, G. Coupier and T. Podgorski, *Microvascular Research*, 2019, 124, 30–36.
- 84 D. A. Fedosov and H. Noguchi, *BD Brownian dynamics*.
- 85 K. B. Abbitt and G. B. Nash, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2003, 285, H229–H240.
- 86 S. Sukumaran and U. Seifert, *Phys. Rev. E*, 2001, 64, 011916.
- 87 U. Windberger, A. Bartholovitsch, R. Plasenzotti, K. J. Korak and G. Heinze, *Experimental Physiology*, 2003, 88, 431–440.
- 88 S. S. Kuntaegowdanahalli, A. A. S. Bhagat, G. Kumar and I. Papautsky, *Lab Chip*, 2009, 9, 2973–2980.
- 89 R. D. Jäggi, R. Sandoz and C. S. Effenhauser, *Microfluid Nanofluid*, 2007, 3, 47–53.
- 90 Z. Liu, F. Huang, J. Du, W. Shu, H. Feng, X. Xu and Y. Chen, *Biomicrofluidics*, 2013, 7, 011801.
- 91 X. Chen, D. F. Cui, C. C. Liu and H. Li, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008, 130, 216–221.
- 92 C. Jaillet, 253.
- 93 K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky and S. Nourshargh, *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7, 678–689.
- 94 W. A. Muller, *Vet Pathol*, 2013, 50, 7–22.
- 95 J. Herter and A. Zarbock, *J. Immunol.*, 2013, 190, 4451–4457.
- 96 S. Nourshargh and R. Alon, *Immunity*, 2014, 41, 694–707.
- 97 S. Choi, J. M. Karp and R. Karnik, *Lab on a Chip*, 2012, 12, 1427.
- 98 D. A. Hammer and S. M. Apte, *Biophys J*, 1992, 63, 35–57.
- 99 N. T. Flynn, T. N. T. Tran, M. J. Cima and R. Langer, *Langmuir*, 2003, 19, 10909–10915.
- 100 G. Mani, D. M. Johnson, D. Marton, V. L. Dougherty, M. D. Feldman, D. Patel, A. A. Ayon and C. M. Agrawal, *Langmuir*, 2008, 24, 6774–6784.
- 101 A. Ulman, *Chem. Rev.*, 1996, 96, 1533–1554.



- 102 R. Colorado and T. R. Lee, in *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, Elsevier, 2001, pp. 9332–9344.
- 103 H. I. Kim and J. E. Houston, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 12045–12046.
- 104 K. B. Lipkowitz and T. R. Cundari, *Reviews in Computational Chemistry*, John Wiley & Sons, 2007.
- 105 Adhesion, Friction, and Mechanical Properties of Functionalized Alkanethiol Self-Assembled Monolayers | Accounts of Chemical Research, <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ar9801144>, (accessed July 26, 2019).
- 106 B. Park, M. Chandross, M. J. Stevens and G. S. Grest, *Langmuir*, 2003, 19, 9239–9245.
- 107 T. Wink, S. J. van Zuilen, A. Bult and W. P. van Bennekom, *Analyst*, 1997, 122, 43R–50R.
- 108 Enhanced Performance of an Affinity Biosensor Interface Based on Mixed Self-Assembled Monolayers of Thiols on Gold | *Langmuir*, <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la026908f>, (accessed July 26, 2019).
- 109 Preparation of Mixed Self-Assembled Monolayers (SAMs) That Resist Adsorption of Proteins Using the Reaction of Amines with a SAM That Presents Interchain Carboxylic Anhydride Groups | *Langmuir*, <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la991579l>, (accessed July 26, 2019).
- 110 Carbodiimide Crosslinker Chemistry - FR, <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html>, (accessed July 31, 2019).
- 111 M. B. Ali, F. Bessueille, J. M. Chovelon, A. Abdelghani, N. Jaffrezic-Renault, M. A. Maaref and C. Martelet, *Materials Science and Engineering: C*, 2008, 28, 628–632.
- 112 D. Hong, K. Bae, S.-P. Hong, J. H. Park, I. S. Choi and W. K. Cho, *Chem. Commun.*, 2014, 50, 11649–11652.
- 113 A. Montrose, phd, Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2013.
- 114 C. D. Bain, J. Evall and G. M. Whitesides, 10.
- 115 C. D. Bain and G. Whitesides, 2.
- 116 C. D. Bain and G. M. Whitesides, *Science*, 1988, 240, 62–63.
- 117 J. P. Folkers, P. E. Laibinis and G. M. Whitesides, *Journal of Adhesion Science and Technology*, 1992, 6, 1397–1410.
- 118 E. Dulkeith, A. C. Morteani, T. Niedereichholz, T. A. Klar, J. Feldmann, S. A. Levi, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, M. Möller and D. I. Gittins, *Physical Review Letters*, , DOI:10.1103/PhysRevLett.89.203002.
- 119 A. Abbas, M. J. Linman and Q. Cheng, *Biosens Bioelectron*, 2011, 26, 1815–1824.
- 120 A. Abbas, M. J. Linman and Q. Cheng, *Sens Actuators B Chem*, 2011, 156, 169–175.
- 121 R. B. M. Schasfoort and A. J. Tudos, *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, Royal Society of Chemistry, 2008.



BIBLIOGRAPHIE

- 122 F. Pillet, thesis, Toulouse, INSA, 2010.
- 123 Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins - ScienceDirect, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002197979190284F>, (accessed August 20, 2019).
- 124 F. Remy-Martin, thèse, 217.
- 125 M. Oliverio, S. Perotto, G. C. Messina, L. Lovato and F. De Angelis, *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9, 29394–29411.
- 126 I. Cantat and C. Misbah, *Phys. Rev. Lett.*, 1999, 83, 880–883.
- 127 U. Seifert, *Phys. Rev. Lett.*, 1999, 83, 876–879.
- 128 M. Abkarian, C. Lartigue and A. Viallat, *Phys. Rev. Lett.*, 2002, 88, 068103.