



HAL
open science

MISE AU POINT D'UN FORMAT DE PUCES A CELLULES POUR L'ANALYSE PHENOTYPIQUE A HAUT-CONTENU

Julien Reboud

► **To cite this version:**

Julien Reboud. MISE AU POINT D'UN FORMAT DE PUCES A CELLULES POUR L'ANALYSE PHENOTYPIQUE A HAUT-CONTENU. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00092909

HAL Id: tel-00092909

<https://theses.hal.science/tel-00092909>

Submitted on 12 Sep 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier – Grenoble 1
Ecole Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition, et l'Environnement

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Joseph Fourier – Grenoble 1
Spécialité : **Génie Biologique et Moléculaire**

Présentée et Soutenue publiquement le 05/05/2006

par **Julien REBOUD**

**Mise au point d'un format innovant de puces
à cellules pour l'analyse phénotypique
à haut-contenu**

Directeurs de thèse : Mme Béatrice SCHAACK et M. François BERGER

Composition du Jury :

Rapporteur :	Mme Marie-Claude POTIER
Rapporteur :	M. Xavier GIDROL
Examineur :	M. Yves FOUILLET
Examineur :	M. François CHATELAIN
Examineur :	M. François BERGER

Thèse préparée au sein des laboratoires :

Laboratoire Biopuces

Commissariat à l'Energie Atomique / Direction des Sciences du Vivant /
Département Réponse et Dynamique Cellulaire
(CEA/DSV/DRDC)

Et

Neurosciences précliniques

Unité INSERM U318

Remerciements

Tous les travaux effectués au cours de cette thèse n'auraient pas pu aboutir sans le concours souvent décisif de nombreuses personnes. Je tiens à les remercier tout particulièrement.

Tout d'abord je voudrais dire un grand Merci à mes deux encadrants, Béatrice SCHAACK du laboratoire Biopuces qui a mis beaucoup d'énergie, de temps et de chaleur à diriger ce travail, et François BERGER de l'unité INSERM 318, qui a été là pour les moments difficiles malgré son emploi du temps chargé et avec qui les discussions ont été toujours très enrichissantes. Merci pour vos encouragements, pour m'avoir guidé, remotivé et m'avoir fait confiance !

Ensuite, je suis énormément redevable à tous les membres de l'équipe Phénopuces, ceux de la première heure comme tous ceux qui sont venus grossir ses rangs pendant ces 4 années. Ce manuscrit s'appuie sur beaucoup de leurs efforts, et il est difficile de différencier les contributions de chacun à ce travail. En premier lieu, je tiens à remercier Stéphanie COMBE qui m'a accompagné depuis le début dans tous les instants de ce travail, et qui m'a permis de dépasser les moments de stress et de doute. Elle m'a beaucoup appris de la biologie et nos longues discussions ont fait émerger beaucoup des résultats présentés ici. Les autres membres de l'équipe, Violaine CHAPUIS, Frédéric LEMAIRE et Hervé POINTU nous ont permis de franchir le pas de l'application de la technologie.

Je suis aussi très reconnaissant aux autres membres du laboratoire Biopuces. Ces lignes sont trop courtes pour pouvoir leur exprimer à tous mes remerciements. Je me permets toutefois de souligner l'apport de Delphine FREIDA, tant du point du scientifique (les dispositifs TOC, c'est elle !) que du point de vue personnel. Être placé entre elle et Stéphanie pendant 3 ans a été un bonheur de « pratiquement » tous les instants. Les travaux dans son appartement m'ont apporté la dose d'efforts physiques pour évacuer les tensions des dispenses. Patricia LECLUYSE, secrétaire du laboratoire, a grandement facilité toutes les démarches et les organisations dans la bonne humeur (1/3, 1/3, 1/3). Enfin je tiens à remercier tout particulièrement François CHATELAIN, directeur du laboratoire, pour m'avoir fait confiance et s'être battu pour mon financement, mais aussi pour toutes les discussions tant scientifiques que « valorisation » sur la création d'entreprise, et enfin pour avoir accepté la responsabilité de présider le jury. Je remercie également l'INSTN pour m'avoir accordé une bourse. Je tiens à signaler la contribution des stagiaires que nous avons encadrés, notamment Sylvain, Svet et Mathieu dont de nombreux résultats peuplent ce manuscrit. Les autres membres du laboratoire méritent tous mes plus profonds remerciements pour m'avoir pris sous leur aile.

Cette thèse s'est effectuée en partenariat avec l'équipe INSERM U318 que je tiens à remercier pour son accueil et son aide. Laurent PELLETTIER, Sandra et Danièle m'ont été d'un grand secours pour les cultures cellulaires et les résultats en microplaques et je dois à Laurent beaucoup de conseils précieux pour la soutenance. Ali et Marie m'ont énormément aidé à comprendre et faire marcher les appareils de spectrométrie de masse. Je les remercie aussi pour leur confiance quand la machine cassait juste après mon passage.

Je tiens à remercier pêle-mêle tous les autres membres du CEA qui ont permis à ce travail d'avancer : Odile FILHOL-COCHET du DRDC en biologie, l'équipe d'Yves VANDENBROUCK pour l'analyse de données, l'équipe de Christian VINCENT, CEA-Valo et le BEM pour les aspects « valorisation ».

Je suis aussi très reconnaissant aux membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Les échanges que nous avons déjà pu avoir ont beaucoup contribué à ce manuscrit.

Ce travail ne serait rien sans mes amis, mes parents, ma famille (mes frères) dont le soutien aura été décisif. Enfin le dernier mot ira à celle qui m'accompagne tous les jours. Un grand merci à toi Florence pour tous ces petits riens qui font qu'on y arrive finalement...

Tables des Matières

Tables des Matières

Introduction	11
<u>Contexte de l'étude</u>	11
<u>Motivations</u>	11
1 Génomique fonctionnelle	14
2 Criblage primaire et secondaire :	14
3 ADME/Tox et Tox	15
<u>Objectifs de la thèse</u>	16
Chapitre 1 : Culture de cellules en gouttes.....	20
1.1 De nouvelles technologies : les puces à cellules.....	20
1.1.1 <i>La Miniaturisation est une tendance inéluctable en biologie</i>	20
1.1.2 <i>Principes des puces à molécules</i>	20
1.1.3 <i>Des puces à ADN aux puces à molécules</i>	21
1.2 Intégration : les puces à cellules.....	23
1.2.1 <i>De la génomique structurale à la génomique fonctionnelle : le phénotype</i>	23
1.2.2 <i>Représenter les modèles animaux in vivo : besoin de tests cellulaires in vitro</i> .	23
1.3 Un standard technologique : les plaques à puits	24
1.4 « Transfection inverse » : une innovation sur puce.....	26
1.4.1 <i>La transfection est une réaction capitale en biologie</i>	26
1.4.2 <i>Principe et avantages de la « transfection inverse »</i>	26
1.4.3 <i>Engouement, limites et évolutions</i> :.....	27
1.5 Intégration du multiplexage : la goutte, une technologie innovante	29
1.5.1 <i>Caractéristiques génériques des cultures cellulaires</i>	29
1.5.2 <i>Du puits à la goutte</i>	30
1.6 Miniaturisation des échantillons cellulaires : notion de plot.....	30
1.7 Renforcer la pertinence des analyses cellulaires : le haut contenu	32
1.7.1 <i>La culture cellulaire est un échantillon très hétérogène</i> :.....	32
1.7.2 <i>Analyse à l'échelle de la cellule unique</i> :.....	33
1.8 Micro-gouttes et transfection	35
1.8.1 <i>Principe</i>	36
1.8.2 <i>Description du substrat</i>	36
1.8.3 <i>Système d'incubation en vapeur saturante</i>	39
1.8.4 <i>Preuves de faisabilité : multi-transfections d'ADN recombinant</i> .	40

Tables des Matières

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »	44
2.1 Des substrats optimisés :	44
2.1.1 Cahier des charges :	44
2.1.2 Stratégie développée au laboratoire Biopuces : monocouches auto assemblées	47
2.1.2.1 Principes : SAM et silanes	47
2.1.2.2 Création d'une matrice de spots hydrophiles	50
2.1.2.3 Performances et limites :	51
2.1.3 Stratégie Ultrahydrophobe :	52
2.1.4 Impression par micro-contact	54
(« microcontact printing », μ CP, ou « stamping » en anglais).....	54
2.1.5 Stratégie industrielle de silanisation en phase liquide :	54
2.1.5.1 Description du protocole transféré :	55
2.1.5.2 Performances :	56
2.1.5.2.1 Biocompatibilité :	56
2.1.5.2.2 Comportement des gouttes.....	57
2.1.5.2.3 Test de validation : premières transfections.....	61
2.1.5.3 Améliorations	64
2.2 Robotisation de la formation de nanogouttes de culture cellulaire	66
2.2.1 Cahier des charges	66
2.2.2 Choix de la technologie optimale : dispense piézo-électrique	67
2.2.2.1 Seringues et Capillaires	68
2.2.2.2 Pointes et contacts	68
2.2.2.3 Dispense sans contact :	69
2.2.2.4 Perspectives : éjection acoustique	70
2.2.3 Prototype et modifications.....	71
2.2.4 Mise en place du sciFLEXARRAYER : 1ers résultats	74
2.2.4.1 Calibrages	74
2.2.4.2 Validation : premiers essais de transfections automatisées	79
2.2.4.3 Optimisations.....	81
2.2.4.3.1 Lavages	81
Bulles d'air	81
Etat de surface des pipettes :	81
2.2.4.3.2 Automatisation poussée	82
Evaluation de la dispense en ligne	82
Boucles de contrôles et de lavage	83
2.2.4.4 Spécificités des cultures cellulaires :	84
2.2.4.4.1 Amas cellulaires.....	84
2.2.4.4.2 Viabilité/Prolifération.....	85

Tables des Matières

Chapitre 3 : Détection et Quantification du signal.....	92
3.1 Microscopie Haut-contenu	92
3.1.1 Acquisition automatique à haute résolution en fluorescence.....	92
3.1.1.1 Parallélisme des traitements : trempages.....	92
3.1.1.2 Contraintes liées à l'acquisition.....	93
3.1.2 Caractéristiques de la plateforme d'imagerie (PathFinder OSA, IMSTAR)	94
3.1.3 Traitement d'images.....	96
3.1.3.1 Détection.....	97
3.1.3.2 Quantification du signal.....	98
3.1.3.2.1 Résultats obtenus et principe d'analyse.....	98
3.1.3.2.2 Bruit de fond	99
3.1.4 Conditions d'utilisation et optimisations nécessaires	99
3.2 Phénotypage par spectrométrie de masse.....	101
3.2.1 Contexte et méthodologie	101
3.2.1.1 Spectrométrie de masse et protéomique	101
3.2.1.2 Choix de la technique et concept.....	102
3.2.2 Faisabilité : culture cellulaire, viabilité et spectres.....	104
3.2.2.1 Viabilité et prolifération	104
3.2.2.2 Obtention de spectres.....	106
3.2.2.3 Influence du nombre de cellules.....	108
3.2.3 Signature phénotypique en spectrométrie de masse.....	109
3.2.3.1 Principe	109
3.2.3.2 Différenciation de phénotypes : apoptose et prolifération.....	110
3.2.3.2.1 Conditions expérimentales.....	110
3.2.3.2.2 Stratégie d'analyse	111
3.2.3.2.3 Résultats.....	113
3.2.3.3 Perspectives : applications.....	114
3.2.4 Imagerie de culture cellulaire par spectrométrie de masse	115
3.2.4.1 Principes	115
3.2.4.2 Spectrométrie TOF-SIMS.....	116
3.2.4.3 Preuve de concept.....	117
3.2.4.3.1 Mise au point : étude des contaminations	117
3.2.4.3.2 Imagerie cellulaire (durée, cellules, contaminants).....	118
3.2.4.4 Perspectives	120

Tables des Matières

Chapitre 4 : Application	125
4.1 Contexte :	125
4.1.1 <i>Les tumeurs cérébrales sont un enjeu clinique majeur</i>	125
4.1.2 <i>Hypothèses de travail</i> :	126
4.2 Objectifs et modèle :	127
4.2.1 <i>Sélection des gènes et modèles cellulaires</i>	127
4.2.2 <i>Méthode d'extinction : interférence ARN</i>	127
4.2.3 <i>Phénotype : mortalité cellulaire</i>	129
4.2.4 <i>Objectifs des mesures et contenu d'une expérience de criblage</i>	130
4.3 Implémentation et tests préliminaires :	132
4.3.1 <i>Séquence d'un criblage type</i>	132
4.3.2 <i>Tests préliminaires et calibrage</i> :	133
4.4 Considérations technologiques.....	137
4.4.1 <i>Limitations</i>	137
4.4.2 <i>Conséquences sur le modèle cellulaire et l'interprétation</i>	139
4.5 Tendances et résultats	140
4.5.1 <i>Analyse globale</i>	140
4.5.2 <i>Analyse haut contenu</i>	141
4.5.2.1 <i>Construction du modèle</i>	141
4.5.2.2 <i>Applications au criblage</i>	145
4.6 Conclusions technologiques – Perspectives biologiques	146
Conclusions	150
<u>Puces à cellules en nanogouttes : résumé de nos contributions</u>	150
1 <i>Résultats et Perspectives</i>	150
2 <i>Intérêt de la goutte</i>	152
3 <i>Pertinence des modèles cellulaires</i>	153
<u>Hétérogénéité des cultures cellulaires : intégration et étude</u>	154
1 <i>Le Haut Contenu : une nouvelle approche analytique</i>	154
2 <i>Contrôle Qualité : vers le « Laboratoire-sur-Puces »</i>	154
3 <i>La réponse d'une population n'est pas la moyenne des réponses</i>	157
Bibliographie Générale	160
Annexes	
A Protocole de fabrication du premier lot de puces à cellules	172
B Publication	173
C Formules de calculs géométriques	182
Résumés	183

Tables des Matières

INTRODUCTION

<u>Contexte de l'étude</u>	11
<u>Motivations</u>	11
1 Génomique fonctionnelle	14
2 Criblage primaire et secondaire :	14
3 ADME/Tox et Tox	15
<u>Objectifs de la thèse</u>	16

Introduction

Contexte de l'étude

Aujourd'hui, certains domaines de la biologie sont arrivés à un stade où la miniaturisation des systèmes d'étude se révèle indispensable. La complexité des phénomènes mis en jeu ainsi que la nécessité de travailler à des échelles micro- et nano-métriques nous plongent directement dans des registres où le haut débit des analyses et des traitements de données et le parallélisme des expériences ont une place centrale. Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont trait à la conception et la mise en place de dispositifs de type biopuces permettant de réaliser et d'analyser des milliers de cultures cellulaires.

Ces travaux se placent d'emblée dans un environnement pluridisciplinaire, à l'interface entre la biologie et la technologie. Basée au laboratoire Biopuces créé en 2001 au sein de la Direction des Sciences du Vivant du CEA (Commissariat à l'Energie Atomique) à Grenoble, cette thèse s'appuie sur les contacts fructueux du laboratoire avec les technologues du Leti (Laboratoire d'Electronique et des Technologies de l'Information, CEA). Par ailleurs elle s'est beaucoup enrichie de l'incessant dialogue avec des équipes de biologistes du CHU (INSERM U318, co-encadrant la thèse) et du CEA/DRDC (Département de Réponse et Dynamique Cellulaire) de Grenoble. Ce cadre a permis de structurer les recherches technologiques au service de la biologie et de ses applications cliniques.

Dans une optique de valider la démarche scientifique par l'évaluation de son adéquation avec ses applications, la volonté de mettre au point des technologies qui soient rapidement transférables au monde industriel pour une utilisation efficace a été présente tout au long de ce travail jusque dans ses motivations.

Motivations

La recherche en biologie demande de nouvelles technologies

En 2001 après 11 ans de travaux, le « Human Genome Project » [1, 2 - International Human Genome Sequencing Consortium] rendait public un premier séquençage de l'ensemble des gènes de l'homme. Cela représente 3 milliards de bases environ, pour 20 à 25000 gènes. L'utilisation de cette masse d'information est nécessaire pour guider la découverte de nouveaux médicaments, pour rendre possible des thérapeutiques personnalisées (pharmacogénomique), ou encore pour mettre en évidence des thérapies efficaces pour les maladies génétiques. Pour comprendre et interpréter en termes thérapeutiques les fonctions des gènes, l'implication de chacun d'eux dans un processus biologique doit être testée en parallèle. D'un point de vue théorique, cela représenterait des expériences à 25 000 réponses pour chaque condition analysée concernant les gènes humains. De plus ces gènes correspondent à plusieurs centaines de milliers de protéines qui sont les véritables effecteurs des réactions biochimiques, dont les fonctions sont encore pour la plupart inconnues.

Deux approches de la miniaturisation sont aujourd'hui enclenchées. D'une part les nouvelles technologies en biologie permettent d'obtenir des informations au niveau moléculaire : identification et quantification de l'expression de gènes ou de protéines

Introduction

produites par un organisme vivant, séquençage et structure des protéines, interaction protéine-ligand par exemple. Les biologistes travaillent à l'échelle de ces molécules et mettent en place des expériences permettant de les manipuler individuellement de façon micro- voir nanométriques dans des expériences miniaturisées.

D'autre part dans un organisme vivant, l'ensemble des processus mis en œuvre sont interconnectés et conduisent à une complexité extraordinaire des phénomènes moléculaires. L'expression des gènes est régulée par des protéines produites à partir d'autres gènes. Elles interagissent de façons compétitives. Seules des analyses globales des mailles de ces réseaux peuvent fournir des informations pertinentes sur leurs implications dans un phénomène biologique donné. Cela n'est possible qu'en parallélisant les tests, en utilisant de nombreux réacteurs indépendants caractérisant chacun une maille du réseau, traités de manière commune.

Pour que les connaissances issues de la génomique soit utilisables, la recherche en biologie doit disposer d'outils miniaturisés capables d'analyser de nombreux événements moléculaires de manière rapide à haut-débit en parallèle. Ce besoin fondamental touche tous les niveaux de la biologie, de la compréhension des fonctionnements des systèmes vivants aux processus commerciaux de découverte de nouveaux médicaments où l'avènement de l'ère post-génomique appelle à des changements de paradigme.

Des besoins tout au long de la chaîne du médicament :

Depuis longtemps la recherche de nouveaux médicaments dans l'industrie pharmaceutique repose sur un modèle de tri. Le nombre de molécules à disposition qui seraient potentiellement actives dans le cadre d'une pathologie est immense. De plus, la chimie combinatoire permet de synthétiser un nombre considérable de dérivés à partir d'un squelette moléculaire, démultipliant encore le nombre de candidats médicaments. Afin de sélectionner celui qui finalement soignera les pathologies, un tri « systématique » est effectué en plusieurs étapes sur de très nombreuses caractéristiques (efficacité, toxicité par exemple). Dans un premier temps, le travail est moléculaire. Les recherches portent sur des reconnaissances moléculaires avec des cibles d'intérêt caractéristiques de la pathologie étudiée. Dans un second temps, les informations obtenues sont intégrées pour tenter de comprendre l'implication des candidats dans des mécanismes biologiques plus sophistiqués dans des modèles représentant des environnements de plus en plus complexes. Les recherches passent à des études sur l'efficacité et la toxicité sur des modèles cellulaires puis animaux, pour qu'enfin le candidat puisse être inoculé aux utilisateurs finaux, les hommes. Seules les candidats satisfaisant les contraintes étudiées à chaque étape passent à l'étape suivante. Les grandes lignes de ce processus sont présentées dans le graphique Figure 1.

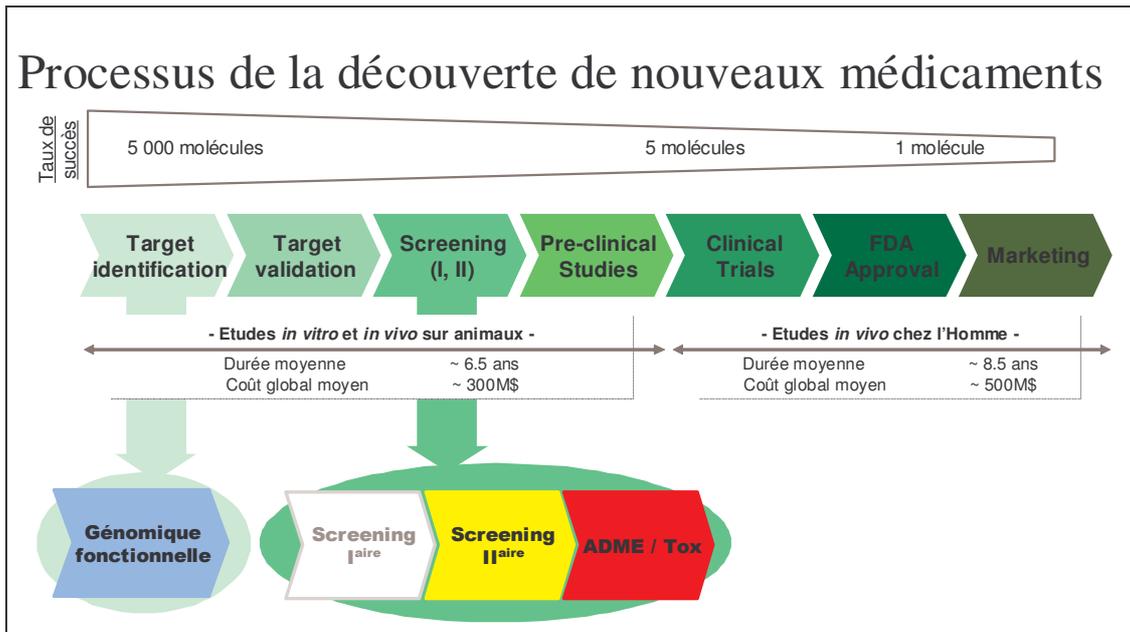


Figure 1 : Processus de la découverte des médicaments dans l'industrie pharmaceutique (source : Alcimed 2003)

Ce processus, appelé criblage, dure de 12 à 15 ans et peut coûter des millions de dollars. Les taux d'échecs faramineux rencontrés ont amené les entreprises pharmaceutiques au modèle de développement du « blockbuster ». Il s'agit de chercher un médicament rentable qui permettra d'obtenir des recettes de plus de 1 milliard de dollars par an pendant son monopole, la découverte de ce bijoux rattrapant les molécules testées qui ne sont pas arrivées au bout de la chaîne. Au vu de ces chiffres, on comprend que de nombreuses études aient été menées sur ce sujet. Il en ressort principalement la mise en exergue d'une augmentation très nette des investissements en recherche et développements depuis les années 1990, notamment dues au passage au criblage à haut-débit entièrement automatisé que l'avènement des recherches génomiques a provoqué. Cependant cette masse d'argent n'a pas réellement permis d'augmenter le nombre de nouveaux médicaments mis sur le marché. Certains parlent de l'échec de la révolution de la génomique [3 - Dickson et al., 4- Smith]

Pour pallier à ces déficiences sans changer de modèle de recherche à court ou moyen terme, il ressort de ce constat un besoin de « productivité » au niveau de la recherche. D'une part il faut accélérer les débits du processus de tri, en augmentant le nombre de tests faits en parallèle et en miniaturisant les réacteurs pour minimiser les quantités de réactifs souvent chers à produire. D'autre part si les tests étaient plus pertinents, c'est-à-dire permettant de prédire plus tôt plus d'informations, le nombre d'échecs terminaux (phases cliniques) beaucoup plus coûteux serait réduit. Dans le reste de cette partie nous allons détailler dans quelles mesures ces besoins se font ressentir tout au long des étapes de criblage.

1 Génomique fonctionnelle

Le domaine de la génomique fonctionnelle enveloppe toutes les étapes qui partent des informations disponibles sur le plan génétique pour identifier des cibles (géniques ou protéiques) fonctionnellement impliquées dans les pathologies étudiées. La compréhension de l'activité des gènes dans un modèle donné permet d'une part d'identifier les réseaux engagés dans les maladies, et d'autre part de trouver des cibles pharmacologiques sur lesquelles les médicaments vont agir, généralement par liaison soit dégradante (la cible est détruite), soit immobilisante (la cible ne fonctionne plus, par exemple dans le cas des agonistes inverses et des antagonistes de récepteurs), soit excitatrice (par exemple dans le cas des agonistes de récepteurs).

Dans le premier cas, les analyses s'attachent à regarder comment l'expression de l'ensemble des gènes peut varier suite à un stimulus (recréant les conditions de la maladie par exemple) par rapport à un comportement standard. Les gènes ayant évolué seront sans doute impliqués dans le réseau correspondant. Les traitements de ces expériences sont parallèles puisque tous les gènes sont étudiés en même temps.

Dans le deuxième cas, les études cherchent quels gènes de ces réseaux peuvent représenter des cibles. Si l'extinction d'un gène (son expression est annulée par l'utilisation d'oligonucléotide de type antisens ou par « knock-out » par exemple) permet de sortir du modèle de la pathologie, alors une molécule agissant sur cette cible pourrait bien constituer un médicament. Les analyses de chaque gène menées en parallèle peuvent très rapidement permettre d'obtenir les éléments clefs du réseau. De plus leur implication dans des phénomènes annexes peut aider à la compréhension des effets secondaires potentiels.

Cette compréhension pâtit toutefois du fait que l'environnement de ces molécules et des cibles qu'elles mettent en jeu est un facteur essentiel de la régulation de leurs fonctions. Pour que les mesures effectuées puissent être transférables à des systèmes complexes plus loin dans la chaîne du criblage, le modèle moléculaire n'est pas suffisant. Le modèle cellulaire (culture de cellules vivantes dans des réacteurs biochimiques) apporte un degré supplémentaire de pertinence qui permettra de diminuer le taux d'échec.

2 Criblage primaire et secondaire :

Une fois que les cibles ont été identifiées, le tri des candidats médicaments peut commencer. Dans un premier temps ceux-ci sont testés contre les cibles, molécules à molécules : si le candidat s'accroche à la cible, alors il devient une « touche » et passe à l'étape suivante. **On parle de criblage primaire.** Un candidat peut être testé sur plusieurs cibles, notamment celles sensées modéliser les effets secondaires (si le candidat s'accroche à une cible essentielle pour la viabilité de l'organisme, sa toxicité sera très élevée). Le nombre de candidats disponibles mais aussi le taux d'échec de cette étape sont gigantesques, les tests sont donc entièrement robotisés et très rapides (un million tous les 2 mois en 1536 puits).

Les touches sont ensuite évaluées dans des modèles de plus en plus complexes : la liaison à une ou plusieurs cibles n'est pas directement indicatrice d'une activité dans un environnement « natif ». Avant de passer aux animaux (tests *in vivo*) qui coûtent très chers et sont éthiquement controversés, les candidats sont testés pour leurs activités ou toxicités dans des modèles cellulaires pertinents **au cours du criblage secondaire.** De manière à caractériser au mieux les touches, plusieurs types cellulaires sont utilisés (cellules de foie et de cerveau par exemple) sur lesquels plusieurs états sont caractérisés (viabilité, action sur la cible, modèle de la maladie). Dans ce sens le recours à l'*in vivo* ne se fait que pour des

Introduction

touches bien certifiées devenues des « leads » (ce qui pourrait se traduire par « pistes » en français).

Les tests peuvent être ici encore menés de manière parallèle et entièrement automatisés, même si parfois les fragiles cellules ne se prêtent pas forcément à l'automatisation. Des modèles robustes et solides (des cellules faciles à cultiver comme les HeLa par exemple) sont considérées comme des réactifs et rentrent dans ces processus haut-débit. De plus la miniaturisation des tests apporte une globalisation des analyses plus pertinente, ainsi qu'un coût amoindri pour une utilisation raisonnée des réactifs. La mise en place de ces tests est souvent longue et coûteuse. Plusieurs années sont parfois nécessaires pour développer un test sur quelques millions de composé qui durera quelques mois.

3 ADME/Tox et Tox

Dans les phases suivantes du tri, les molécules candidates sont testées dans des modèles de plus en plus complexes (de la cellule aux organismes entiers) pour leur activité et leur toxicité. Cette phase est essentielle pour permettre l'inoculation à l'homme par la suite. Les résultats et les modèles considérés sont plus complexes que ceux des phases précédentes et se prêtent peu à une automatisation poussée. Les approches techniques utilisées sont beaucoup moins haut-débit. Par ailleurs, comme ce domaine de recherche prépare le passage aux essais cliniques, il est en grande partie réglementé, entraînant peu de changements technologiques non sollicités par les normes en vigueur.

Cet aspect du criblage pharmaceutique peut être rapproché d'une volonté européenne, implémentée par la Commission dans le programme REACH (« Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals » en anglais, « Enregistrement, Evaluation et Autorisation des Produits Chimiques » en français). Un des aspects développés vise à établir des tests *in vitro* pour mesurer la toxicité de tous les produits chimiques commercialisés dans une échéance proche. Il s'agit d'une part de remplacer ou de réduire les tests *in vivo* classiquement utilisés avec différentes espèces d'animaux, affirmant une cause morale ; et d'autre part de tester à terme la totalité des produits chimiques à moindre coût. Ces tests devront permettre un débit de traitement élevé compatible avec la recherche chimique, en y associant des prédictions pertinentes quant à la toxicité des produits testés.

En dehors de ce contexte purement industriel, la pratique de la biologie dans les milieux académiques ne peut pas se permettre de passer outre l'intégration de la masse de données ainsi que des techniques de traitements issus de l'ère post-génomique. En France plus particulièrement, l'émergence de plateformes techniques (protéomique, transcriptome par exemple) communes à plusieurs laboratoires de recherche atteste de cette nécessité. Les besoins en techniques et outils sont donc tout à fait comparables au contexte décrit précédemment. Les buts principaux sont par contre plus fondamentaux et concernent essentiellement la compréhension des réseaux génétiques et des mécanismes les concernant.

Objectifs de la thèse

En résumé, la recherche en biologie aujourd'hui, que ce soit au niveau industriel (pharmaceutique) ou académique (fondamentale et appliquée), dispose d'une quantité de données génomiques impressionnante qu'il lui faut organiser (comprendre les réseaux d'interactions) et utiliser afin de conduire à l'apparition de nouveaux concepts menant par exemple à de nouvelles thérapies. Ce travail nécessite des outils qui soient capables d'analyser des événements moléculaires, à haut-débit et avec une pertinence qui décide du transfert des résultats obtenus à des modèles plus complexes.

Ce travail de thèse s'est basé sur l'intégration au laboratoire Biopuces du CEA d'une technologie innovante de culture de cellules vivantes sur substrat plan dans le contexte de criblage à haut-débit. Cela implique plusieurs objectifs que la structure de ce manuscrit reprend.

1. Compréhension des concepts sous-tendant l'invention puis mise en place de substrats et de protocoles à des échelles macroscopiques pour en démontrer la faisabilité. (chapitre 1)
2. Miniaturisation des dispositifs aux échelles micro, voir nano-métriques pour répondre aux besoins de débit et de faibles quantités de réactifs. (chapitres 2 et 3)
3. Utilisation des dispositifs miniaturisés pour des applications d'intérêt afin de montrer la pertinence de l'approche. (chapitres 3 et 4)

En conclusion, nous verrons comment les développements effectués ont conduit à une réorientation du positionnement de la technologie vers d'autres utilisations. L'applicabilité dans des systèmes à très haut-débit nécessitant des développements techniques en automatisation et en robotisation trop importants pour un travail de recherche, les valeurs de la technologie en termes de pertinence poussent à un rapprochement avec la biologie plus fondamentale et moins automatique.

Introduction

Chapitre 1

Culture de cellules en gouttes

1.1 De nouvelles technologies : les puces à cellules	20
1.1.1 <i>La Miniaturisation est une tendance inéluctable en biologie</i>	20
1.1.2 <i>Principes des puces à molécules</i>	20
1.1.3 <i>Des puces à ADN aux puces à molécules</i>	21
1.2 Intégration : les puces à cellules.....	23
1.2.1 <i>De la génomique structurale à la génomique fonctionnelle : le phénotype</i>	23
1.2.2 <i>Représenter les modèles animaux in vivo : besoin de tests cellulaires in vitro</i> .	23
1.3 Un standard technologique : les plaques à puits	24
1.4 « Transfection inverse » : une innovation sur puce.....	26
1.4.1 <i>La transfection est une réaction capitale en biologie</i>	26
1.4.2 <i>Principe et avantages de la « transfection inverse »</i>	26
1.4.3 <i>Engouement, limites et évolutions</i> :.....	27
1.5 Intégration du multiplexage : la goutte, une technologie innovante	29
1.5.1 <i>Caractéristiques génériques des cultures cellulaires</i>	29
1.5.2 <i>Du puits à la goutte</i>	30
1.6 Miniaturisation des échantillons cellulaires : notion de plot.....	30
1.7 Renforcer la pertinence des analyses cellulaires : le haut contenu	32
1.7.1 <i>La culture cellulaire est un échantillon très hétérogène</i> :.....	32
1.7.2 <i>Analyse à l'échelle de la cellule unique</i> :	33
1.8 Micro-gouttes et transfection	35
1.8.1 <i>Principe</i>	36
1.8.2 <i>Description du substrat</i>	36
1.8.3 <i>Système d'incubation en vapeur saturante</i>	39
1.8.4 <i>Preuves de faisabilité : multi-transfections d'ADN recombinant.</i>	40

Chapitre 1 : Culture de cellules en gouttes

Chapitre 1 : Culture de cellules en gouttes

Du concept au développement d'un dispositif de culture en micro-gouttes

1.1 De nouvelles technologies : les puces à cellules

1.1.1 La Miniaturisation est une tendance inéluctable en biologie

Nous avons introduit précédemment que deux phénomènes distincts sous-tendaient l'importance de la miniaturisation des dispositifs d'étude en biologie. Le premier aspect ressemble à une approche « top-down » (descendant des modèles complexes macroscopiques vers la « simplicité » du microscopique) bien connue des micro-electroniciens. De l'étude du corps humain dans son ensemble, la biologie s'est tournée vers les organes, les tissus, les cellules et aujourd'hui les molécules qui les composent. Des études au niveau moléculaire nécessitent des technologies capables d'individualiser des composés nanométriques. C'est pourquoi les nanotechnologies sont devenues des outils fondamentaux pour la biologie. Le deuxième aspect part du principe que la complexité du vivant peut être appréhendée dans des technologies parallèles et haut-débit. L'étude de l'ensemble des gènes du génome humain dans un seul microsysteme est aujourd'hui une réalité. D'un point de vue réaliste ces technologies ne peuvent qu'être miniaturisées. Ces deux approches ont conduit à la notion de micro-laboratoires qui peuvent manipuler des entités miniatures à haut-débit.

1.1.2 Principes des puces à molécules

Au niveau moléculaire, les phénomènes biochimiques sont gouvernés par des interactions très spécifiques entre molécules. On peut par exemple citer les appariements entre brins d'acides nucléiques, les liens entre les enzymes et leurs substrats ou encore entre les récepteurs membranaires d'une cellule et leurs ligands. La haute spécificité de ces interactions peut être utilisée pour identifier des molécules dans un échantillon d'une part (les propriétés ou la nature d'une molécule se liant à une molécule connue peuvent être déduites), et tester l'intérêt de candidats d'autres part (un candidat se liant à une cible dans un processus de criblage par exemple). L'utilisation en parallèle de nombreuses molécules connues pour étudier un échantillon permet d'en identifier les composants de manière indépendante.

Sur ce schéma, des dispositifs physiques simples ont été imaginés dans les années 1990. De taille centimétrique, ils sont constitués d'une surface plane solide sur laquelle sont placés des plots ou « spots » contenant des molécules d'intérêt, sous forme matricielle et en grand nombre. Ces surfaces sont appelées des biopuces sur lesquelles toutes sortes de molécules biologiques ont déjà pu être matricées*.

* Le verbe « matricer » et toutes les déclinaisons que l'on peut lui apporter n'existent pas dans un français correct. Cependant il semble très approprié pour décrire l'action de disposer des objets en forme de matrices sur des substrats plans. D'un commun accord, nous avons décidé de l'introduire dans ce manuscrit.

1.1.3 Des puces à ADN aux puces à molécules

Les puces à ADN [5 et 8 – Schena et al., 6 - D.J. Lockhart et al, 7 - Shalon D et al., 9 - Ekins et al.] (Figure 2 et Figure 3), maintenant utilisées classiquement en biologie moléculaire, constituent les premiers véritables bio-systèmes. Elles sont employées pour analyser la quantité de molécules d'ARN messager (*ARNm*) exprimées par chaque gène dans un tissu, dans un échantillon biologique (du sang par exemple) ou dans une culture cellulaire. Celles-ci sont converties en molécules d'ADN cibles correspondantes et plus stables, marquées par un fluorochrome. Des spots de molécules d'ADN sondes dont on connaît la séquence sont matricés sur une lame de verre, de plastique ou de silicium. Les molécules d'ADN cibles et sondes sont mises en contact : les ADN cibles s'hybrident de façon spécifique avec leur sonde complémentaire, donnant naissance à un signal fluorescent.

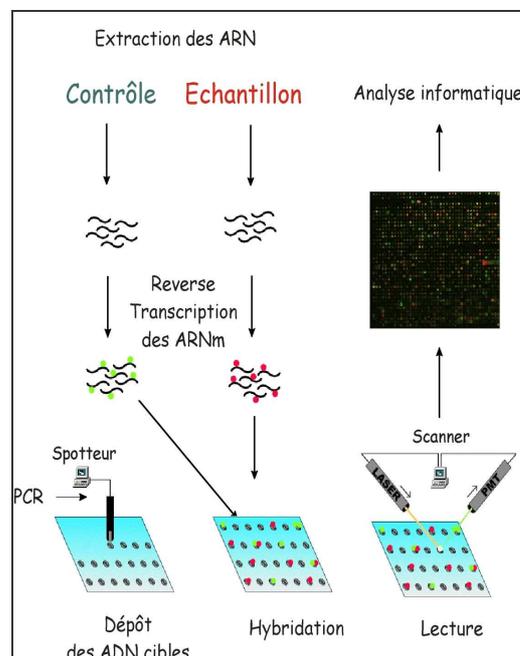


Figure 2 : Principe de fonctionnement des puces à ADN. Explication dans le texte au-dessus.
(adapté de <http://www.transcriptome.ens.fr/sgdb/presentation/principe.php>)

Ce signal permet de mesurer un taux de molécules fluorescentes d'ADN complémentaire présentes dans l'expérience. Chaque gène est représenté sur la puce par une ou plusieurs sondes de molécules d'acides nucléiques (oligonucléotidiques ou issues de PCR – « Polymérase Chain Reaction » en anglais ou « réaction en chaîne de la polymérase »), il est donc possible de déduire le niveau d'expression de ces gènes: plus la cellule a exprimé un gène, plus il y a de molécules d'*ARNm* correspondantes, donc plus de fluorescence observée sur le spot sonde.

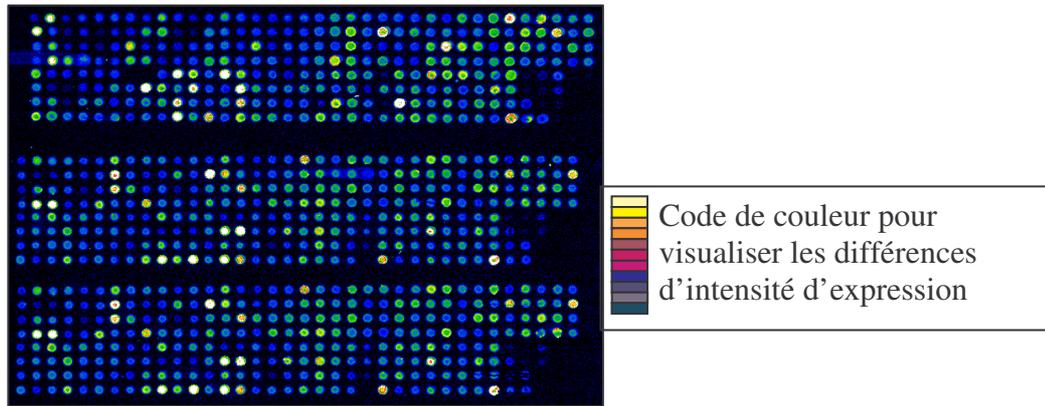


Figure 3 : Exemple de résultats d'une expérience de puce à ADN – Genopole Evry - CEA

Ces dispositifs permettent d'utiliser peu d'échantillon (quelques microlitres représentant quelques microgrammes d'ARNm), de traiter un nombre très important de gènes sur une seule puce (30 000 gènes pour des puces pan-génomiques qui représentent l'ensemble du génome d'un animal ou d'un individu) de manière globale avec une densité pouvant atteindre les 300000 sondes/cm² (GeneChip™ d'Affymetrix par exemple). La complexité des puces à ADN (qui peut être caractérisée par la densité de sondes ou le nombre de sondes par gènes par exemple) varie selon les utilisations mais elles sont maintenant un outil incontournable dans tous les domaines de la biologie [10-Venkatasubbarao, 11 -Iyer].

Si la connaissance du niveau d'expression d'un gène permet de comprendre les réseaux de régulations et d'interactions dont ils font partie, elle ne peut pas être directement liée à des aspects fonctionnels. Les protéines issues des gènes constituent les véritables effecteurs des réactions biologiques. Elles proviennent de processus complexes faisant intervenir d'autres acteurs que les seuls gènes (épissage alternatif, phosphorylation, assemblage quaternaire par exemple), c'est pourquoi l'expression d'un gène ne peut pas être directement liée à la présence ou à l'absence de la protéine pour laquelle il code. Pour leur étude et suivant le même raisonnement technique, celles-ci ont été à leur tour matricées sur le format des puces [12–MacBeath, 13– Snyder, 14- Ramachandran]. Deux types d'utilisations principales ont été développés.

D'une part, les puces à protéines peuvent servir à la déconvolution d'un échantillon, pour identifier de quelles protéines il est constitué [15 - Phizicky]. Ces expériences sont très difficiles. Le nombre de protéines différentes dans un échantillon vivant dépasse plusieurs centaines de milliers [16- Zhu] et n'est pas accessible dans sa totalité par ces dispositifs. Si les étapes de phosphorylations qui influent sur la fonction des protéines sont ajoutées, le nombre augmente encore. Les puces à protéines représentent un outil adapté à la mise en évidence de la présence ou non de molécules appartenant à une famille plus restreinte (puces kinases par exemple). Des quantifications relatives peuvent alors être mise au point. Cependant la découverte d'un plus grand nombre de protéines d'un échantillon complexe est plus efficacement réalisée par la protéomique utilisant par exemple la spectrométrie de masse (voir chap 3.2).

D'autre part, l'utilisation la plus pertinente des puces à protéines concerne l'identification de molécules d'intérêt dans le processus du criblage primaire. Des protéines d'intérêt appartenant au phénotype étudié (toxicité ou efficacité) sont matricées sur le support. Le signal fluorescent issu de la liaison du candidat avec une protéine du substrat permet de déduire son implication potentielle dans le phénotype considéré. Si le candidat se lie à une protéine impliquée dans une maladie par exemple, il pourra avoir une efficacité pour inhiber

son action et donc soigner la maladie. Le haut-débit du format puce prend toute son importance pour découvrir des médicaments potentiels rapidement.

Le principe de fonctionnement de ces puces à déjà été étendu à plusieurs autres types de molécules matricées : ARN, peptides, ainsi que d'autres molécules chimiques [17- Finny et al., 18- Pellois et al.]. D'un point de vue technique, ces outils ont beaucoup bénéficié des développements des technologies du silicium (microtechnologies, photolithographie par exemple). D'un point de vue général, les puces à molécules représentent des outils très intéressants pour les étapes premières de la recherche en biologie.

1.2 Intégration : les puces à cellules

1.2.1 De la génomique structurale à la génomique fonctionnelle : le phénotype

Le but premier de l'utilisation des puces à molécules pour des applications de génomique (comprendre le fonctionnement du génome) est descriptif puisqu'il revient à caractériser une partie de la composition moléculaire d'un échantillon à un temps donné de son développement (quantité relative de molécules d'ARN ou de protéines par exemple). Ces informations ne sont pas corrélées simplement à une fonction que tout changement des quantités relatives de molécules présentes pourrait révéler (signature transcriptomique pour les puces à ADN par exemple). La fonction d'un gène (ou d'un ensemble de gènes ou de molécules) ne peut être déterminée qu'en confrontant son action (identifiée par le biais de son taux d'expression) à un état donné et réel d'un système vivant complexe. La cellule vivante est un modèle de choix pour ces découvertes. Elle permet d'étudier plusieurs fonctions déterminées à travers l'analyse de phénotypes cellulaires spécifiques.

Le phénotype peut être défini comme l'état complet de la cellule, c'est-à-dire la réalisation de l'ensemble des caractères (morphologiques et fonctionnels) spécifiant son état. La différenciation cellulaire, la prolifération, l'apoptose sont par exemple des états spécifiques. Pour comprendre l'implication d'un gène dans un processus cellulaire, il faut étudier l'influence de son action sur des phénotypes donnés.

1.2.2 Représenter les modèles animaux in vivo : besoin de tests cellulaires in vitro

La phase ultime de toute évaluation d'une hypothèse biologique a lieu dans le modèle animal (ou même chez l'homme pour les médicaments) [19-Greaves, 25- Li]. D'un point de vue économique, ces tests sont très lourds (coûteux et longs) et éthiquement controversés [<http://www.frame.org.uk/3rs/3rsintro.htm>, et 20 - Preziosi]. Le remplacement d'une partie du recours au modèle animal par des tests *in vitro* est de plus en plus demandé (programme REACH européen par exemple), même si le transfert des résultats obtenus vers les modèles plus complexes est souvent difficile [22-25].

Cependant, les tests *in vitro* utilisant les modèles moléculaires ne représentent que très faiblement ce qui peut se passer dans des environnements plus complexes. La conformation spatiales des molécules n'est pas respectée lorsqu'elles sont accrochées sur une surface solide bidimensionnelle: les protéines peuvent se situer dans des environnements dénaturants, des enzymes peuvent avoir leur site d'activité trop proche de la surface pour pouvoir être stériquement efficace par exemple [26- Merkel]. Les hypothèses fonctionnelles qui débouchent de ces systèmes sont rarement vérifiées.

Dans une approche de complexification croissante des modèles, des tests *in vitro* mettant en jeu des ensembles moléculaires sont considérés comme des expériences plus proches des

Chapitre 1 : Culture de cellules en gouttes

modèles vivants. Pour obtenir ces complexes protéiques, des méthodes naturelles ont été testées comme celles utilisant la machinerie enzymatique des réticulocytes de lapin [27 - Xu X et al.] ou des liposomes de foie animal ou humain [28 - Noireaux V et al.] mais leur valeur prédictive n'est pas démontrée.

Les tests *in vitro* réalisés sur cellules vivantes sont un bon intermédiaire entre complexité et coûts. La cellule représente le maillon élémentaire de tout organisme vivant (eucaryote ou procaryote). Elle peut être produite pour des coûts raisonnables et donc intégrée dans des systèmes haut-débit. Cependant le criblage de médicament sur des modèles cellulaires trop simples (lignées cellulaires immortelles ou assemblage de récepteurs non fonctionnels par exemple) a été un échec et n'a pas permis de prédire l'action de candidats sur des modèles *in vivo*. On peut citer des IC50 représentant les doses pour obtenir la mortalité de 50% d'une population cellulaire qui ne se traduisent pas toujours en LD50, dose conduisant à la mortalité de 50% des animaux. Les modèles cellulaires doivent se complexifier pour tenter d'intégrer la réalité tissulaire. Il sera alors nécessaire de tester plusieurs modèles cellulaires (provenant de plusieurs organes) en parallèle sur la même puce.

1.3 Un standard technologique : les plaques à puits

Les échantillons cellulaires se présentent sous forme liquide. Les premiers tests extrêmement bas débit utilisant des cultures cellulaires sont menés dans des boîtes de Pétri (10ml de culture cellulaire). Pour augmenter le parallélisme des traitements, ces réacteurs biochimiques ont été réduits et matricés. On obtient des plaques à puits de plastiques : plaques 96 puits, 384, voir 1536. Chaque puits est considéré comme un réacteur indépendant.

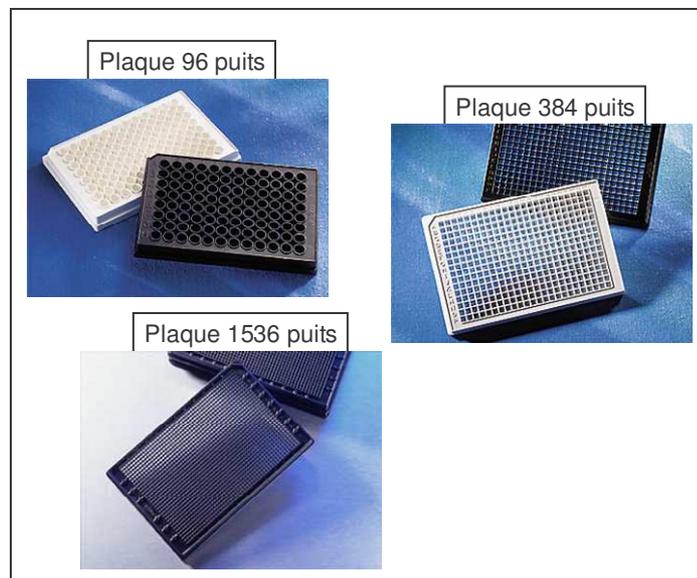


Figure 4 : microplaques de culture

(commercialisées par Corning, photos adaptées du catalogue <http://catalog2.corning.com/Lifesciences/>)

Les plaques à puits (ou microplaques) sont devenues des formats standard pour le criblage haut-débit. Le regroupement de sociétés industrielles utilisant le criblage biomoléculaire (« Society for Biomolecular Screening », SBS, <http://www.sbsonline.org/>) s'attache à promouvoir cette standardisation auprès des organisations concernées (« American National Standards Institute », ANSI) pour faciliter le recours à l'automatisation et la comparaison des tests entre différentes plateformes technologiques. Un comité pour le développement de

Chapitre 1 : Culture de cellules en gouttes

microplaques standards (« Microplate Standard Development Committee », MSDC) comprenant nombre de représentants des sociétés productrices ou utilisatrices discute de leurs caractéristiques [30- Feiglin].

Ce format standardisé permet une réelle miniaturisation des tests, qui utilisent une faible quantité d'échantillons souvent précieux (cultures primaires ou drogues) : environ 150µl pour les plaques à 96 puits par exemple (jusqu'à 300µl) et 3µl pour les plaques à 1536 puits. Il s'adapte particulièrement bien à l'automatisation poussée recherchée par l'industrie pharmaceutique pour la rapidité et le parallélisme des traitements. Celle-ci a effectué des investissements conséquents pour créer des plateformes de criblage entièrement robotisées (plusieurs millions d'euros par plateforme).

Cependant, dans le contexte d'accélération toujours croissante de ce domaine industriel, les plaques à puits atteignent leurs limites. Une miniaturisation plus poussée n'est pas raisonnable pour ce qui concerne des échantillons aussi fragiles que les cultures cellulaires. Elle conduit au confinement d'un liquide par des parois qui se trouve vite limité par des effets de capillarité et de praticité. Il est connu qu'une solution aqueuse confinée dans un espace d'une dimension inférieure au millimètre en contact avec un solide mouillable (hydrophile par exemple) et l'air ambiant est soumis à de grandes forces de capillarité. On mesure leur importance par rapport à la gravité par la longueur capillaire (dimension à partir de laquelle les forces capillaires prennent l'ascendant) :

$$L = \sqrt{\frac{2\gamma}{\rho g}}$$

où γ est la tension de surface (en N/m), ρ la densité du fluide (en kg/m³). Pour l'eau, elle vaut environ 3mm, ce qui signifie qu'à des dimensions inférieures les forces de capillarité prennent le pas sur la gravité. Pour des gouttes de 300µm de diamètre, elles sont environ 100 fois plus fortes.

A ces dimensions le liquide est lié aux surfaces, et les mélanges ne se font que par diffusion. Le puits devient un bio-réacteur beaucoup moins efficace. De plus, dans ces faibles volumes (inférieurs au microlitre) l'évaporation prend une importance capitale et impose des déroulements d'expériences parfois préjudiciables : elles ne peuvent pas durer plus de quelques jours et il est impossible d'ouvrir la plaque contenant les cellules en cours d'expériences pour rajouter des réactifs indispensables à la survie des cellules comme des facteurs de croissance par exemple. Enfin le système est hautement instable. Le liquide a une haute affinité pour le solide par rapport à l'air (solide hydrophile, ou liquide possédant des éléments surfactants comme les protéines du sérum de veau foetal). Toute perturbation (comme les mélanges de la solution pour pallier au premier problème par exemple) peut conduire le liquide à mouiller de manière plus importante le solide. Par capillarité la solution déborde dans les puits environnants. Ce phénomène est déjà présent dans les plaques à puits conventionnelles (96 ou 384 puits) où l'on parle de « adjacent hits ou mini-hits ». Dans les plaques 1536 puits les problèmes d'évaporation et la difficulté de réaliser des mélanges est encore plus grande [29 - Garyantes].

1.4 « Transfection inverse » : une innovation sur puce

En s'inspirant du format de puces à ADN, une première miniaturisation en rupture avec le schéma de la plaque à puits a été publiée par David M. Sabatini et J. Ziauddin dans le journal Nature (en mai 2001) pour des applications de transfection [31 - Ziauddin].

1.4.1 La transfection est une réaction capitale en biologie

Celle-ci consiste à faire entrer dans la cellule vivante des molécules nucléiques étrangères qui peuvent avoir plusieurs fonctions. D'un point de vue fonctionnel, cela peut permettre d'étudier comment l'introduction d'un gène dans le modèle cellulaire le fait évoluer sous certaines conditions (sur-expression), ce qui renseigne alors sur l'implication de ce gène dans le processus mis en jeu. Avec la découverte de la protéine fluorescente GFP (« Green Fluorescent Protein » en anglais, « protéine à fluorescence verte en français [34 - Chalfie]), la sur-expression a pris une dimension supplémentaire puisqu'il est possible par exemple de fusionner le gène de la GFP avec celui d'une autre protéine. Celle-ci devient un senseur : tout phénomène influant sur la production de cette protéine recombinante, modifie la fluorescence de la cellule.

Enfin, des techniques particulières ont été développées sur la base de phénomènes naturels pour permettre de diminuer l'expression d'un gène de manière spécifique (sous-expression par ADN antisens ou ARN interférent par exemple – voir chap 4.2.2). Les molécules transfectées renseignent sur l'impact de l'extinction d'un gène sur un phénotype particulier.

Les techniques de sur- et de sous-expression sont complémentaires, elles sont utilisées de manières parallèles et à haut-débit pour comprendre l'ensemble des réseaux dans lesquels les gènes sont impliqués de manière très rapide.

1.4.2 Principe et avantages de la « transfection inverse »

La technique employée, sur laquelle deux brevets ont été déposés [32, 33- Sabatini], est appelée «transfection inverse» (« reverse transfection » en anglais), puisque l'ADN est d'abord accroché sur le support de la puce avant d'être transfecté dans les cellules. Les transfections s'effectuant en « plots » sur un support plan, la notion de puce peut être employée et les résultats analysés de façon parallèle.

Le principe général des techniques décrites dans cette publication, pour réaliser cette première puce à cellules est expliqué dans la figure ci-dessous. Dans un premier temps, une lame de verre classique est « imprimée » de petits spots d'1nl (soit environ 120-150µm de diamètre) d'ADNc (pour ADN codant) exprimables, tous les 400µm à l'aide d'un robot. Ceux-ci sont préparés dans une solution à faible concentration de gélatine qui les maintient « accrochés » sur la puce. Ensuite la lame est séchée, et brièvement exposée à un agent de transfection lipidique ; placée dans une boîte de culture elle est alors recouverte de cellules adhérentes baignant dans du milieu de culture pendant 40h. Finalement les changements de phénotypes provoqués par la transfection sont étudiés, soit par fluorescence, soit par marquage radioactif.

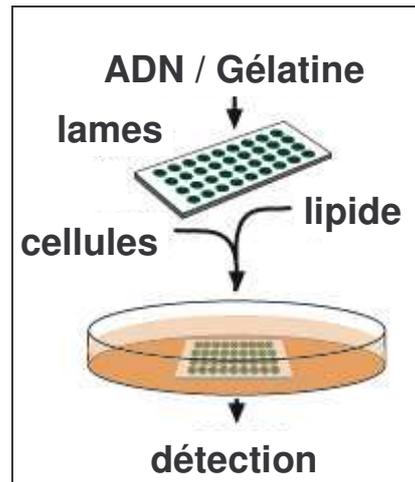


Figure 5 : principe de la transfection inverse, adapté de [31Sabatini et al.]

Les possibilités de ce nouveau principe ont été démontrées d'une part par l'analyse par fluorescence de la fabrication par les cellules d'une protéine modèle, la GFP, induite par la transfection d'un ADN codant pour cette protéine : l'ADN lui-même n'est pas fluorescent, mais la protéine, issue de sa transcription suivie de sa traduction, l'est. D'autre part, la vérification de la formation correcte de la structure quaternaire des protéines a été observée à l'aide du modèle du récepteur dopaminergique. Grâce à une drogue spécifique marquée au tritium radioactif, on a pu vérifier que le récepteur dopaminergique recombinant fabriqué sur la puce conservait ses propriétés pharmacologiques.

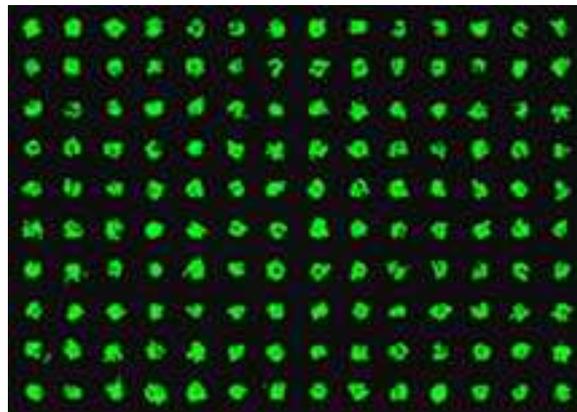


Figure 6 : transfection inverse localisée de GFP dans des 'petits tas' de cellules HeLa. (image tirée de [http://staffa.wi.mit.edu/sabatini_public/reverse_transfection/frame.htm])

1.4.3 Engouement, limites et évolutions :

Bien que l'idée principale soit d'une grande innovation, la méthode employée par D.M. Sabatini pose tout de même quelques problèmes. Elle est très compliquée : la préparation de la gélatine semble par exemple difficile à mettre en œuvre et à reproduire. Les cellules sont disposées en tapis continu sur la puce : elles couvrent toute la lame de verre. Cela a l'avantage de les conserver en bon développement mais la franche délimitation des plots de cellules transfectées n'est pas évidente à chaque tentative : il n'y a aucune raison pour que la transfection se fasse de façon si localisée (Figure 6). Par ailleurs dans une analogie avec les puits, il n'est pas possible de considérer chaque plot comme un réacteur indépendant. Dès lors, les drogues ou candidats médicaments à tester doivent être disposés en quantité

Chapitre 1 : Culture de cellules en gouttes

suffisante sur l'ensemble de la lame dans la culture cellulaire : une concentration unique d'une seule drogue par lame par exemple.

Conscientes de ces limites mais fascinées par l'innovation, de nombreuses équipes ont repris cette technique pour des applications variées [37- Chang, 38 - Mousses], en réalisant des optimisations très intéressantes [36 - Baghdoyan] qui ont permis de faciliter la transfection et de la rendre reproductible. Notamment, le brevet [35 - Uhler] détaille très précisément des optimisations de la transfection. Par ailleurs des essais avec des polymères à la place de la gélatine ont été menés [44- Bailey].

Dans le contexte de cette invention, David M. Sabatini et M. Chao ont décidé de tenter l'expérience de la validation de cette technologie par la création d'une entreprise : Akceli (site web : <http://www.akceli.com>). Le but premier de cette compagnie était paradoxalement purement biologique : trouver la façon dont les molécules actives peuvent vraiment fonctionner au sein de la cellule. Cependant, cette invention a révélé les possibilités technologiques liées à la fabrication de milliers de cultures cellulaires recombinantes différentes sur chaque spot. L'importance économique de pouvoir fabriquer à volonté des cellules recombinantes individualisées a été très vite comprise [39-44]. Malheureusement, après des débuts fracassants (une levée de fonds de plus de 6 milliards de dollars en 2002) et sans réellement d'alerte ou de raison, la compagnie Akceli a fermé ses portes en 2004. La technologie a été rachetée par la société Integral Molecular (<http://integralmolecular.com>). Les grands clients de cette société de services biotechnologiques étaient sensées être les industries pharmaceutiques pour la recherche de cibles ou de médicaments. Ayant déjà fait d'importants investissements dans le format plaque à puits, elles ne peuvent pas se permettre de passer directement à la lame de verre, d'autant plus que le manque de multiplexage par rapport aux drogues testées (le crible de plusieurs candidats médicaments par puces n'est pas possible) se présente comme une limite flagrante.

Les développements technologiques menés par cette jeune société laissaient entrevoir ce problème. L'une de leurs démonstrations a eu pour objet l'expression de protéines de type GPCR (« G-Protein Coupled Receptors » en anglais, ou « récepteurs couplés aux protéines G » en français) [46- Mishina] qui représentent la moitié des cibles essentielles de l'industrie pharmaceutique [45 -Filmore]. La méthodologie mise en place tentait de pallier l'absence de multiplexage et l'intégration au format microplaque en réalisant les puces à cellules et la transfection inverse au fond des 96 puits d'une plaque de microtitration. 36 plots de la solution d'ADN sans la gélatine sont déposés dans chaque puits d'une plaque 96, soit 3400 conditions par plaque de microtitration. Les puits permettent de tester l'action d'antagonistes (1 par puits). Cependant un degré de multiplexage supplémentaire pourrait être atteint en faisant de chaque plot de transfection un réacteur indépendant.

1.5 Intégration du multiplexage : la goutte, une technologie innovante

La technologie de puces à cellules issue de la « transfection inverse » s'est inspirée du format des puces à molécules en miniaturisant les dépôts de molécules actives solides (sèches, en gélatine, ou en polymères). Pousser plus avant la miniaturisation implique de s'attaquer à la réduction de la taille de la culture cellulaire elle-même, qui est un échantillon liquide.

1.5.1 Caractéristiques génériques des cultures cellulaires

Afin de mieux comprendre les impacts des contraintes posées par la miniaturisation des systèmes sur les échantillons de cultures cellulaires, il convient d'en expliciter la composition de manière générique. Les cultures cellulaires sont des échantillons vivants qui ont besoin de conditions très particulières pour leur bon développement. Ces conditions peuvent varier en fonction des systèmes étudiés, notamment lorsqu'on étudie la différenciation cellulaire, mais d'une manière générale on retrouve quelques caractéristiques communes qui nous permettent de généraliser l'utilisation des dispositifs que nous avons mis en place. Le lecteur averti pourra passer rapidement sur cette description sommaire de la culture cellulaire.

Les cultures cellulaires sont des échantillons liquides. Les cellules baignent dans des solutions complexes de nutriments (acides aminés essentiels par exemple) et autres agents (vitamines par exemple) que nous appellerons « milieu de culture » (pour un milieu fréquemment utilisé au cours de ce travail, on peut se reporter à la référence DMEM Glutamax Mix F-12, fourni par Invitrogen, ref 31331-093). Outre ces composants, les milieux contiennent aussi des sels pour conserver une bonne pression osmotique et un pH aux environs de 7,4. Pour le bon développement de la plupart des cellules, il est nécessaire de rajouter un ensemble de facteurs de croissance qui sont généralement amphiphiles (ils possèdent des parties hydrophobes et d'autres hydrophiles) et peuvent être considérées comme des surfactants. On utilise par exemple le sérum de veau fœtal (SVF, ou FCS en anglais, Dominique Dutscher, ref 500105) à hauteur de 10% en volume. Une bonne indication de la présence de surfactants est la mousse que l'on obtient après agitation. Le milieu de culture seul possède aussi des surfactants mais en quantité moindre. Il est spécifique au modèle cellulaire utilisé. Durant cette thèse, nous avons suivi les protocoles et les recommandations d'experts biologistes spécialistes des modèles utilisés.

Les cellules peuvent être considérées comme des particules élastiques baignant dans leur milieu de culture. Elles ont une densité légèrement supérieure à l'eau, qui implique une sédimentation dans des systèmes sans agitation. Leur concentration dépend du type cellulaire, et son optimisation est critique pour un bon développement. Elles consomment des nutriments et de l'oxygène dissous dans le milieu de culture et ne peuvent donc pas être trop nombreuses, sous peine de famine. Le terme employé pour la limite de concentration supérieure est la confluence. Elles émettent de nombreux facteurs pour orienter et stimuler leur développement et ne peuvent donc pas être trop peu nombreuses sous peine de mourir de solitude.

Les cellules ont besoin de conditions atmosphériques bien précises et contrôlées, en température (37°C), en composition (5% CO₂) et en humidité (proche de 100%). Ces conditions sont réunies dans des étuves ou incubateurs.

Enfin les cellules, notamment les cellules adhérentes, sont très sensibles au substrat sur lesquels elles sont disposées. Ce point fera l'objet d'une attention plus particulière dans le chapitre 2.1.

Chapitre 1 : Culture de cellules en gouttes

Toutes ces conditions doivent être réunies pour permettre des tests représentatifs et adéquats sur des cultures cellulaires, en dehors de tout ajout d'autres réactifs nécessaires à l'étude. Elles doivent être prises en compte très sérieusement dans toute tentative de miniaturisation.

1.5.2 Du puits à la goutte

En conservant le format de la microplaque, la miniaturisation conduit au confinement d'un liquide par des parois qui se trouve vite limité par des effets de capillarité et de praticité que nous avons décrits plus haut (chap. 1.1.2.2). En enlevant ces parois, on en vient tout naturellement à considérer une goutte liquide [47-De Gênes], qui a été qualifiée de « puits virtuel » [48-Garyantes].

Un format matriciel permet de conserver l'aspect parallèle des traitements et leur globalisation sur un système (puces à ADN par exemple). Tous les plots de la matrice peuvent être traités simultanément et sont considérés comme des bioréacteurs indépendants. Cette approche a été utilisée dans de nombreux domaines [50-Berejnov, 53-Hung, 52- Gillmor].

A des dimensions proches de la limite de capillarité (de l'ordre du micromètre), les gouttes liquides sont très stables et leur comportement est gouverné essentiellement par des effets surfaciques. Elles peuvent être confinées en des positions très précises sur une surface solide par des effets de tensions de surface. Les gouttes sont disposées sur des emplacements hydrophiles entourés d'un environnement hydrophobe (couche mince sur le solide par exemple). Si l'on prend l'exemple d'un plot de 500 μ m hydrophile entouré d'une couche hydrophobe (angle de contact avec l'eau de 110°) on obtient des volumes de gouttes de l'ordre de 100 nl (voir chap. 2.1 pour une description plus détaillée)

Ce format permet de contourner de nombreux inconvénients des microplaques. La goutte n'est en contact avec le solide que sur une petite partie de sa surface. Les échanges gazeux sont donc améliorés, ce qui permet en plus un contrôle renforcé de l'évaporation. La goutte étant moins liée au solide, les mouvements des molécules à l'intérieur du réacteur qu'elle constitue sont facilités (mouvements de convection thermique par exemple), la rendant plus efficace. Enfin la miniaturisation autorise l'utilisation de très peu de réactif souvent précieux ou cher.

Cette technologie de puce à cellules en gouttes a été développée par le laboratoire Biopuces à partir de 2002 par l'équipe de B. Schaack [49- Schaack] et représente la base de ce travail de thèse. Elle sera discutée de manière plus précise dans les paragraphes 1.8 et 2.1

1.6 Miniaturisation des échantillons cellulaires : notion de plot

Lorsque le concept de plot est transposé à la cellule vivante, il permet l'étude du fonctionnement des cultures dans différentes conditions. La même notion de plot se traduit par un rassemblement de cellules dans un endroit bien délimité d'un dispositif plus large, qui peut être traité globalement. De nombreuses possibilités techniques sont disponibles ou en cours de développement pour réaliser ce genre de dispositif. Nous ne chercherons pas à être exhaustif mais à donner un aperçu du florilège de puces à cellules qui se développe [62-Nianzhen Li].

La grande majorité de ces systèmes utilisent des traitements de surface pour accrocher sélectivement les cellules et ainsi former des plots. Pour garder les cellules en vie, ils immergent les dispositifs dans du milieu de culture, faisant ainsi appel à un principe identique à la méthode de transfection inverse. Les différentes conditions sont apportées exclusivement

Chapitre 1 : Culture de cellules en gouttes

par la surface [54-Otsuni, 58-Revsin]. Elles conduisent à l'exploration de transfections [31-Sabatini, 55-Xu], de l'attachement cellulaire [56-Delehanty, 57-Thery] ou bien de toxicité [59-Chen, 60-Fukuda]. La présence du milieu de culture sur toute la surface de la puce empêche de traiter sélectivement ou localement les plots de cultures cellulaires par un réactif après le dépôt des cellules, car celui-ci serait répandu sur toute la puce. De la même manière il est discutable de traiter les plots par des réactifs hydrosolubles, puisque lors de l'ajout de la culture cellulaire en globalité sur le système, ces réactifs seront dissous dans le milieu et contamineront l'ensemble des plots. Sabatini et al. [31-Sabatini] contourne ce problème en utilisant de la gélatine qui touche les cellules seulement localement. De manière à proposer cette dimension supplémentaire de multiplexage, il convient d'individualiser chaque plot de culture cellulaire d'un point de vue fluïdique. Le format de la goutte permet cette indépendance.

Par ailleurs, la miniaturisation peut aussi s'entendre comme la diminution de la taille du système étudié. Du corps humain dans sa globalité, nous sommes aujourd'hui passés à l'étude des molécules qui le composent. L'analyse de la cellule en tant que système dans des dispositifs miniaturisés a été rendue possible par les avancées techniques de la microfluidique : l'utilisation de micro-canaux permet de conduire des cellules seules dans des zones de mesures adaptées [63-Goto]. Nous ne nous attaquerons pas à une revue de ces systèmes qui sont assez éloignés de nos considérations. Leur débit en terme de conditions de culture par expérience est assez faible (puce Agilent avec 8 puits par exemple, Figure 7) du fait du traitement en ligne de chaque cellule, qui ne se compare pas avec la globalité des traitements de matrices de plots. Par ailleurs ces méthodes ne permettent pas de valider la morphologie des cellules dans les microsystèmes ; or celle-ci est un paramètre fondamental pour les biologistes lors de l'évaluation de la santé de leurs cellules. De plus le fait de mesurer des paramètres sur une cellule en dehors de son contexte de population n'a pas réellement de sens biologiquement.



Figure 7 : puce à cellules microfluidique Agilent (Bioanalyser 2100) - 8 canaux (tirée de <http://www.chem.agilent.com/>)

Une technique qui rassemble ces deux approches (matrice de surface et mesure à la résolution de la cellule) a été développée par M. Thery et al. [57-Thery]. Par micro-traitement de la surface servant de support aux cellules, il est possible d'étudier comment la forme de la cellule influe sur le phénomène de division cellulaire. Des plots de différentes géométries constitués de matrice extra-cellulaire servent d'ancres aux cellules déposées par-dessus. La forme du plot va influencer sur la forme de la cellule après attachement : il s'agit d'un contrôle à la cellule près. Toutes sortes de phénotypes peuvent ensuite être testés comme résultant d'une modification de la morphologie cellulaire, si l'on crée une matrice de plots de géométries différentes sur un même substrat. Les cellules sont toujours en population (tapis cellulaire) mais sont étudiées une à une. Par contre le fait que la morphologie influe sur le phénotype doit être pris en considération pour toute autre expérience. Il est par exemple possible d'utiliser cette technique pour synchroniser le développement cellulaire, mais cette synchronisation pourrait avoir un effet sur le phénotype.

1.7 Renforcer la pertinence des analyses cellulaires : le haut contenu

De nombreux tests réalisés sur des cultures cellulaires suivent le même schéma. Dans un premier temps les cellules sont stimulées (par un candidat médicament par exemple). En réponse à cette stimulation des changements s'opèrent dans la culture, généralement dans les premiers jours de la culture. Dans un deuxième temps, ces modifications sont enregistrées à la fin de cette stimulation par exemple par une analyse au microscope. Aujourd'hui la cellule est encore un objet trop complexe pour pouvoir évaluer l'effet de la stimulation sur tous ses composants. Selon l'hypothèse effectuée sur le système, une fenêtre de lecture est donc choisie. Cette étape sera appelée phénotypage puisqu'elle permet de vérifier le phénotype des cellules.

Actuellement une des méthodes les plus utilisées pour le phénotypage est le marquage fluorescent. Des molécules d'intérêt sont marquées par des composés qui émettent un rayonnement lumineux dans une gamme de longueurs d'ondes particulière après avoir été excités par un rayonnement différent. La fenêtre de lecture du phénotype peut se traduire dans le type de molécule utilisé : la viabilité des cellules peut par exemple être visualisée par le colorant Syto10 (Molecular Probes ref : S32704), la production d'une protéine particulière peut être quantifiée par un anticorps fluorescent spécifique.

Cette technique permet d'effectuer plusieurs analyses par expériences, en utilisant des composés qui réagissent dans des gammes de longueurs d'ondes différentes. Aujourd'hui on utilise généralement 3 (parfois jusqu'à 5) marqueurs différents, la spécificité des signaux lumineux ne permettant pas de complexifier davantage les systèmes. Sur ce point, on peut noter l'émergence de nouveaux marqueurs fluorescents, les quantum dots [78, 79-Alivisatos, 80-Michalet] qui pourront dépasser cette limitation puisque leur spécificité optique est très grande.

Pour évaluer la réponse d'une culture cellulaire à une stimulation, les analyses haut-débit classiques comparent l'intensité cumulée du signal fluorescent (la quantité de photons) émis par la culture stimulée à celle d'une culture témoin. Pour vérifier la significativité des comportements obtenus, les expériences sont conduites en trois ou quatre exemplaires : on compare les intensités moyennes par conditions sur les différents exemplaires séparés par leur variance. (Figure 8). On obtient donc une valeur moyenne caractérisant la population cellulaire dans son ensemble par condition de stimulation.

1.7.1 La culture cellulaire est un échantillon très hétérogène :

Dans les expériences sur des cultures cellulaires effectuées à l'échelle macroscopique, les échantillons sont considérés comme homogènes. Cette hypothèse permet en partie de considérer que les résultats obtenus sont reproductibles : toute population cellulaire placée dans les mêmes conditions (même stimulation par exemple) aura la même réponse, dans son ensemble. Or les comportements à l'échelle de la cellule sont fonctions de réactions biochimiques qui ne sont que des rencontres entre plusieurs molécules. Elles sont soumises à de grandes variations dues à l'environnement (fluctuations thermiques par exemple) [65-Spudich, 64-McAdams]. Même dans le cas où les comportements à l'échelle de la population sont reproductibles, une grande hétérogénéité est observable à l'échelle de chaque cellule. Le cycle cellulaire, la perméabilité aux drogues, les régulations de l'expression génétique sont autant de paramètres qui varient d'une cellule à une autre dans une culture [69-Levsky]. De

Chapitre 1 : Culture de cellules en gouttes

nombreux modèles stochastiques ont été proposés pour comprendre l'émergence d'un système robuste physiologiquement à partir de signaux largement issus du hasard [71-Meng, 70-Ko, 72-Raser].

La miniaturisation des techniques expérimentales implique de travailler avec des échantillons cellulaires contenant de moins en moins de cellules. Ces niveaux de volume (quelques microlitres, voir quelques nanolitres) pervertissent la valeur informative et la significativité des valeurs moyennes observées : l'hétérogénéité des cellules se fait sentir et deux populations placées dans les mêmes conditions n'auront pas strictement le même comportement pour les mesures concernées. Dans ce cas les analyses statistiques paramétriques employées jusqu'à présent ne sont plus adaptées (voir chapitre 3).

Loin d'être un inconvénient, l'hétérogénéité révélée par la miniaturisation constitue un objet d'étude en soi. La façon dont une stimulation peut gommer les variabilités de réponse à un médicament (dans la résistance à la chimiothérapie par exemple) pourrait constituer une aide thérapeutique. Parallèlement les processus de dispersion ou de canalisation des comportements pourraient sans doute nous apprendre beaucoup sur les mécanismes de régulation et de communication entre cellules.

Cette compréhension plus résolutive de la réponse d'une population cellulaire permet de valider les comportements des molécules testées de manière plus sûre. Ils pourront ainsi être transférés plus aisément vers des modèles plus complexes dans des expériences *in vivo*, en réduisant le nombre d'échecs à cette étape.

1.7.2 Analyse à l'échelle de la cellule unique :

Les outils d'imagerie conventionnels comme les microscopes à épifluorescence commerciaux sont capables d'obtenir des résolutions inférieures au micromètre dans des environnements non contraignants se prêtant bien à une utilisation haut-débit. Les appareils employés au cours de ce travail [87-Schaack] ont des résolutions allant jusqu'à 0.6µm/pixel et sont entièrement automatisés. Des avancées techniques permettent maintenant d'envisager des développements haut-débit dans des outils de microscopie confocale ayant une résolution supérieure (inférieure à 200 nm pour Leica INM 100 par exemple).

Sur les images obtenues, des logiciels de traitements d'images sont capables d'identifier et d'individualiser des « objets » cellulaires représentant des images virtuelles des cellules de la population photographiée. De nombreux logiciels de ce type sont disponibles. Pour une revue des performances, on peut se reporter à [73-Comley]. Ils reposent sur des algorithmes utilisant les mathématiques morphologiques. Une solution libre est aussi en cours de développement. (CellProfiler développé par le laboratoire de DM Sabatini [74-Wheeler, 75-Carpenter, <http://jura.wi.mit.edu/cellprofiler/>]). Cette méthode d'analyse offre la possibilité d'obtenir des informations sur chacun des membres d'une population.

De plus de nombreux paramètres peuvent être quantifiés sur chaque objet (cellule) identifié si l'on connaît son contour. Des paramètres morphologiques (aire, périmètre, rotondité, allongement), fluorométriques (intensités de fluorescence) ou de textures (répartition des intensités de fluorescence) rendent les mesures plus complexes et plus pertinentes. Le choix des marqueurs fluorescents utilisé est très important si l'on veut déterminer les contours d'une cellule (le marqueur Hoechst ne va que dans les noyaux, alors que la phalloïdine permet de marquer l'actine et d'obtenir des contours cellulaires). On ne compare plus des intensités de signaux moyennes mais des vecteurs de différents paramètres. Pour un marqueur de mortalité cellulaire rouge par exemple, une cellule morte n'est plus seulement rouge ; elle est rouge, petite, épineuse et ronde. On peut alors la différencier d'une cellule rouge mais étirée qui n'est pas morte. La différenciation plus fine entre différents types

Chapitre 1 : Culture de cellules en gouttes

d'objets estime de manière plus précise l'hétérogénéité de l'échantillon. Les images obtenues avec des appareils permettant un très fort grossissement rendent possible l'analyse des compartiments cellulaires (noyau, mitochondries, vésicules) et donc des mouvements des marqueurs fluorescents entre ces différents compartiments de manière quantitative.

Les études utilisant des techniques d'imagerie haute résolution et d'analyse d'images automatisées sont rassemblées sous le dénominateur de « criblage à haut-contenu » (« High Content Screening » ou HCS en anglais) [77-Taylor]

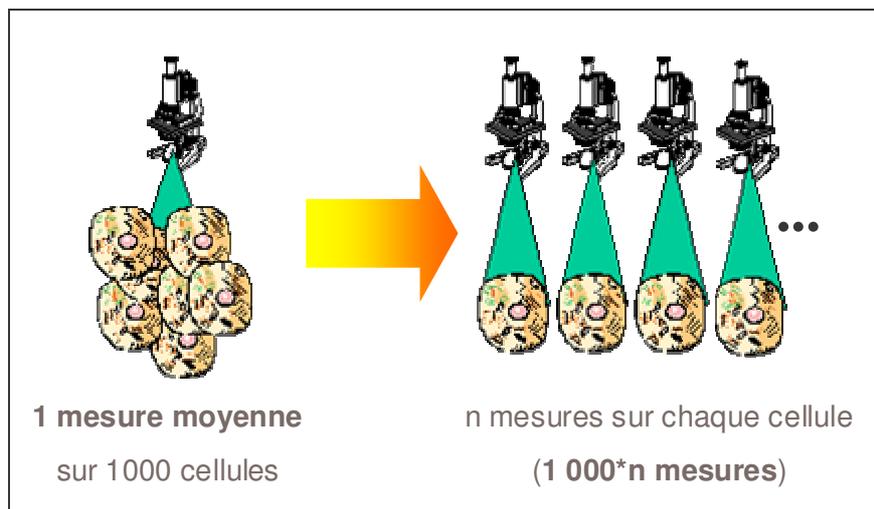


Figure 8 : Schéma de principe de l'analyse haut-contenu sur chaque cellule d'une population (figure par François Chatelain – CEA/Laboratoire Biopuces)

Cependant les méthodologies d'analyses complexes à plusieurs paramètres en sont encore à leurs balbutiements. Si le modèle cellulaire est bien maîtrisé, et qu'un certain nombre d'indicateurs éprouvés permettent de le caractériser, l'utilisation du haut contenu va permettre de mieux comprendre la significativité des résultats par l'analyse de distributions : pour un plot contenant 100 cellules pour lequel on analyse 4 paramètres discriminants, on obtient 400 valeurs à la place de 4 seulement en approche agrégée classique. Par contre, dans le cas où le phénotype est mal compris et que par les paramètres d'analyse des cellules sont mal définis ou inadaptés à la miniaturisation (comme le nombre de cellules par plots pour la mortalité cellulaire par exemple), il est impossible de corréliser la distribution de ce paramètre avec l'étude d'un phénotype. L'analyse haut contenu ouvre alors la porte à une approche exploratoire où l'ensemble des paramètres accessibles est pris en compte pour différencier significativement des cellules positives des négatives. Cela permettrait de faire ressortir des « marqueurs » inconnus, qui devront être ensuite compris biologiquement (par exemple pourquoi une cellule grossit-elle avant de mourir ?).

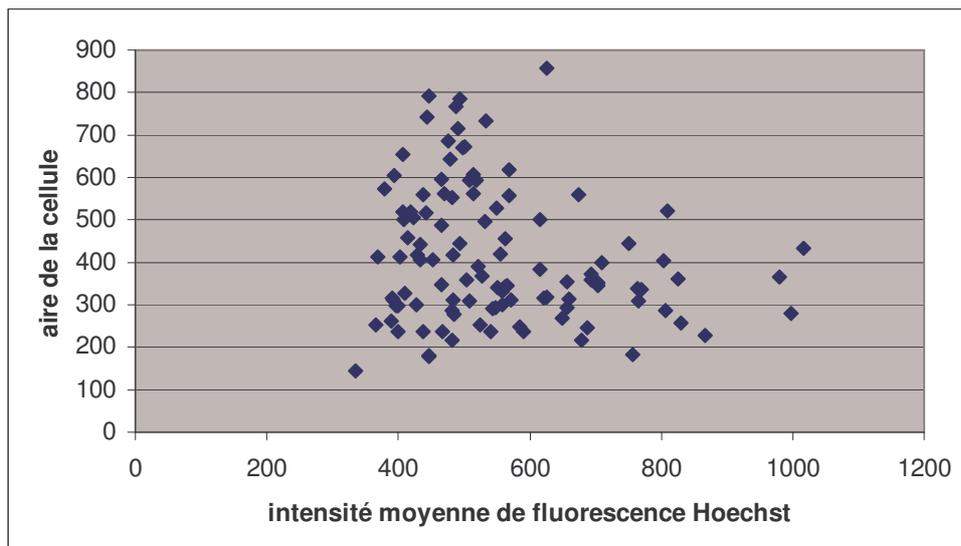


Figure 9 : Hétérogénéité des cultures cellulaires. 109 cellules U373 non stimulées dans un plot de 500 μ m de diamètre (voir chapitres suivants). On représente l'aire de chaque cellule en fonction de l'intensité moyenne de fluorescence du marqueur Hoechst (dans le noyau). La variabilité peut être évaluée par le rapport entre l'écart-type de la distribution du signal dans le plot et sa moyenne. Ce facteur est de 40% environ pour l'aire et de 20% pour le marquage Hoechst.

En tous les cas, l'analyse haut-contenu ne possède pas aujourd'hui de référent. Elle ne permettra de mettre à jour que des tendances qui devront être confrontées à des méthodes d'analyse plus classiques (tests en microplaques « standard » ou analyse statistique poussée). L'analyse par spectrométrie de masse intégrée peut se positionner comme un outil pour une recherche de marqueurs massiques, comme nous le verrons au chapitre 3.2.

Le haut-contenu intégré avec des dispositifs de puces à cellules a l'avantage de favoriser des analyses haut-débit, parallèles et miniaturisées sur des échantillons représentatifs des comportements complexes impliqués en biologie. En ce sens ils répondent aux exigences de la recherche en biologie de l'ère post-génomique. La technologie de culture de cellules en micro-gouttes sur support solide s'avère être particulièrement bien adaptée pour relever ces défis. Dans la suite de ce document nous allons décrire plus précisément une mise au point technique d'un tel dispositif.

1.8 Micro-gouttes et transfection

Ce chapitre aborde la preuve de faisabilité du dispositif inventé par le laboratoire Biopuces et dont les caractéristiques ont été détaillées. Il s'appuie en grande partie sur la publication « A « DropChip » Cell Array for DNA and siRNA Transfection Combined with Drug Screening » (Béatrice Schaack et al., Nanobiotechnology, vol. 1, issue 2 (2005), pages 183-189, référence 87, redonné en annexe A de ce manuscrit). Certaines précisions absentes de la publication seront explicitées, mais dans le souci d'éviter les redondances nous n'insisterons pas sur les points déjà largement discutés. Notamment différentes expériences de transfusions ont été réalisées, nous ne présenterons que les résultats concernant la sur-expression de protéines recombinantes, que nous appellerons génériquement « transfusions » par la suite.

1.8.1 Principe

Les puces à cellules initiales sont constituées de :

- ↪ gouttes de cultures cellulaires. Dans un premier temps, des volumes de l'ordre du microlitre pour faciliter la dispense manuelle et la visualisation. En effet, même si la nécessité du haut-débit est présente dès le départ dans les caractéristiques de l'innovation, la somme des investissements nécessaires à sa mise en place a posé d'emblée le besoin d'un test de faisabilité qui puisse être effectué avec des technologies directement disponibles dans un laboratoire (le pipettman pour la dispense de liquide par exemple) et donc macroscopiques et bas-débit.
- ↪ un substrat plan qui recueille les gouttes sur un format de lame de verre classique, qui peut s'intégrer de manière évidente dans les plateformes d'analyses existantes (scanners et microscopes).
- ↪ une interface hydrophobe/hydrophile qui maintient les gouttes dans leur position précise sur le substrat.

Ces dispositifs permettent :

- ↪ des conditions de culture satisfaisantes (volume constant, échanges gazeux, température, CO₂) au sein d'un incubateur,
- ↪ une survie des cellules pendant plusieurs jours,
- ↪ des observations au microscope à fluorescence,
- ↪ de rajouter des réactifs pour la stimulation au cours de l'expérience.

1.8.2 Description du substrat

Comme discuté plus haut (chapitre 1.5), un plot hydrophile (surface de verre par exemple) entouré d'une couche hydrophobe permet de maintenir dans une position déterminée des gouttes suffisamment petites. Ce genre de propriété était déjà utilisé pour séparer des réacteurs en immuno-histochimie (marquage cellulaire par anticorps). Des substrats adéquats existent commercialement (« lame pour immunofluorescence super Téflon® », référence VWR 631-0785).

Il s'agit de lames dont le format est standardisé (76×26mm) pour des applications d'imagerie en utilisation avec un microscope à fluorescence, ou un scanner (« ProScanArray Microarray Scanner » commercialisé par Perkin Elmer entre autres) pour les puces à ADN par exemple. Ce format a aussi été utilisé en première approche pour les puces à transfection inverse [31 - Ziauddin]. Le verre dont elles sont constituées est un matériau connu pour sa biocompatibilité vis-à-vis de la plupart des cultures cellulaires.

La planéité du substrat permet d'envisager des traitements parallèles en trempage dans des solutions d'intérêt (marquage fluorescent et lavages par exemple). Les dimensions (40 plots de 2 mm) s'adaptent assez bien à des expériences bas-débit (10 conditions en quatre exemplaires par exemple) et permettent une visualisation des plots rendant aisée la dispense manuelle (un plot de 2mm de diamètre peut être visé sans trop d'efforts à l'aide d'une pipette).

Enfin la couche rouge de Téflon®, inerte chimiquement et non mouillable (angle de contact avec l'eau au-delà de 100°) permet d'obtenir des gouttes de l'ordre de 5 µl sur le plot de 2 mm (soit un angle de contact de 115° environ[†]) tout en évitant les contaminations croisées. Par ailleurs l'équipe de C. Guillouzo (INSERM U522, Rennes) a vérifié que ce substrat n'était pas toxique pour des cultures d'hépatocytes primaires de rat.

[†] Formule de calcul en annexe c

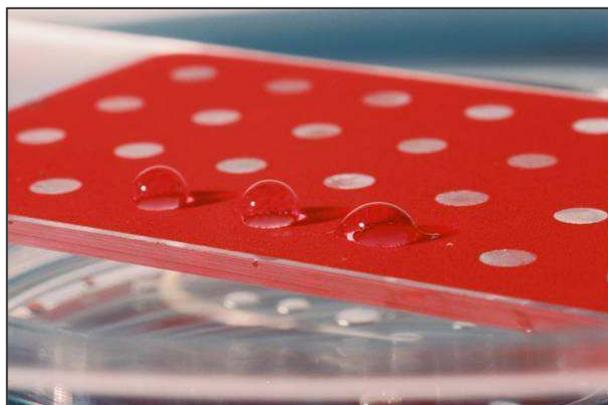


Figure 10 : Gouttes de 5 μ l sur lame pour immunofluorescence super Téflon®

Les gouttes obtenues permettent l'utilisation d'une surface libre avec l'air plus importante que pour les microplaques classiques (tableau ci-dessous - Tableau 1). Cette configuration ouverte permet d'envisager des échanges gazeux optimisés, garant d'une bonne santé des cultures cellulaires.

Dispositif	Diamètre du réservoir (mm)	Volume utilisé (μ l)	S_1 (μ l/mm ²)	S_2 (mm ² / μ l)
Plaque 96 puits	6,4	100	3,11	0,32
Plaque 384	3,2	50	6,22	0,16
Plaque 1536 (a)	1,6	5	2,49	0,40
Plaque 1536 (b)	1,6	3	1,5	0,66
Lame Prolabo (40 plots)	2	5	1,59	1,26
DropChip*	0,5	0,1	0,51	38,36

Tableau 1 : Caractéristiques géométriques des substrats de culture cellulaire.

Le dispositif macroscopique décrit plus particulièrement dans ce chapitre (représenté Figure 10) est indiqué par l'encadrement rouge.

S_1 = Volume utile / surface de culture

et S_2 = Surface libre en contact avec l'air ambiant / Volume utile

Explications Figure 11 ci-dessous

Le rapport S_1 lié à la disponibilité du milieu de culture (et donc à la survie cellulaire) est optimal pour les plaques 384 puits. Le volume fixe dans les gouttes va être une contrainte importante pour le développement des cultures cellulaires. Au contraire, le rapport S_2 est optimal pour les substrats miniaturisés qui permettent des échanges gazeux optimisés.

* le substrat miniaturisé (DropChip) décrit dans la publication en référence, dont nous mentionnons certaines caractéristiques dans ce tableau, sera présenté et discuté dans les chapitres 2 et suivant.

(a) et (b) représentent deux utilisations différentes d'une même plaque 1536 suivant les pratiques de chacun. Les changements observés donnent une idée de l'importance du volume dans ces valeurs.

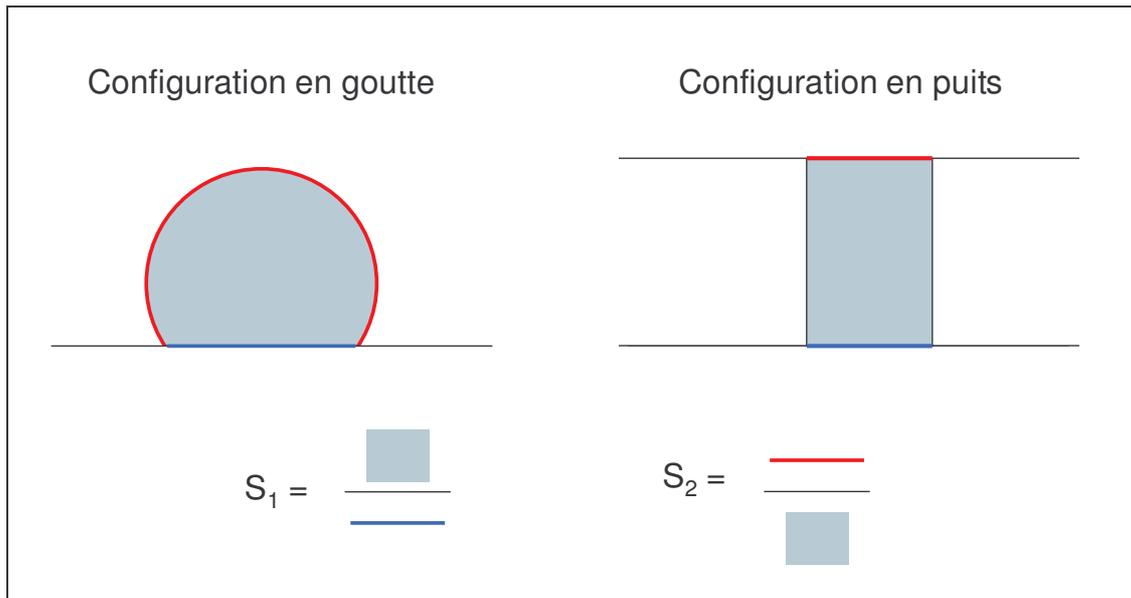


Figure 11 : Rapports surface-volume en puits et en goutte

Par ailleurs, le rapport de surface en contact avec le solide est très favorable à des mouvements de convection au sein de la goutte. Celle-ci n'est en effet pas soumise aux contraintes d'adhésion du liquide aux parois que l'on observe dans les puits. Les mélanges en sont favorisés (plus rapides, plus homogènes), ce qui fait de la goutte un réacteur biochimique très efficace (Figure 12).



Figure 12 : fusion d'une goutte de bleu trypan et d'une goutte d'eau de 5 μ l, 40ms après contact. Des mouvements de convection du colorant apparaissent. (Travaux effectués avec Olivier FUCHS (CEA/LETI), 'Microdroplets coalescence using electrical forces' au colloque d'hydrotechnique/172/2002-12-03/Toulouse FRA)

L'absence de parois de soutien ne permet pas d'augmenter le volume de milieu de culture pour atteindre la disponibilité permise par les puits (rapport S_1). Les mouvements dans la goutte contrebalancent cet effet : le volume théoriquement disponible par unité de surface au sol (donc par cellule lorsqu'elles sont adhérentes) est plus faible que pour les plaques à puits, mais se met en mouvement plus facilement et est finalement plus accessible pour les cellules.

Cela pourra avoir une influence sur les concentrations cellulaires utilisables dans les dispositifs de puces. Les cellules consomment les ressources du milieu de culture, qui doit être changé avant épuisement pour des expériences de plusieurs semaines. Sur les puces, le volume de milieu de culture est limité par les forces des tensions de surface. La quantité de cellules utilisables sans avoir à changer le milieu dépend donc étroitement de la durée de l'expérience et de la vitesse de croissance des cellules. Une optimisation est nécessaire pour trouver le bon compromis entre concentration cellulaire, prolifération et volume de goutte. Nous verrons des effets flagrants de la concentration cellulaire sur la prolifération lors de l'utilisation de nanogouttes de cultures cellulaires (chapitre 2.2.4.4.2)

1.8.3 Système d'incubation en vapeur saturante

Les échanges gazeux avec l'air ambiant étant favorisés et l'atmosphère grenobloise étant relativement sèche (30% d'humidité pour une météo normale au printemps), l'évaporation devient un phénomène prédominant dans la physique des gouttes de cultures cellulaires. L'évaporation est un phénomène complexe mais bien modélisé depuis 50 ans [81-Hardy, 84-Birdi, 85-Erbil, 86-Rowan]. D'un point de vue général, il s'agit d'un flux d'eau (gaz H₂O) d'une source vers l'air ambiant au niveau des surfaces libres, gouverné par la diffusion. Dans les modèles décrits, les surfaces de gouttes liquides sont considérées comme étant recouvertes d'une couche d'air saturée en eau. Pour une goutte disposée sur un support solide non poreux, des contraintes géométriques [82-Picknett et Bexon] et physiques au niveau de la ligne triple d'ancrage apparaissent et rendent le phénomène un peu plus compliqué [83-Deegan]. Quelques approches permettent de fixer des ordres de grandeurs pour saisir toute l'importance que l'évaporation va jouer pour la survie des gouttes de cultures cellulaires.

Par exemple des gouttes de 5 µl à 22°C à l'ambiante vont disparaître en 45 min [84-Birdi]. Dans les enceintes stériles de manipulation dans laquelle les flux d'air sont augmentés, nous avons remarqué que cette évaporation était encore plus rapide. Pour des gouttes d'un diamètre de l'ordre de 500µm avec un angle de contact de 90°, l'évaporation est constante au cours du temps avec une diminution de la hauteur de la goutte de $5,55 \cdot 10^{-4}$ mm/s pour une température de 21.5°C et une humidité de 55% [86-Rowan]. La survie de la goutte va donc durer environ 900s (15 min). Ces considérations ont déjà été abordées par Garyantes et al. [48-Garyantes], qui a testé l'influence de la salinité et de la température sur le temps de disparition des gouttes.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les cellules ont besoin d'un milieu de culture avec des composants en concentrations très précises. Celles-ci ne peuvent être maintenues dans des conditions atmosphériques normales. Pour contrer l'évaporation il faut réduire la diffusion à travers la surface de la goutte, ce qui revient à créer une atmosphère de vapeur saturante au moins localement. Le dispositif présenté Figure 13, que nous appellerons « TOC 2 », remplit cette charge. Il est constitué d'une grande boîte de Pétri de 10 cm de diamètre qui permet de créer un système stérile, dans laquelle on dispose 10ml de PBS (pour « phosphate saline buffer » en anglais, « tampon salin phosphate » en français) pour former un lit d'une épaisseur d'environ 1,5 mm sur toute la surface de la boîte. La puce est placée sur le fond d'une petite boîte de Pétri de 3 cm de diamètre et affleure le liquide. La grande boîte de Pétri permet de limiter les pertes d'eau vers l'air ambiant sans les stopper complètement, pour garder des conditions de cultures adéquates tout en créant une atmosphère où le pourcentage d'humidité est proche de l'équilibre. A l'aide de ce système, des cultures de cellules HeLa ont été gardées 7 jours en conditions de survie. Les gouttes peuvent être conservées au moins 15 jours sans modification de leur taille visible à l'œil nu.

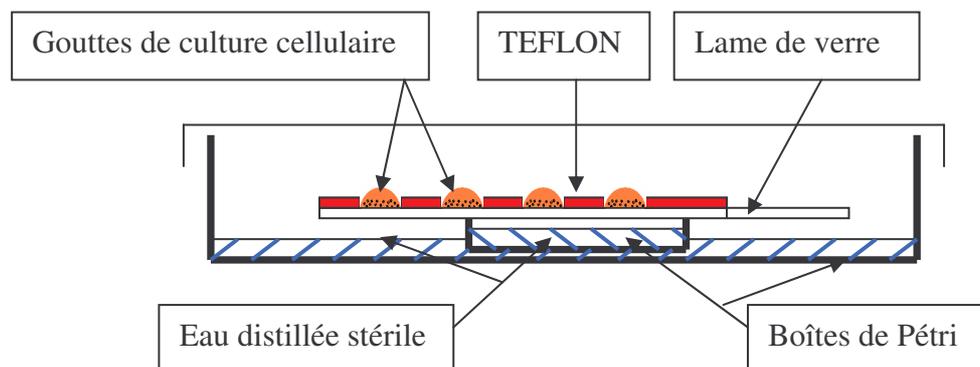


Figure 13 : schéma du principe d'un dispositif vapeur saturante appelé « TOC2 ».

1.8.4 Preuves de faisabilité : multi-transfections d'ADN recombinant.

Pour vérifier la viabilité et la fonctionnalité des cellules cultivées sur ces substrats, l'équipe Phénopuces a conduit de nombreuses expériences de transfections sur différentes lignées cellulaires. Pour une description détaillée de ces expériences et de leurs résultats, le lecteur pourra se tourner vers la référence [87-Schaack] reprise en annexe de ce document (page 173).

Ces expériences nous permettent de vérifier que les cellules sont capables d'exprimer une grande quantité de protéines recombinantes. De plus, elles démontrent que le système de puces à cellules en gouttes est adapté à la réalisation de transfections, qui représentent un outil essentiel de la recherche en biologie [87-Schaack].

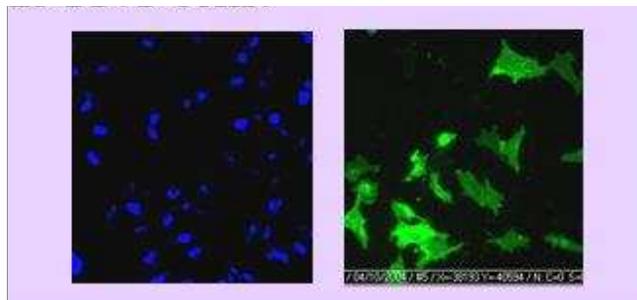


Figure 14 : Exemple de cellules HEK transfectées. Elles sont toutes marquées au Hoechst (en bleu sur la photo de droite), mais seulement une partie est transfectée (expression d'une fluorescence verte dans la membrane cellulaire – image de droite). Le rendement de transfection est le nombre de cellules vertes divisé par le nombre de cellules marquées au Hoechst.

Enfin nous avons aussi montré la possibilité de transfecter plusieurs protéines dans une même culture. Le système ajoute donc une possibilité de multiplexage (stimulation par une combinaison de plusieurs facteurs en une seule expérience), qui permet d'envisager des utilisations dans les processus de découverte de nouveaux médicaments. Par exemple, une drogue peut être testée en combinant des transfections de plusieurs gènes afin d'exprimer plusieurs protéines pour étudier leur influence sur son mécanisme d'action.

Le technologie de puces à cellules en micro-gouttes (5µl de culture cellulaire) représente un outil adapté aux expériences bas débit (40 plots par puce). Elle permet en outre de bien appréhender les contraintes et les avantages liés à la culture de cellules en gouttes, en utilisant une technique facile à mettre en œuvre pour laquelle les outils de biologie moléculaire classiques suffisent.

Les cultures cellulaires se comportent de manière sensiblement identique à des conditions standard en puits ou en boîte de Pétri, et des expériences de transfections efficaces ont pu être conduites.

Toutefois il ne s'agit pas en soi d'une avancée technologique majeure, qui se compare difficilement aux plaques à puits existantes. Cette étape intermédiaire valide le concept de la culture en goutte et permet d'envisager la miniaturisation de la technologie de manière sereine. Les micro-gouttes permettront par la suite de tester l'implication du format goutte dans les résultats obtenus et de préparer des expériences miniaturisées à moindre coût.

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

Chapitre 2

Réalisation de « nano-gouttes »

2.1 Des substrats optimisés :	44
2.1.1 Cahier des charges :	44
2.1.2 Stratégie développée au laboratoire Biopuces : monocouches auto assemblées	47
2.1.2.1 Principes : SAM et silanes.....	47
2.1.2.2 Création d'une matrice de spots hydrophiles	50
2.1.2.3 Performances et limites :	51
2.1.3 Stratégie Ultrahydrophobe :	52
2.1.4 Impression par micro-contact	54
(« microcontact printing », μ CP, ou « stamping » en anglais).....	54
2.1.5 Stratégie industrielle de silanisation en phase liquide :	54
2.1.5.1 Description du protocole transféré :	55
2.1.5.2 Performances :	56
2.1.5.2.1 Biocompatibilité :	56
2.1.5.2.2 Comportement des gouttes.....	57
2.1.5.2.3 Test de validation : premières transfections.....	61
2.1.5.3 Améliorations	64
2.2 Robotisation de la formation de nanogouttes de culture cellulaire	66
2.2.1 Cahier des charges	66
2.2.2 Choix de la technologie optimale : dispense piézo-électrique	67
2.2.2.1 Seringues et Capillaires	68
2.2.2.2 Pointes et contacts	68
2.2.2.3 Dispense sans contact :	69
2.2.2.4 Perspectives : éjection acoustique	70
2.2.3 Prototype et modifications.....	71
2.2.4 Mise en place du sciFLEXARRAYER : 1ers résultats	74
2.2.4.1 Calibrages	74
2.2.4.2 Validation : premiers essais de transfections automatisées.....	79
2.2.4.3 Optimisations.....	81
2.2.4.3.1 Lavages	81
Bulles d'air.....	81
Etat de surface des pipettes :	81
2.2.4.3.2 Automatisation poussée	82
Evaluation de la dispense en ligne	82
Boucles de contrôles et de lavage.....	83
2.2.4.4 Spécificités des cultures cellulaires :	84
2.2.4.4.1 Amas cellulaires.....	84
2.2.4.4.2 Viabilité/Prolifération.....	85

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

Miniaturisation des substrats et automatisation de la dispense de gouttes de cellules

2.1 Des substrats optimisés :

La miniaturisation de la technologie de culture de cellules en gouttes met en jeu plusieurs éléments dont nous allons détailler la mise au point indépendamment pour les intégrer par la suite dans un système complet. Tout d'abord, réduire la taille des gouttes à quelques centaines de nanolitres impose le développement d'un substrat spécifique pouvant les recevoir. Ensuite, les pipettes manuelles ne sont pas adaptées à de tels volumes et ne permettent pas un débit suffisant pour les applications envisagées, elles devront être remplacées par un système automatisé. En outre, les caractéristiques physiques de ces dispositifs induisent des contraintes sur les protocoles de culture et de stimulation des cellules ainsi que sur les matériels et les méthodes utilisés pour révéler et analyser les phénotypes. Enfin avec la diminution de volume, l'évaporation joue un rôle prédominant dans le comportement des gouttes et des cellules qu'elles contiennent. Dans ce chapitre nous nous intéresserons aux dispositifs physiques permettant d'obtenir des gouttes de cellules. Les points suivants seront développés dans les chapitres 3 et 4. L'influence et le contrôle de l'évaporation seront discutés pour chaque élément technologique.

2.1.1 Cahier des charges :

Les contraintes imposées aux substrats de culture cellulaire en gouttes sont reprises ci-dessous :

✓ Dimensions :

L'intégration dans des outils de détection classiques (microscopes, scanners) reste une priorité et impose le **standard « lame de verre »** (26×76×1mm) comme support des puces. Par ailleurs les expériences de biologie ont une grande variabilité, due par exemple aux comportements des cultures cellulaires. Les conditions sont souvent répétées trois ou quatre fois sur le même support pour vérifier la reproductibilité et la véracité statistique des résultats obtenus. Nous choisirons de prendre en compte quatre exemplaires par conditions dans le design des puces.

Paralléliser un grand nombre d'expériences est la caractéristique principale du haut-débit auquel ces puces sont destinées. Les caractéristiques des microplaques, qui utilisent 96 ou 384 puits, semblent justifier de lancer des expériences sur **100 plots indépendants en quatre exemplaires**. Cela correspond à 400 plots sur une puce, ce qui permettra de comparer les comportements obtenus avec le référent microplaque avant de pousser plus loin les possibilités de haut-débit (1200 plots sur une lame de verre par exemple). Les puces pourront par exemple tester 3 molécules à 3 concentrations sur 10 lignées cellulaires. Pour d'autres exemples de plan d'expériences possibles, on peut se référer au chapitre 4.

Les cellules de lignées classiques (HeLa ou NIH 3T3 par exemple) mesurent de 10 à 50 μm de diamètre lorsqu'elles sont attachées à une surface (Figure 33). Pour avoir une représentativité correcte de la culture, une population **d'une centaine de cellules** semble raisonnable (pour des considérations statistiques, il s'agit déjà d'un « grand nombre »). Cela nous donne un diamètre d'un plot de cellule (surface du substrat en contact avec la goutte) de

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

100 à 500 μm (dans une approximation où les cellules sont carrés et jointives, ce qui est loin de la vérité mais donne un ordre de grandeur correct) Pour des raisons de simplicité nous choisirons **un diamètre de 500 μm** .

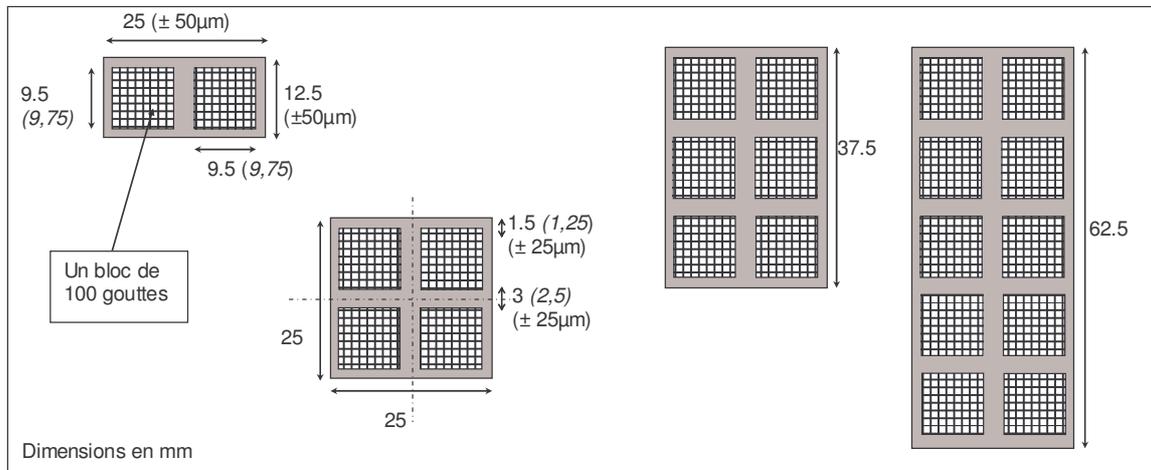


Figure 15 : Exemples de designs de dispositifs de puces à cellules contenant plusieurs blocs de 10x10 plots hydrophiles dans un format « lame de verre » standard sur au moins une dimension. Les blocs de 10x10 plots hydrophiles sont répartis en 2 colonnes.

Les contraintes de tensions de surface sur les gouttes de liquide à ces dimensions imposent une forme en calotte sphérique [89-Li, 90-Mouette]. Cela correspond à un plot circulaire. Une forme polygonale (un carré par exemple) ne serait pas recouverte entièrement par la goutte. Pour minimiser ces effets, nous utiliserons des **plots ronds**.

✓ Interface hydrophile/hydrophobe de positionnement

Le couple formé par le plot hydrophile et la couche hydrophobe l'entourant doit être caractérisé par la différence la plus grande possible entre les angles de contact d'une goutte d'eau sur la surface de chaque composé. Cela permet un attachement robuste de la goutte à la ligne triple : plus les angles de contacts sont différents, plus les forces de tensions à la ligne triple sont grandes [47-De Gênes]. Cela conduit à **un angle de contact élevé** à l'interface entre les deux composés, maximisant ainsi le rapport S_1 (volume de la goutte/surface du plot).

Dans la continuité du format lame de verre, et afin de paralléliser les traitements chimiques sur les puces (par trempages par exemple) le substrat doit être **relativement plan**. La différence d'épaisseur des deux composés hydrophile et hydrophobe doit être minimale. Les inconvénients rencontrés avec les microplaques quant aux contaminations croisées et à l'inefficacité des mélanges pourront être évités. Trois possibilités sont envisageables a priori. Elles sont décrites dans la figure ci-dessous (Figure 15).

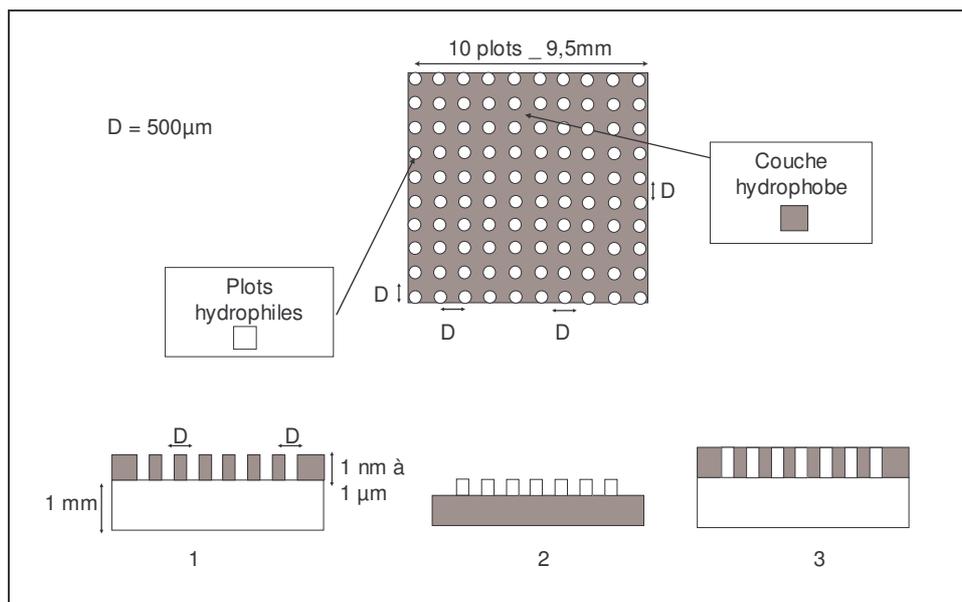


Figure 16 : 3 possibilités de designs de l'interface hydrophobe/hydrophile pour des plots de 500µm séparés par 2 fois leur diamètre. En bas, (1) la couche hydrophobe est trouée au niveau des emplacements des plots, laissant apparaître la surface hydrophile. (2) les plots sont créés par l'ajout d'ancres hydrophiles au-dessus d'une surface entièrement hydrophobe. (3) la surface de verre est recouverte alternativement de composés hydrophobes et de composés hydrophiles au niveau des plots.

Dans une optique d'évolution des dispositifs de puces à cellules en gouttes et en s'inspirant du format de « transfection inverse » et de la puce à ADN, **la surface hydrophile doit pouvoir être fonctionnalisée facilement**. Le greffage réversible de molécules d'acides nucléiques directement sur la surface (avec les technologies de puces à ADN, photogreffage) pourrait être envisagé. Elles seraient relâchées dans la goutte de culture cellulaire à un moment déterminé. Les deux avantages principaux de cette méthode sont le contrôle temporel de la transfection et le stockage de puces déjà fonctionnalisées. Une autre possibilité de traitement pourrait être l'accrochage de molécules influençant les propriétés d'adhérence des cellules, soit pour étudier celles-ci [95-Cox, 108-Kane], soit pour mieux accrocher les cellules. De cette façon les cellules non adhérentes (lymphocytes T par exemple) peuvent être ancrées avec de la poly-L-lysine (Sigma-Aldrich P4707).

Les **traitements physico-chimiques** imposés au substrat (lavages, marquages, stérilisation) doivent pouvoir être supportés sans dégradation des matériaux ou de leurs propriétés. En particulier un processus de stérilisation (éthanol 70° pendant 20 min ou autoclavage avant le dépôt des gouttes de cellules par exemple) doit pouvoir être appliqué sans endommager les propriétés des surfaces recueillant les gouttes.

Ensuite les matériaux utilisés ne doivent pas induire de fluorescence supplémentaire parasite (par adsorption aspécifique au substrat par exemple) dans le cas où une imagerie par fluorescence quantitative est utilisée pour révéler les phénotypes cellulaires. D'une manière générale, **le substrat ne doit pas conduire à une diminution du rapport signal/bruit** lors des observations des comportements des cellules par rapport à des substrats standards (plastiques ou verre par exemple).

Enfin les applications de haut-débit nécessitent un certain degré d'automatisation qui n'est pas possible sans **une précision et une reproductibilité de la géométrie du design des puces**. Les gouttes doivent être situées à des emplacements constants de puce à puce pour que leurs traitements puissent être automatisés (dispense de gouttes ou imagerie par exemple).

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

✓ Biocompatibilité

La biocompatibilité des substrats peut s'entendre de deux façons plus ou moins restrictives selon les expériences effectuées. Premièrement, les cellules doivent évidemment survivre sur le substrat pour la période de l'expérience en l'absence de tout traitement spécifique (contrôles négatifs). Deuxièmement, **leur comportement en dehors de toute stimulation doit être conforme à celui observé dans des conditions standard de culture** (en boîtes de Pétri, ou bien en microplaques par exemple). Plus particulièrement, les cellules doivent pouvoir proliférer au moins autant sinon plus que dans des plaques à puits. Pour certains modèles (différentiation par exemple) la prolifération est arrêtée, le point de contrôle de la conformité des cellules doit alors être redéfini (marqueurs de fonctions par exemple).

Cette contrainte n'est pas spécifique au substrat et pourrait s'appliquer à tous les éléments de la technologie de manière indépendante. Pour cet élément précis, d'un point de vue « éthique », elle doit être évaluée indépendamment du format de culture en goutte ou bien de la dispense, plus particulièrement en immersion du substrat dans la culture cellulaire. Pour une discussion plus approfondie de l'influence de la technologie sur le modèle cellulaire et son acceptabilité, on peut se reporter à son analyse pour la dispense automatisée au paragraphe 2.2.

D'autres fonctionnalités comme l'ergonomie (prise en main, identification des puces par exemple) peuvent être prises en compte dans une optique d'industrialisation. Bien que ne faisant pas l'objet de ce travail de recherche, certaines ont été étudiées pendant les phases de validation de la technologie.

Les contraintes énumérées ci-dessus correspondant à un bon fonctionnement du substrat laissent encore la place à nombre de techniques de fabrication. Loin de faire une description exhaustive de toutes les possibilités, la suite de ce paragraphe s'attache aux techniques que nous avons testées sur la base de ce cahier des charges. D'autres paramètres comme le coût ou la disponibilité nous ont été imposés et seront pris en compte dans l'évaluation.

2.1.2 Stratégie développée au laboratoire Biopuces : monocouches auto assemblées.

2.1.2.1 Principes : SAM et silanes

Les monocouches auto-assemblées (ou « Self-Assembled Monolayer », SAM en anglais) représentent une technique bien maîtrisée pour modifier les propriétés de surface des matériaux [92-Ulman, 93-Kumar]. L'attachement covalent de couches mono-moléculaires est utilisé pour adapter des propriétés surfaciques comme les tensions de surfaces [94-Ruckenstein, 95-Cox], ou pour rendre accessibles des groupements chimiques d'intérêt afin de les coupler avec des ligands ou des protéines [96-Schaeferling, 97-Chiu] par exemple. La formation des SAM provient d'une agrégation d'éléments (molécules par exemple) qui s'organisent en un réseau dense (Figure 18). Comme les structures finales sont proches de l'équilibre thermodynamique, elles tendent à se former de manière spontanée et à rejeter les défauts. Les molécules se lient de manière covalente entre elles et avec le substrat pour former une monocouche rigide. Cette technique est décrite en détails dans [92- Ulman].

La brique de base des SAM est une molécule composée d'une ancre et d'un groupe fonctionnel d'intérêt, reliés par une longue chaîne organique. L'ancre permet d'attacher la molécule à la surface d'un substrat inorganique. Le groupe fonctionnel adapte de manière spécifique les propriétés de surface du matériau traité. Il peut aussi influencer la densité du réseau. La chaîne organique détermine l'épaisseur de la couche et sa régularité. Elle intervient sur les propriétés de la surface.

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

De nombreuses combinaisons de ces trois éléments ont été testées [92- Abraham Ulman]. De notre point de vue 3 possibilités sont envisageables conformément au cahier des charges (Figure 16). Elles sont illustrées dans le tableau ci-dessous.

	Plot hydrophile	Couche hydrophobe
1	Verre	SAM
2	SAM	Matériau hydrophobe
3	SAM	SAM

Tableau 2 : Différentes solutions techniques pour la création d'une matrice de plots hydrophiles entourés d'une couche hydrophobe en utilisant des SAM.

Les réactions d'auto-assemblage sur les couches de matériau hydrophobe comme la solution 2 sont difficiles à réaliser, parce que la majorité de ces réactions impliquent une accessibilité de la surface pour les molécules d'eau [100-Le Grange]. Ensuite le fait de réaliser deux couches différentes bien localisées paraît complexe, même si cela a déjà été réalisé [107-Younan Xia et George M. Whitesides]. Nous nous sommes donc dirigés vers la première solution où le verre constitue le matériau de support et nous évite des hypothèses de biocompatibilité dangereuses.

La surface du verre est constituée de groupes de silicium liés à de l'oxygène (SiO, SiOH, SiO₂ par exemple) qui sont les éléments actifs dans la réaction de liaison. Les silanes représentent les constituants de la couche. Ces molécules sont décrites dans la Figure 17.

Elles sont centrées autour du silicium Si. Une longue chaîne organique R permet d'obtenir l'hydrophobicité. L'adjonction de groupes fluorés tout au long de cette chaîne renforce ses propriétés hydrophobes. L'attachement à la surface du verre est réalisé par plusieurs groupes fonctionnels X opposés à la chaîne R.

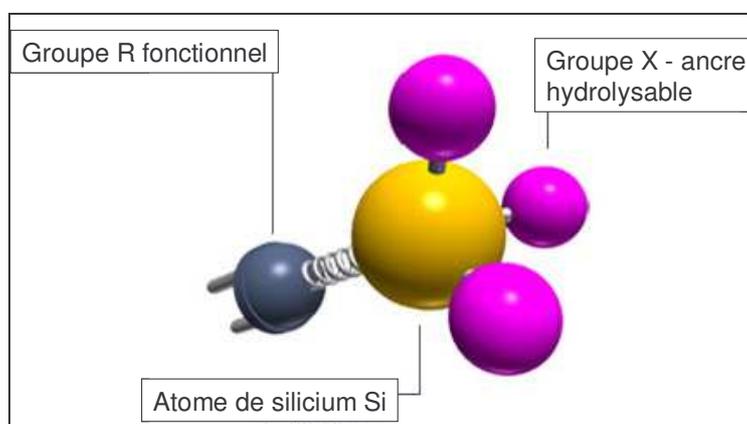


Figure 17 : Schéma de structure d'une molécule d'alkoxy silane (d'après <http://www.specialchem4polymers.com/>). L'atome de silicium est entouré d'un bloc fonctionnel R tourné vers l'extérieur et de 3 groupes X qui s'accrochent à la surface à fonctionnaliser.

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

La réaction chimique de liaison avec le substrat en phase liquide est représentée sur la Figure 18. Bien que quelques doutes subsistent sur le mécanisme réactionnel précis, le déroulement suivant paraît accepté [98-Richter, 99-Mayer, 100-Le Grange, 101-McGovern, 102-Hoffmann, 103-Tripp et M.L. Hair]. Les silanes sont hydrolysés en silanol par les molécules d'eau à la surface du matériau inorganique, puis réagissent avec les groupes silicium de la surface pour former des liaisons Si-O-Si. Ces mêmes liaisons peuvent attacher les molécules de silanes entre elles, formant une couche réticulée plus robuste. Lorsque la réaction a lieu loin de la surface dans la solution, elle conduit à la formation de polymères non attachés à la surface.

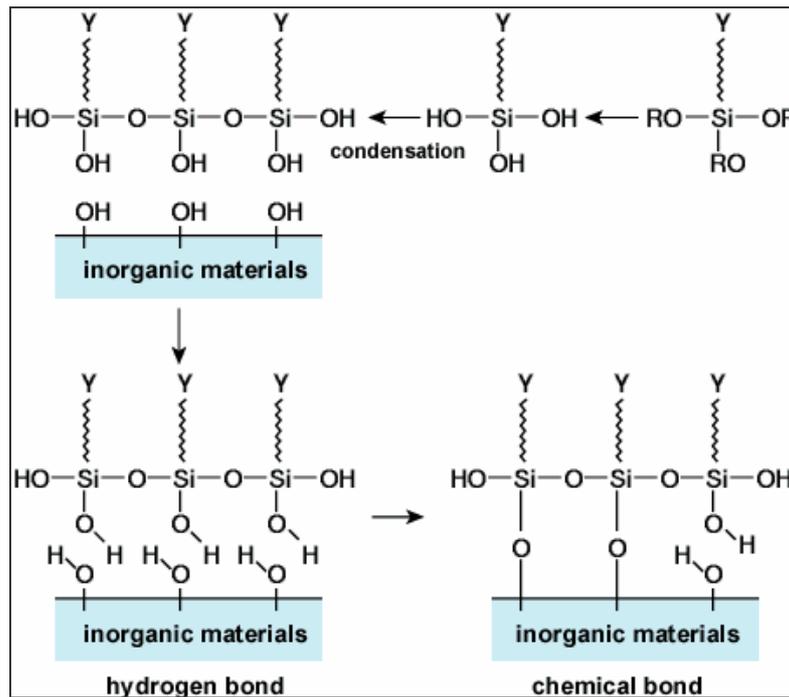
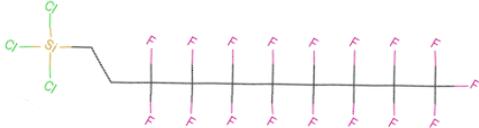
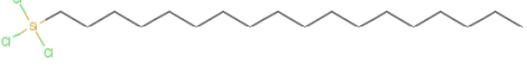
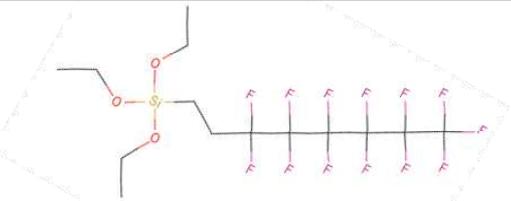


Figure 18 : Réaction chimique de silanisation (adapté de http://www.silicone.jp/e/silane/silanecup/silane_pro2.html).

Les groupes fonctionnels R sont hydrolysés près de la surface à laquelle ils s'accrochent grâce aux forces de Van der Waals (hydrogène notamment). La réaction d'accrochage permet de lier covalamment les silanes à la surface et entre eux pour former une monocouche organisée.

Plusieurs choix pour le groupement réactif R sont possibles. Les chlorosilanes ont une faible affinité pour la surface du verre avant d'avoir réagi avec l'eau et formé des hydrosiloxanes. L'octadecyltrichlorosilane (OTS) ou le 1H, 1H, 2H, 2H-perfluorodecyltrichlorosilane (FDTS) sont très utilisés. Les alkoxy silanes (trimethoxy ou triethoxysilane par exemple) forment une autre famille très employées (Figure 19).

Silane	Chemical structure	Water contact angle
Perfluorodecyltrichlorosilane FDTS		103°[1]
Octadecyltrichlorosilane OTS		109°[2]
Perfluorooctyltriethoxysilane (EFS)		122°[3]

1. Bao et al. "Polymer inking as a micro- and nanopatterning technique" J. Vac. Sci. Technol. B 21 (2003) 2749-2754
2. W. Robert Ashurst et al. « Dichlorodimethylsilane as an Anti-Stiction Monolayer for MEMS: A Comparison to the Octadecyltrichlorosilane Self-Assembled Monolayer » JOURNAL OF MICROELECTROMECHANICAL SYSTEMS 10 (2001) 42-49
3. Guanglei Cui "Formation of helical superstructures from a semi-fluorinated alkoxy silane through a surface and solution self-assembly process" Chem. Commun. 2 (2005) 277-278

Figure 19 : Exemples de structures de silanes, caractérisés par l'angle de contact d'une goutte d'eau distillée sur une monocouche pleine (dessins issus de <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.1.2.2 Création d'une matrice de spots hydrophiles

La réaction de silanisation permet de créer la couche hydrophobe, le plot hydrophile étant du verre sans silanes attachés. Nous avons établi un protocole de préparation décrit dans la Figure 20.

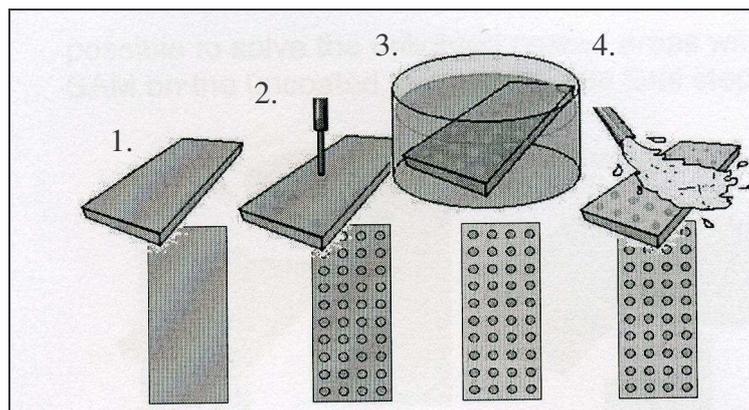


Figure 20 : Protocole de fabrication des lames contenant une matrice de plots hydrophiles entourés d'une couche de silane hydrophobe. De la gauche vers la droite. (1) Les lames de verre standards sont nettoyées (cycles de rinçages à l'eau distillée et à l'éthanol par exemple). (2) Des plots de solution de masquage sont créés aux emplacements hydrophiles en dispensant des gouttes d'environ 5 nl à l'aide d'un robot piezo-électrique. (3) Les lames sont baignées dans la solution de silane hydrophobe (5% de 1h,1h,2h,2h-Perfluorooctyltriéthoxysilane dans du pentane) pendant 2h à l'ambiante. (4) Après cuisson à 115°C pendant 2h, les plots du masque sont rincés à l'eau distillée, révélant la surface hydrophile protégée.

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

Le protocole a été adapté par une autre équipe du laboratoire Biopuces pour des applications de chimie. Le produit utilisé comme masque ne doit pas se dissoudre dans la solution de silane et doit rester accroché à la surface du verre pour réaliser une matrice reproductible. Nous utilisons une solution contenant 25% de glycérol et 20% de sucrose dans de l'eau distillée. La solution est filtrée sur 0,22 μ m pour éviter les contaminations. Le glycérol et le sucrose empêchent l'évaporation. Le nettoyage des lames de verre ne doit pas être trop poussé. L'angle de contact du verre très propre (lavé dans une solution de piranha contenant de l'acide sulfurique et de l'eau oxygénée par exemple) est de l'ordre de 30°. Les gouttes de la solution de glycérol-sucrose s'étaleraient trop et formeraient des plots trop grands ou trop espacés.

2.1.2.3 Performances et limites :

La facilité de mise en place et la rapidité de réalisation font de ce protocole un outil adapté à des études de faisabilité immédiates. Les angles de contact n'ont pas été investigués de manière stricte, mais une matrice de gouttes est obtenue lorsque les puces sont trempées dans de l'eau distillée, ce qui révèle l'interface hydrophobe-hydrophile. On observe aisément des angles au-dessus de 90° pour des gouttes d'eau disposées sur les plots.

Du point de vue de l'applicabilité à la culture cellulaire, nous avons pu montrer que des cellules HeLa se développaient sur le substrat en accord avec des conditions classiques de culture cellulaire (100 cellules dans 100nl). De plus, la puce ne présente pas de fluorescence parasite pour la gamme de longueurs d'ondes que nous utilisons.

Malheureusement l'inefficacité des équipements techniques disponibles a pesé sur la robustesse de ces dispositifs :

- la solution de glycérol s'étale sur la surface de verre de manière inhomogène, en fonction des caractéristiques locales de la surface (rugosité par exemple). Le masque créé n'est pas uniforme. Des gouttes de la solution de masquage ont fusionné entre elles.
- Le contrôle du positionnement de la lame sur son support n'est que visuel. Celui-ci n'est pas reproductible et rend l'intégration dans une plateforme automatisée (imagerie et dispense de gouttes de cellules par exemple) délicat.
- la technologie de dispense n'était pas facilement adaptable à des solutions aussi visqueuses. Il en résulte une dispense parfois chaotique.
- Le mauvais contrôle de la dispense du masque protecteur s'ajoute à la reproductibilité parfois légère de la création de la couche de silane (apparition de multicouches, de trous par exemple) qui rendent les angles de contact et donc la forme de la goutte obtenue très variables. Les bio-réacteurs formés par les gouttes ne sont identiques. Les expériences conduites ne sont pas parallélisées.
- La formation des monocouches artisanales n'a pas permis d'obtenir des couches stables dans le temps. Les dispositifs vieillissaient très rapidement. Au bout d'une semaine de stockage à l'ambiante et au noir, la couche de SAM avait envahie les plots hydrophiles et fait disparaître la matrice.

Cette technologie s'avère attrayante dans sa facilité de mise en œuvre mais le passage à un procédé de fabrication plus robuste sera nécessaire pour pouvoir obtenir des caractéristiques optimales et pour l'évaluer de manière plus rigoureuse.

2.1.3 Stratégie Ultrahydrophobe :

Récemment la communauté scientifique et industrielle a montré un intérêt tout particulier pour les matériaux appelés « superhydrophobes » ou « ultrahydrophobes » [110-Onda]. Ceux-ci s'inspirent de propriétés découvertes dans la nature, notamment chez les plantes et les animaux, pour obtenir des surfaces pratiquement non mouillables [111-Gu]. Par exemple, les araignées utilisent ces surfaces texturées pour marcher sur l'eau. Le lotus peut se nettoyer lorsque des gouttes de pluies roulent sur ses feuilles sans adhérer à la surface et ramassent les poussières, lui permettant de récupérer plus de lumière pour la photosynthèse [112-Otten]. Cette propriété a été copiée dans les secteurs du bâtiment et des transports pour l'autonettoyage des vitres par exemple [113-Fürstner]. L'hyperhydrophobicité est obtenue par micro ou nano structuration de la surface d'un matériau hydrophobe : des bulles d'air sont piégées dans les micro cavités, elles empêchent ainsi la solution aqueuse de mouiller la surface [effet lotus, 121-Marmur].

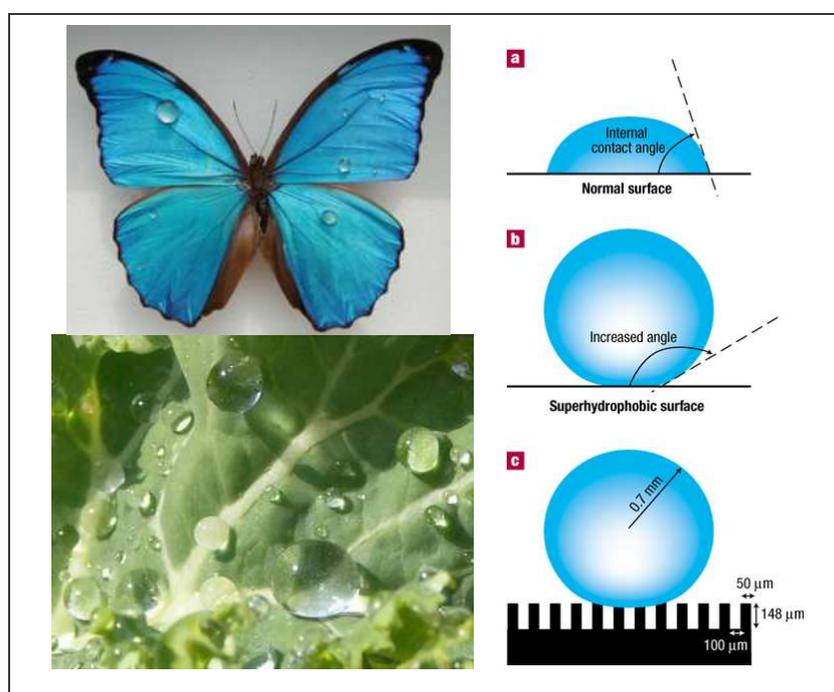


Figure 21 : Superhydrophobicité. A gauche, exemples naturels. Les gouttes de pluie roulent sur les ailes de ce papillon ou sur les feuilles de certaines plantes qui ne sont pas mouillées et s'auto-nettoient. A droite, principe (adapté de [115-Quéré]). Forme des gouttes sur une surface normale (a) et superhydrophobe (b). Des micro-nanostructures à la surface d'un substrat hydrophobe piègent de l'air (c). La goutte repose sur un environnement non mouillable.

Théoriquement des angles de 180° pourraient être atteints, dans la pratique les angles de contact sont souvent compris entre 120° et 150° [115-Quéré, 116-Bicot]. En biologie ces surfaces sont utilisées en spectrométrie de masse MALDI (technique détaillée dans le chapitre 3.2), pour la concentration d'échantillons précieux. Une goutte a une surface de contact minimale avec le substrat. Lorsqu'elle s'évapore, l'échantillon se concentre sur cette petite portion [120-Schuerenberg]. Cette option permet d'optimiser les angles de contact et les rapports surface/volume pour un meilleur accrochage des gouttes et une meilleure viabilité des cellules. Seulement ces matériaux ne peuvent pas être utilisés sans la création d'une matrice d'ancres hydrophiles qui permette de maintenir les gouttes en place [120-

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

Schuerenberg]. Dans le cadre de nos applications, ces ancres supportant les gouttes doivent être biocompatibles.

Plusieurs techniques peuvent conduire à une nanostructuration efficace des substrats [119-Krupenkin, 117- Kijlstra, 114-Erbil]. Elles passent soit par une abrasion de la surface, soit par une croissance inhomogène de filaments nanométriques [117-Kijlstra]. L'entreprise allemande Sunyx Surface Nanotechnologies GmbH (« Sunyx ») a développé une technologie de dépôt par « e-beam evaporation » d'oxyde de zirconium (ZrO_2) qui permet d'obtenir des angles de contact supérieurs à 120° [117-Kijlstra]



Figure 22 : Gouttes de cultures cellulaires sur silicium noir. Les gouttes glissent à la surface et ont des angles de contact au-dessus de 90° . Les gouttes sont instables et tombent de la surface lors des manipulations. Des ancres hydrophiles doivent être créées.

La création d'ancres hydrophiles a été testée par de nombreuses solutions en collaboration avec la société Sunyx. L'eau, l'acide chlorhydrique plus ou moins concentré ou d'autres tampons aqueux n'ont pas réussi à créer d'ancres stables : les gouttes roulent ou glissent sur la surface. L'ajout de poly-L-lysine permet de modifier l'accrochage de gouttes aqueuses sur la surface. Malheureusement celle-ci se dégrade sous l'action de la culture cellulaire après un jour de culture (Figure 23).

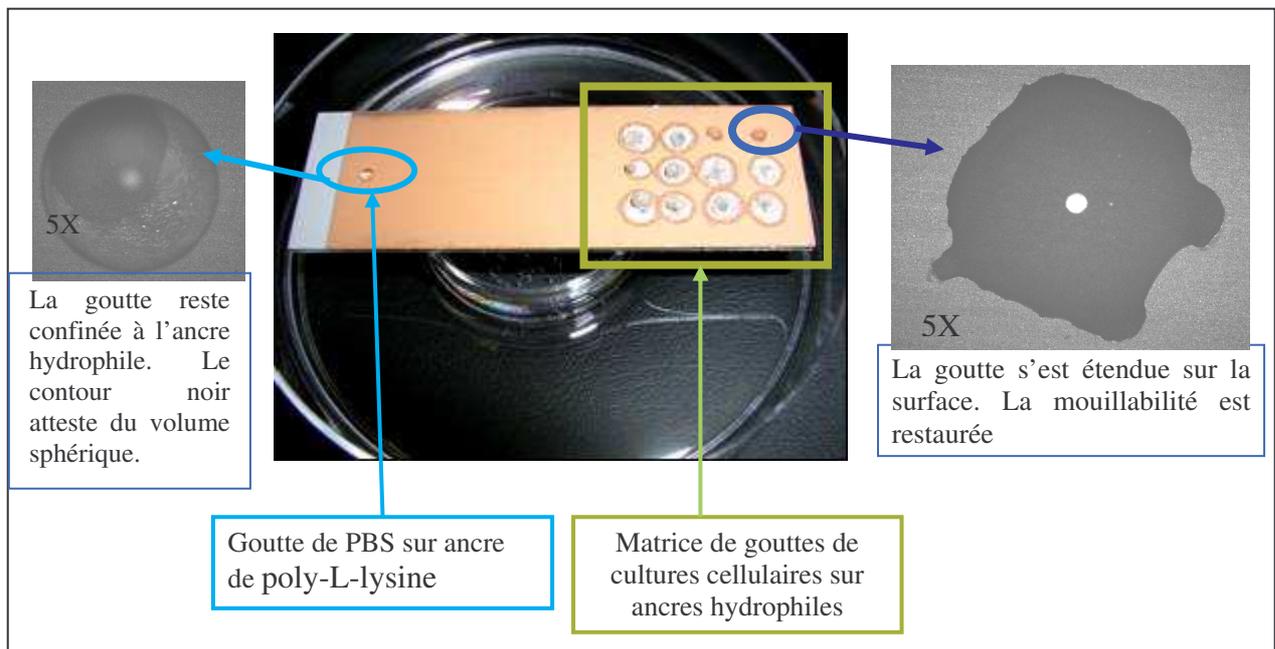


Figure 23 : Dégradation des surfaces superhydrophobes « Sunyx » sous l'action des cultures cellulaires. A gauche une goutte de PBS repose sur une ancre hydrophile de poly-L-lysine. La frontière est circulaire et nette. A droite, une goutte de culture cellulaire a mouillé la surface hydrophobe. La frontière est chaotique et étendue. Au centre, un halo blanc de surface dégradée entoure les gouttes de cultures cellulaires.

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

Ces dégradations ont été rapportées à la société Sunyx, qui n'a pas apporté d'explication ni d'éléments pouvant nous permettre d'améliorer les surfaces. De plus lors d'un maintien en condition d'humidité élevée de plusieurs jours, la surface devient mouillante. Les gouttes disparaissent en un film liquide recouvrant toute la surface. Enfin leur coût prohibitif (incluant des coûts de développement spécifique) ne laisse pas entrevoir d'utilisation possible de ces surfaces à court terme.

Malgré leur haut potentiel, les surfaces ultrahydrophobes semblent difficilement modifiables sans des développements conséquents pour supporter des cultures cellulaires.

2.1.4 Impression par micro-contact

(« microcontact printing », μ CP, ou « stamping » en anglais)

L'impression par microcontact utilise la réaction chimique de silanisation en lui apportant une dimension locale [107- Xia]. La solution de silane est approchée de la surface à traiter à l'aide d'un tampon. Cette technique est utilisée pour modifier les propriétés surfaciques de matériaux sans passer par l'utilisation lourde et coûteuse d'équipements de photolithographie. Par exemple, il est possible d'imprimer des monocouches [105-Jeon, 108-Kane] Elle a l'avantage d'être rapide et efficace avec un degré de reproductibilité satisfaisant. Une description très didactique est présentée dans [107-Younan Xia et George M. Whitesides]. Cette méthode a montré son intérêt dans la fabrication de puces à cellules. On peut notamment se référer à [106-Chen].

L'étude de l'adéquation de cette technique avec l'application des puces à cellules en gouttes a été confiée à un élève ingénieur en stage de dernière année en Juillet 2003. Après avoir testé plusieurs assemblages d'encre et de tampons, il a été montré que la création d'une matrice de plots hydrophiles entourés d'une couche hydrophobe était réalisable. Les conditions de dépôts sont très influencées par les temps de contacts entre les différentes surfaces et les différents réactifs, mais aussi par les compositions des « encres ». Les optimisations des différentes conditions de dépôt nécessitent des longues étapes de mise au point. La reproductibilité du procédé en utilisant les infrastructures disponibles n'a pas permis d'obtenir des substrats adéquats pour un traitement massif. Il s'agit d'une méthode de prototypage rapide très efficace mais qui est difficilement applicable à des stratégies de production.

2.1.5 Stratégie industrielle de silanisation en phase liquide :

Au vu des différents résultats sur les techniques essayées, il a été choisi d'industrialiser le recours à la chimie de surface (voir chapitre 2.1.2). Sur la base du savoir-faire développé par une autre équipe du laboratoire Biopuces, le protocole de silanisation perfluorée en phase liquide a été transféré à la société Memscap Inc. (Parc Technologique des Fontaines, Bernin, 38926 CROLLES Cedex, www.memscap.com)

2.1.5.1 Description du protocole transféré :

La figure ci-dessous (Figure 24) décrit le protocole ayant servi de base à la réalisation des premiers lots de puces.

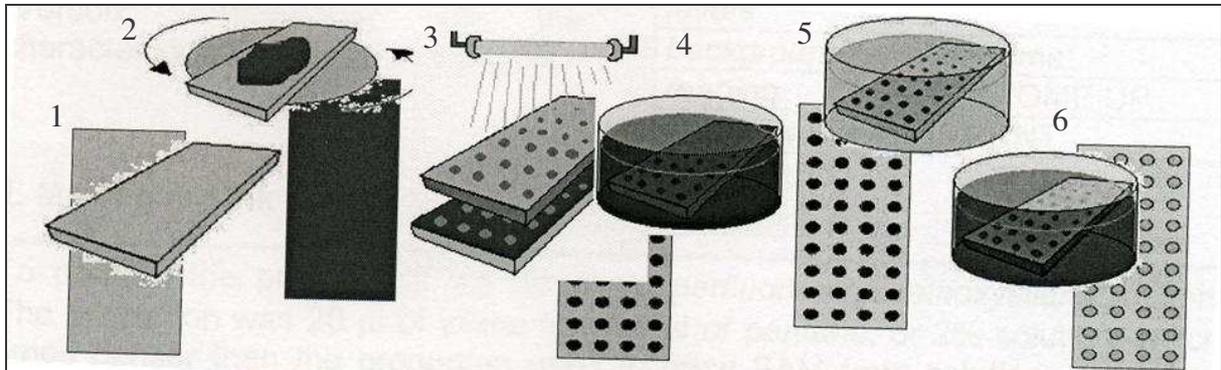


Figure 24 : Protocole de fabrication des puces par Memscap. De la gauche vers la droite : (1) nettoyage des wafers de verre (1,1×100mm), (2) dépôt d'une résine photosensible en couche uniforme à la surface. (3) insolation à travers un masque pour modifier la résine aux emplacements hydrophiles. (4) rinçage de la résine non modifiée. (5) fixation de la couche de silane (FDTs) en bain dans du pentane sous atmosphère d'azote. (6) dissolution des plots de résine pour laisser la place à la surface de verre hydrophile.

Un protocole plus détaillé peut être trouvé en annexe à la fin du document (page 172).

Ce savoir-faire a par la suite été amélioré par la société Memscap de manière autonome, notamment sur les temps de contact, les concentrations des solutions, et les protocoles de nettoyage. Un exemple de dessin de wafer et d'un bloc de 100 plots est représenté sur la figure ci-dessous (Figure 25).

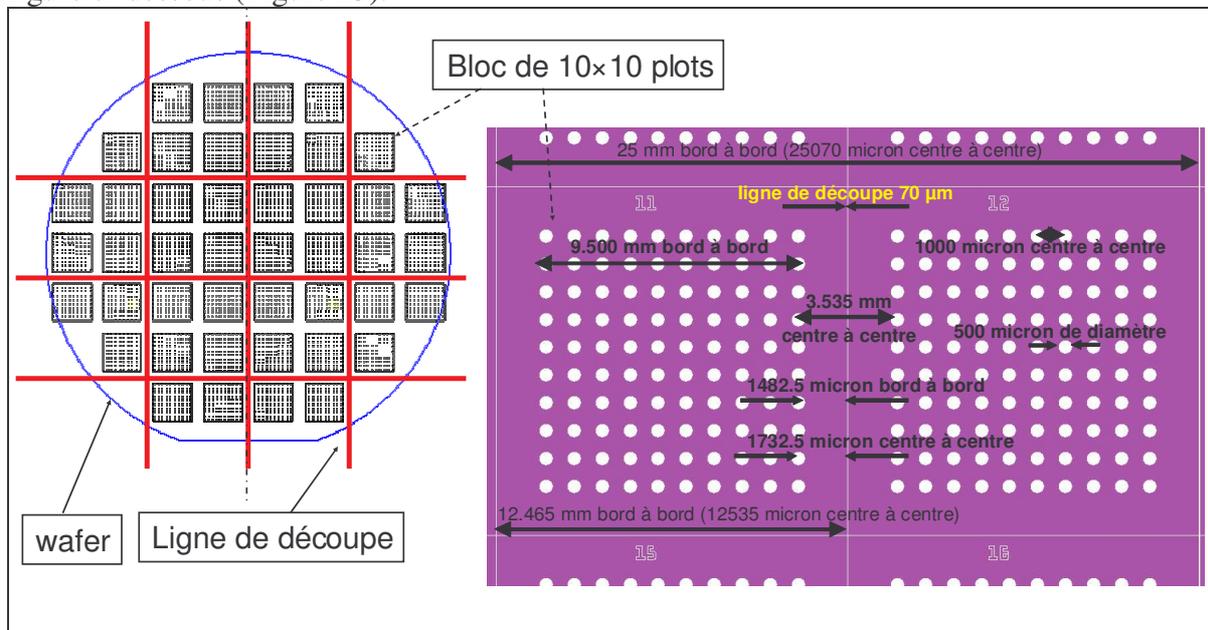


Figure 25 : Design des premiers lots de puces fabriquées par Memscap. Le design contient des lignes de découpe entre chaque bloc (en rouge à gauche) ce qui permet d'obtenir de nombreuses dimensions de puces (Figure 15). Par exemple le wafer présenté comporte 6 dispositifs de 4 blocs de 100 plots. D'autres dispositifs partiels sont disponibles contenant 1, 2, ou 3 blocs de 100 plots. Ils seront utilisés pour des expériences de calibrage ou des essais. Des dispositifs de 8, 10, ou 12 blocs sont aussi réalisables pour des applications demandant plus de débit (jusqu'à 1200 plots par puces)

2.1.5.2 Performances :

Cette technologie s'appuie sur les travaux déjà réalisés dans la phase artisanale de mise au point de la chimie de surface. Les propriétés physico-chimiques des substrats ressemblent à celles déjà évoquées à ce propos. Par exemple une matrice de gouttes est facilement obtenue lors d'un trempage des dispositifs dans de l'eau distillée. Ils constituent la majeure partie des puces qui ont été utilisées tout au long de ce travail, aussi nous allons détailler plus précisément leur comportement.

2.1.5.2.1 Biocompatibilité :

Une utilisation biocompatible des puces à cellules implique la possibilité de les stériliser tout en conservant les propriétés de surface adéquates à la formation des gouttes de culture cellulaires. Après trempage dans de l'éthanol 70° pendant 20 min puis séchage à l'ambiante sous hotte stérile, un trempage dans l'eau distillée permet toujours de restituer une matrice de gouttes, garante de la fonctionnalité du dispositif.

Il est à noter que les procédures mises en place en terme de contrôle de la stérilité ont été efficaces puisque aucune contamination n'a été observée en utilisant la technologie de puces à cellules en gouttes tout au long de ce travail de thèse.

La biocompatibilité a été validée par l'étude de la prolifération des cellules (HeLa) sur le substrat immergé dans la culture par rapport à une lame de verre classique. (Figure 26).

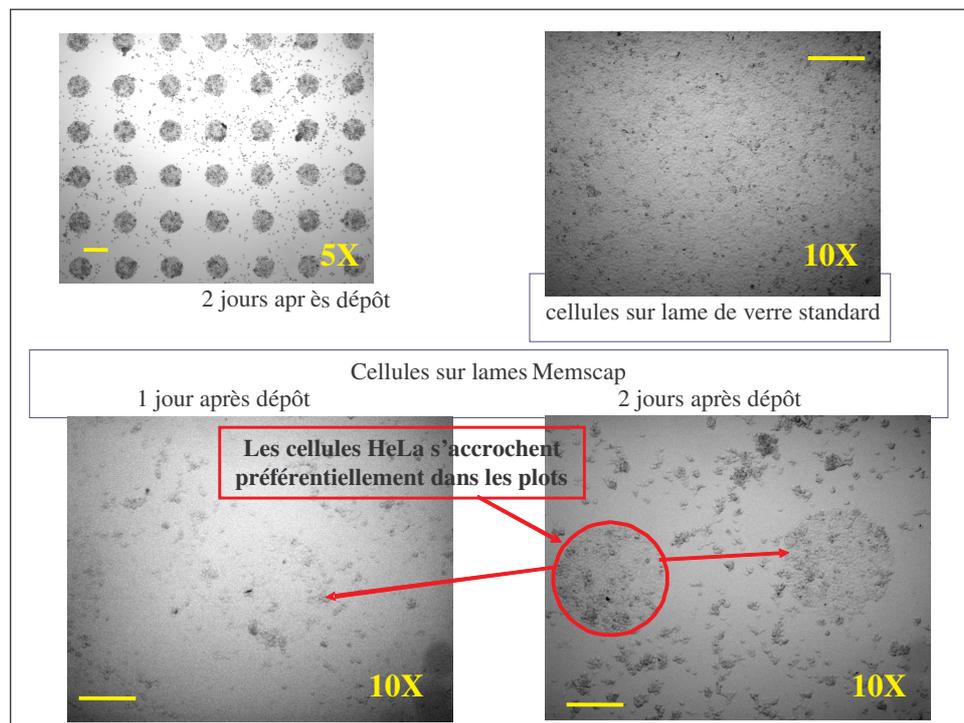


Figure 26 : Prolifération de cellules HeLa dans les plots hydrophiles d'une lame Memscap. Les images ont été prises au dessus d'un film de PBS pour pouvoir laisser les cellules en vie pendant la durée de l'acquisition. Elles ne sont pas aussi nettes que souhaitées. La prolifération peut se comparer à celle ayant lieu sur une lame de verre. Les cellules sont à confluence dans les plots après 2 jours de culture (jointives et très denses) alors qu'elles ne le sont pas le premier jour. Des mesures plus précises seront possibles lorsque la plateforme de détection automatisée des cellules sera mise en place (voir paragraphe 3.13). L'image en haut à gauche provient de lame avec des plots de 250µm de diamètre - barre d'échelle de 250µm.

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

Cette étude montre non seulement que les cellules HeLa poussent sans problèmes sur les plots hydrophiles, mais aussi qu'elles ne se développent que sur ces espaces. Cette caractéristique a été retrouvée pour d'autres types cellulaires. Elle pourrait être utilisée pour créer des plots de cellules (chapitre 1.6) dans des applications de puces à cellules qui ne nécessitent pas l'individualisation fluide des plots.

2.1.5.2.2 Comportement des gouttes

Nous avons mentionné que le différentiel de tension de surface permettait de créer une matrice de gouttes par trempage dans une solution aqueuse. Ce procédé a permis de mettre en évidence le fait que le milieu de culture (contenant du sérum de veau fœtal – SVF) possède des composés qui lui confèrent des propriétés de mouillabilité singulières : aucune matrice n'est créée par trempage, une fine couche de milieu de culture se forme sur toute la surface. Cela peut s'expliquer par la présence de protéines amphiphiles qui s'adsorbent indépendamment sur tout types de surface. Le comportement du milieu de culture et des gouttes de cultures cellulaires à la surface de la puce sera différent de celui de l'eau.

Afin de mieux comprendre comment les gouttes vont se former sur la surface, des mesures d'angles de contact ont été réalisées en fonction du volume de la goutte. Le comportement attendu de l'interface hydrophile/hydrophobe recevant un volume croissant dans un cas idéal peut se découper en 5 étapes représentées sur la Figure 27

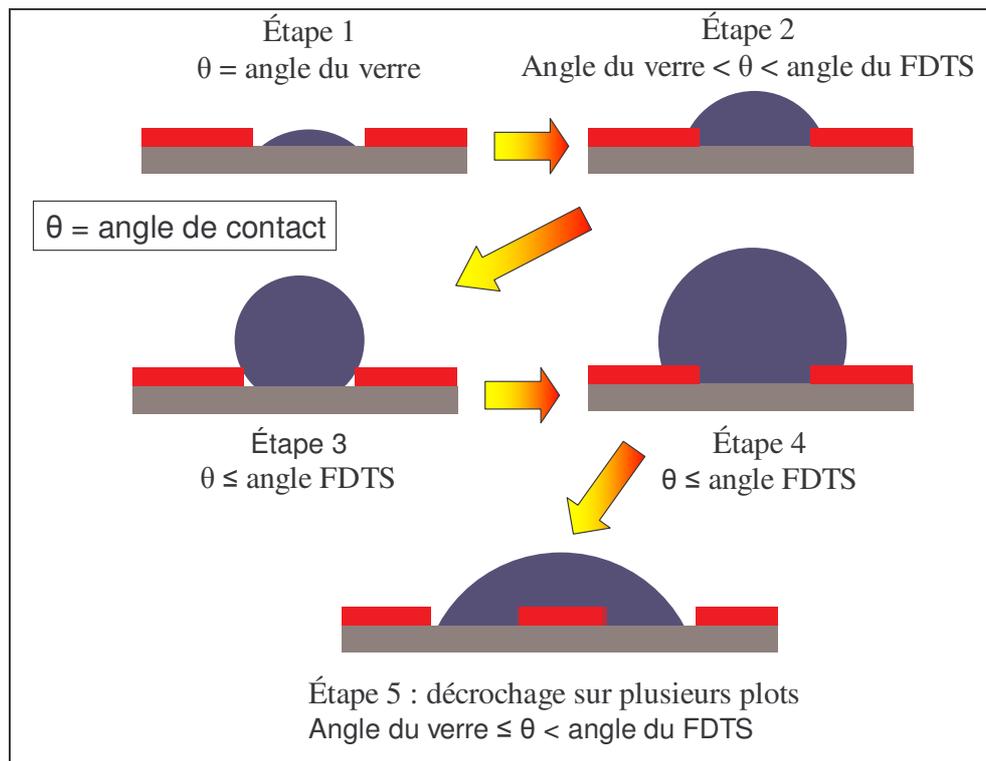


Figure 27 : Comportement des gouttes pour des volumes croissants sur le substrat Memscap.

Explications dans le texte.

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

1. Le volume de liquide est faible, il ne touche pas la limite hydrophobe : l'angle de contact est celui de la surface hydrophile (environ 30-40°).
2. La surface hydrophile est propre et ne retient pas la ligne triple, qui représente la frontière en les 3 phases du système : le liquide, l'air, et le solide. Lorsque le volume augmente, l'angle de contact reste constant mais le diamètre augmente : $D(V) \propto \sqrt[3]{V}$. La ligne triple touche la frontière hydrophobe.
3. Lorsque le volume augmente, l'interface joue son rôle de maintien et le diamètre de la goutte n'évolue pas. Par contre l'angle de contact augmente jusqu'à atteindre la limite de tension de l'interface.
4. A partir de ce moment on se retrouve dans la configuration 1, ou le diamètre augmente et l'angle de contact reste constant à sa limite supérieur : la ligne triple se déplace sur la surface hydrophobe.
5. Lorsque la ligne arrive sur le plot voisin, la goutte tombe dans le plot hydrophile. Son angle de contact chute et son diamètre bondit.

Selon ce comportement, l'angle de contact obtenu juste avant le débordement du plot (fin de l'étape 3) donne une mesure de la force des tensions de surface : plus il est élevé, plus le volume que peut contenir le plot par rapport à sa surface est grand, meilleure est la prolifération cellulaire.

Pour effectuer cette mesure nous avons mis au point une station de contrôle de l'angle de contact associée à un robot de dispense piézo-électrique développé au laboratoire. Cette plateforme est composée d'une table à déplacement contrôlé sur 3 axes (x, y, z), d'une buse MicroFab (MicroJet™ 60µm de diamètre, éjection piézo-électrique), et d'un système fluidique d'arrivée de liquide. Un ordinateur commande les deux premiers éléments. Le robot de dispense dépose des gouttes de liquide de quelques centaines de picolitres sur les plots, repérés visuellement. Les gouttes sont ensuite photographiées en lumière rasante pour pouvoir analyser l'interface triple eau-air-substrat et identifier l'angle de contact. Un logiciel d'analyse d'image semi-automatisée (développé par un stagiaire) calcule le diamètre et le volume de la goutte à partir d'un angle de contact déterminé manuellement et d'une échelle à calibrer (300 pixels sur l'image donnent 500µm par exemple).

La séquence de mesures représentée dans la Figure 28 commence par la dispense d'un nombre particulier de pico-gouttes par la buse d'éjection. La goutte créée est photographiée et l'image est stockée. Puis le même nombre de gouttes est de nouveau éjecté sur le même plot et vient grossir le volume de la goutte déjà présente. Une nouvelle photo est prise et stockée. La séquence est répétée avec des nombres de pico-gouttes différents sur différents plots et puces pour évaluer la reproductibilité des comportements.

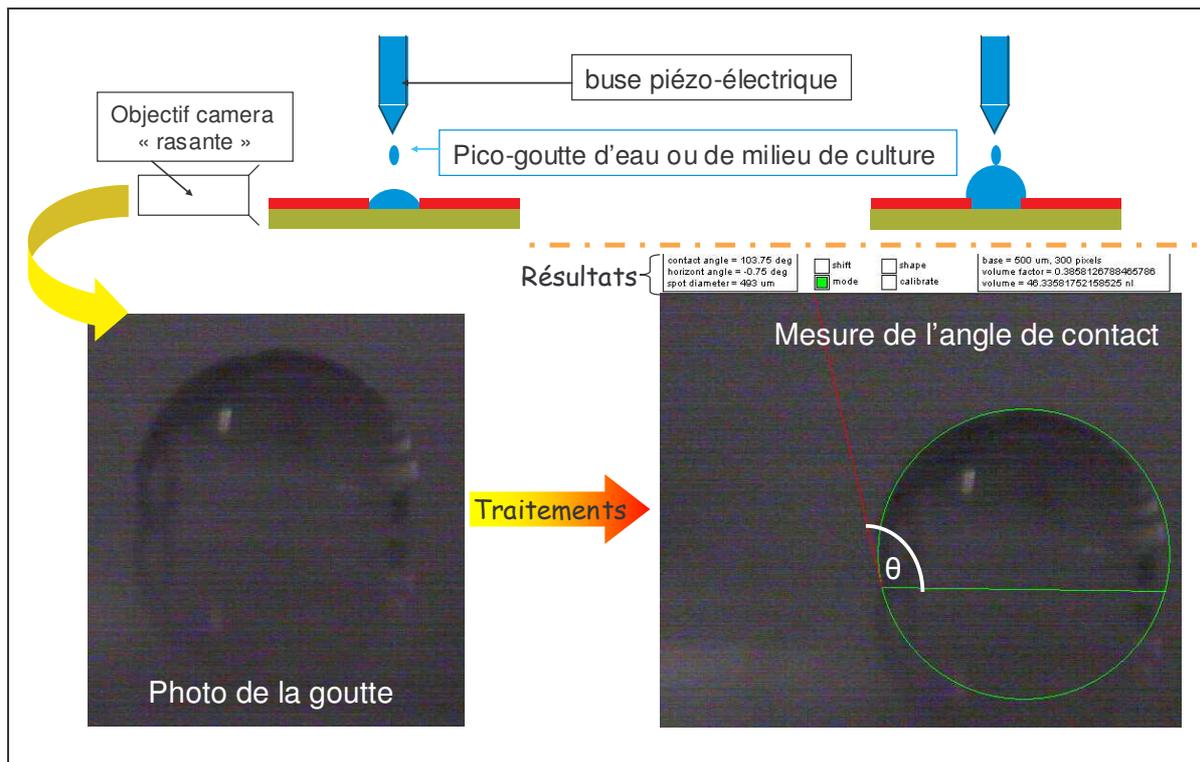


Figure 28 : Système de mesure de l'angle de contact de gouttes sur les substrats matricés. En haut, la plateforme de dispense permet de former des gouttes de différents volumes. Elles sont observées en incidence rasante par une caméra reliée à un ordinateur sur lequel un logiciel d'analyse d'image définit l'angle de contact et les rapports entre le diamètre et le volume. En bas un exemple de photo de gouttes avec un angle de contact θ supérieur à 90° . La sphère verte permet d'ajuster les mesures (angle entre les segments verts et rouge) à la forme de la goutte. Au dessus, les différents résultats sont présentés.

Les mesures réalisées avec ce dispositif ne sont pas très précises et une tolérance de $\pm 5^\circ$ doit être prise en compte. Elles ont permis de valider la présence de la couche de FDTTS à la surface sur des dispositifs sans matrice hydrophile (« pleine couche »), en obtenant un angle de contact de plus de 100° . L'angle attendu pour ce silane en monocouche dense est compris entre 110° et 120° (B. C. Bunker et al. « The Impact of Solution Agglomeration on the Deposition of Self-Assembled Monolayers » Langmuir 16 (2000) 7742-7751) ce qui laisse penser que la couche pourrait être plus robuste.

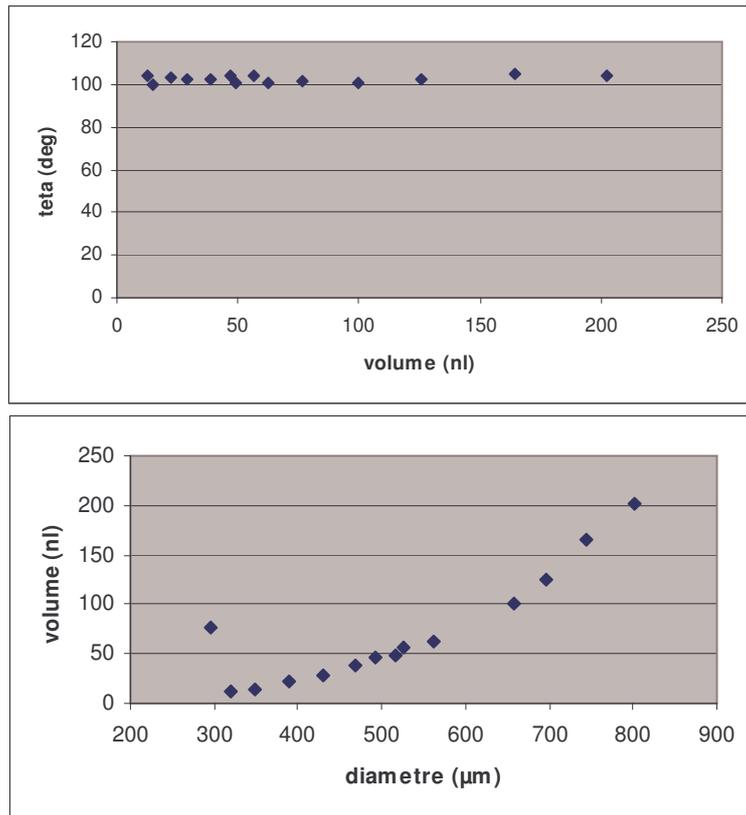


Figure 29 : Comportement de gouttes d'eau distillée sur la couche de FDTD non matricée de plot hydrophile. Cette observation peut-être rapprochée du comportement attendu pour l'étape 4 de la Figure 27. L'angle de contact teta reste constant autour de 105°. Le volume et le diamètre sont liés par une relation $D(V) \propto \sqrt[3]{V}$.

Les unités de mesure de volumes et de diamètres dépendent d'une calibration de la taille de l'image de la goutte qui n'a pas pu être effectuée de manière précise. Ces valeurs ne sont pas réelles mais leurs variations sont conservées.

Les comportements théoriques pour les étapes 3 et 2 et 4 (Figure 27) sont représentés sur les graphiques ci-dessous.

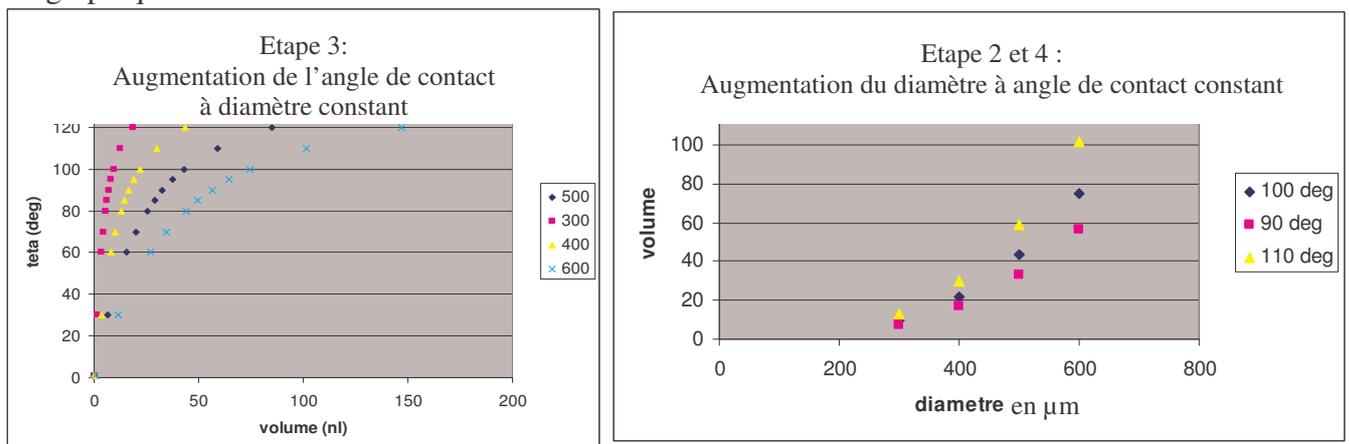


Figure 30 : Comportement théorique des volumes, angles de contact (teta) et des diamètres de gouttes sur une surface sans différentiel de tension de surface.

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

Les premiers lots de puces avaient un comportement qui ne permettait de caractériser l'interface hydrophile/hydrophobe. La faiblesse de l'interface se retrouvait aussi dans l'obtention d'une matrice après trempage dans l'eau : sur de nombreuses puces la matrice n'était pas visible.

Nous avons pu mettre en évidence par la suite des problèmes de lavage et de traitement qui ont été pris en compte dans les lots suivants. Les angles de contact obtenus sont proches de 100° (Figure 31). Le volume de milieu de culture obtenu pour des gouttes limitées aux plots est de l'ordre de 50nl, ce qui est bien trop juste pour pouvoir accommoder une centaine de cellules.

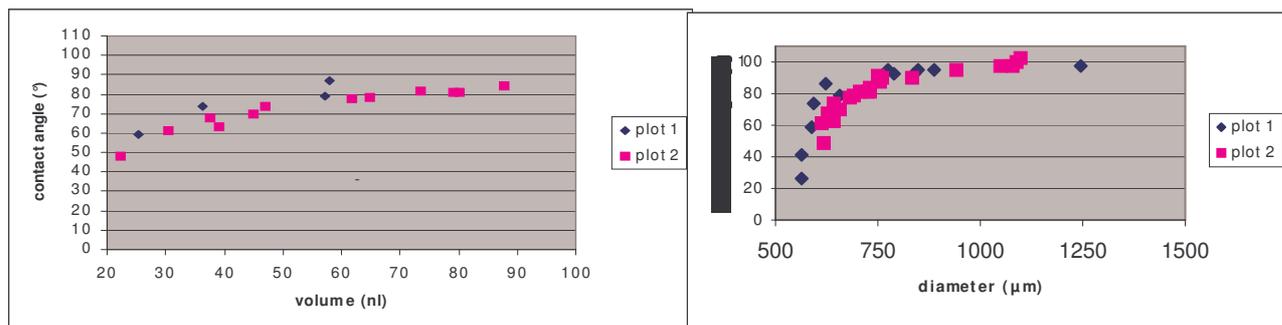


Figure 31 : Comportement de l'interface hydrophile-hydrophobe des substrats Memscap après les optimisations de protocoles de fabrication pour deux plots distincts. L'angle de décrochage (entre les étapes 3 et 4) est d'environ 100° pour des gouttes d'eau distillée

Nous avons montré précédemment que le volume de confort pour la majorité des cellules [87-Schaack] était d'environ 1nl, soit 100nl au moins par goutte, ce qui est conforme aux protocoles standard en microplaques ou en boîte de Pétri. Pour atteindre cet objectif nous avons augmenté le diamètre du plot aux alentours de 600-700µm. L'acquisition des lots de substrats étant très coûteuse, nous avons décidé d'essayer d'utiliser ces lots pour les expériences de transfections. Cela implique que des cellules seront en contact avec la monocouche de silane. La biocompatibilité de ce matériau a été prise en compte lors des études par immersion. Les cellules prolifèrent à son contact, mais son hydrophobicité a sans doute une influence sur leur comportement. Cet aspect devra être considéré lors de l'interprétation des résultats.

2.1.5.2.3 Test de validation : premières transfections

Afin de vérifier l'applicabilité des substrats fabriqués par l'entreprise Memscap, des expériences de transfections sur cellules ont été conduites dès la réception des premiers lots. Des molécules d'oligonucléotides couplées à un fluorophore cy3 ont été introduites dans des cellules HeLa. Pour mettre au point le protocole de l'expérience, nous avons tiré parti des dispositifs de culture en macro-gouttes : l'ensemble des conditions de transfections ont été testées et/ou optimisées sur ce format avant de lancer une expérience sur les supports micrométriques. Notamment, pour aider la molécule transfectée à traverser la membrane plasmique par les pores de la cellule et atteindre les appareils d'expression dans celle-ci, il est nécessaire de la lier à un complexe (kit de transfection). De nombreux systèmes existent et revendiquent des rendements de transfection élevés (le rendement est le nombre de cellules transfectées divisé par le nombre de cellules total). Aucun kit universel n'est disponible. Chaque type cellulaire et type de molécule à transfecter correspondent à un kit particulier qui doit être optimisé. Après plusieurs tests, nous avons choisi d'utiliser le kit «siPort amine» (Ambion, ref 4507). Le protocole détaillé est présenté dans la Figure 32. Une description plus

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

complète de la dispense automatisée des gouttes sur les substrats sera présentée dans la partie 2.2. Le robot Gesim utilisé ici emploie une technique de dispense par piézo-électrique.

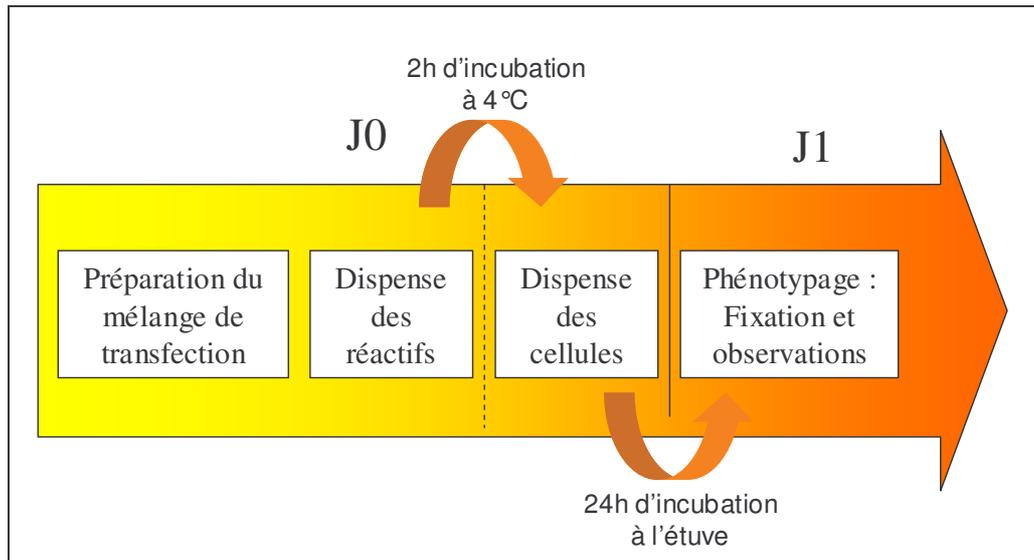


Figure 32 : Protocole de transfection inverse d'oligonucléotide fluorescent (concentration finale dans la goutte d'environ $3\mu\text{M}$) dans des cellules HeLa (à $0,7 \cdot 10^5$ cellules/ml) dans des gouttes d'environ 75 nl à l'aide du robot Gesim sur une puce Memscap. Les puces contenant les cellules sont incubées dans leur dispositif de vapeur saturante.

Les étapes de phénotypage (fixation au PFA 4%) sont réalisées en trempant la puce dans un bain de réactif, de façon à ce que tous les plots soient traités parallèlement. Les résultats montrent que les cellules s'attachent sur la surface du substrat conformément aux résultats précédents (Figure 33a.). La concentration cellulaire de dépôt est conforme avec le nombre de cellules par gouttes (environ 80, soit une concentration dans la goutte d'environ $1 \cdot 10^6$ cellules/ml). Les gouttes ayant reçu la molécule d'oligonucléotide présentent des cellules dans lesquelles celle-ci semble s'être concentrée, attestant d'une possible transfection (Figure 33a. et b.).

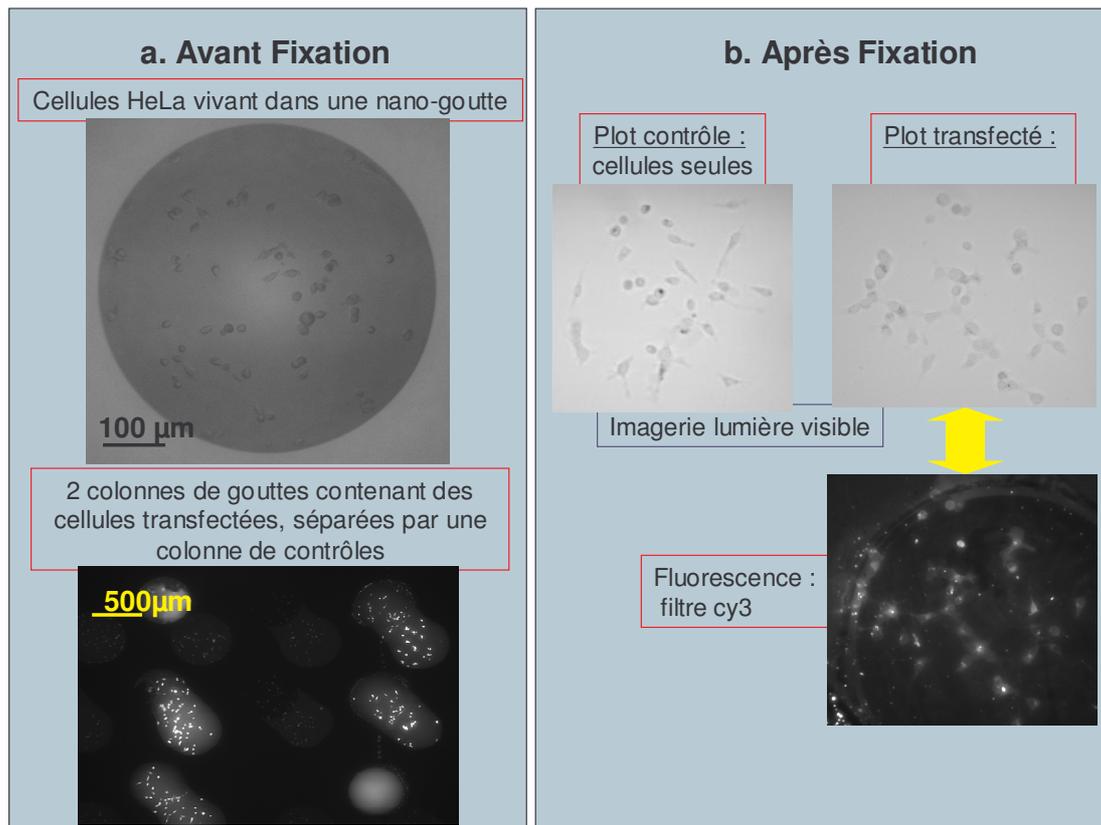


Figure 33 : 1^{ères} transfections sur lames Memscap avec le robot Gesim. (a) exemple de gouttes de cellules HeLa avant fixation. En dessous deux colonnes de cellules ayant reçus de l'oligonucléotide fluorescent qui se concentre dans les cellules (2 gouttes par colonnes), séparées par une colonne de cellules sans oligonucléotides. 2 grandes taches fluorescentes attestent de problèmes de dispenses : les gouttes d'oligonucléotides n'ont pas fusionnées avec les gouttes de cellules. La forme «en haricot » des gouttes de culture cellulaires transfectées sont une preuve supplémentaire de ces problèmes d'alignement. (b) Exemples de plots de cellules après fixation au PFA. En haut les cellules des plots transfectées en lumière visible ont la même morphologie que des cellules non stimulées. En dessous l'oligonucléotide fluorescent se concentre dans les cellules. Presque toutes les cellules sont transfectées.

Cependant l'adaptation du robot Gesim à la dispense de cellules n'a pas été efficace. L'alignement des gouttes avec les positions prédéterminées sur le substrat n'était pas parfait. Nous obtenions des gouttes en forme de « haricot » (Figure 34), qui provenaient du fait qu'elles avaient été formées à l'extérieur des plots hydrophiles et avaient ensuite été ramenées à l'intérieur par les forces de tensions de surface. Parfois la dispense était si difficile que les gouttes de cellules et les gouttes d'oligonucléotides n'ont pas fusionné (voir Figure 33a). Ces problèmes font ressortir le besoin d'un robot de dispense dédié à la dispense de cellules dont nous verrons le développement dans la partie suivante (chapitre 2.2).



Figure 34 : Photographie d'une matrice de 5x5 gouttes d'eau déposée avec le robot Gesim sur lame Memscap. La forme « en haricot » vient du fait que toutes les gouttelettes d'eau n'ont pas été dispensées au centre du plot, certaines sont tombées sur la surface hydrophobe proche du plot et ont été rassemblées par les forces de tensions de surface.

Ces expériences montrent que les substrats Memscap peuvent être utilisés dans une application de transfection de petites molécules nucléotidiques. Des tests sur d'autres molécules ont été conduits, un exemple est présenté au chapitre 2.2 et dans [87-Schaack].

2.1.5.3 Améliorations

Le comportement de l'interface hydrophile/hydrophobe des premiers lots de puces ne correspondait pas à la nécessité de reproductibilité d'expériences à haut-débit. Le procédé de fabrication a été optimisé, notamment au niveau des lavages et des temps d'incubation, afin d'améliorer la robustesse de la monocouche de silane. Les angles de contact obtenus n'atteignent pas encore les pleines potentialités du matériau (FDTS) au-delà de 110-120°. Cet aspect pourrait être encore amélioré par le passage à une technologie de déposition de la couche par phase vapeur [104-Kobrin, 99-Mayer], ou bien par un changement de silane. Ces perspectives sont en cours de dimensionnement.

Par ailleurs le passage à un débit supérieur d'expériences nécessite l'intégration du dispositif dans l'ensemble des éléments de la plateforme robotisée. Des considérations ergonomiques sont à prendre en compte. La monocouche de silane est complètement transparente, la présence des plots ne peut être détectée que par la mise en évidence du différentiel de tensions de surface qui constitue un souillage des puces. Le positionnement robuste des puces dans les robots est rendu possible par la présence de marques en croix précisément disposées aux coins supérieurs des blocs de 10x10 plots. Une numérotation des blocs repère le sens de rotation des puces (Figure 35). Ces marques sont en aluminium. Elles sont visibles en lumière ambiante et en fluorescence. Leur utilisation sera détaillée dans le chapitre consacré à l'imagerie (3.1).

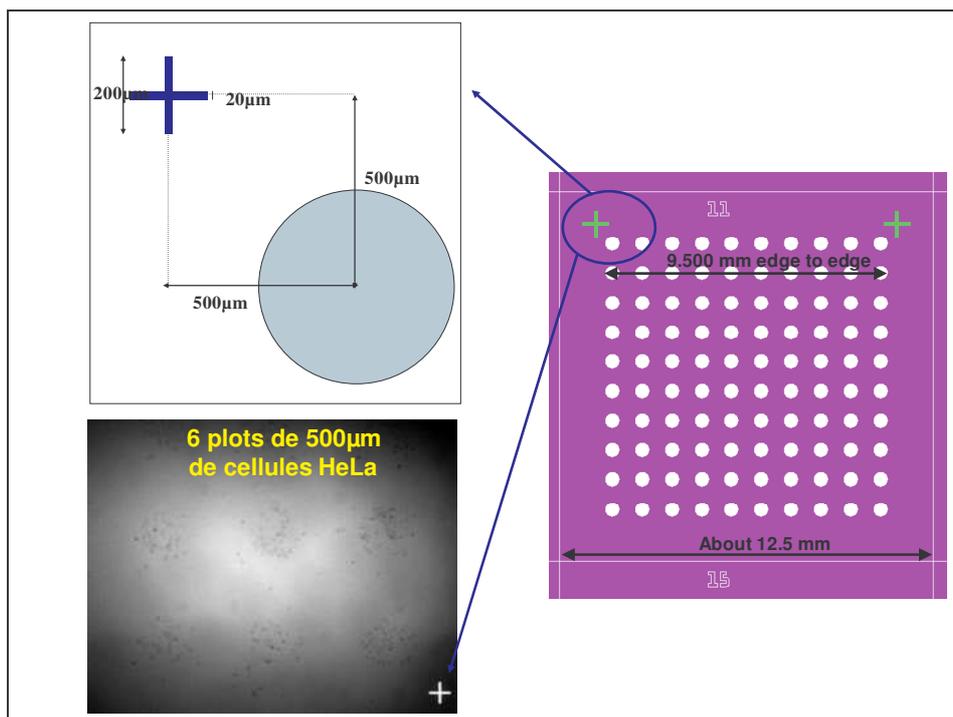


Figure 35 : Système de positionnement pour l'intégration dans les éléments robotisés. Le schéma à droite reprend les éléments de la Figure 25. Les croix de positionnement en aluminium de 200 µm de côté et large de 20 µm sont situées à 500 µm en haut à gauche et à droite des deux plots en haut à gauche et à droite de chaque bloc de 10×10 plots. Un exemple de visualisation en lumière visible à l'extrémité d'une matrice de 2×3 plots de cellules HeLa est présenté en bas à gauche. L'image est inversée par le microscope (grossissement 5X).

Remarque sur le vieillissement :

Le vieillissement des couches de SAM était un problème majeur des premières tentatives de fabrication. Il n'a pas été étudié de manière spécifique sur cette méthode de fabrication industrielle. Nous pouvons toutefois remarquer qu'un stockage au noir à l'ambiance permet de conserver les propriétés de tensions de surface pendant plus d'un an. Une activation de la surface par un rinçage à l'acide nitrique 10% est parfois nécessaire pour restaurer les capacités hydrophiles des plots. Le souillage pourrait être dû à des dépôts organiques à la surface, ou bien à la reptation lente de la monocouche de silane dans les plots hydrophiles. Ce deuxième aspect devrait être diminué par le passage à un dépôt en phase vapeur.

Le design d'un dispositif miniaturisé pouvant supporter la culture de cellules en gouttes répond à un cahier des charges alliant contraintes physico-chimiques et contraintes biologiques. L'utilisation de monocouches de silanes perfluorés permet d'obtenir une matrice de tensions de surface robuste nécessaire à la formation optimale des gouttes de culture cellulaire, tout en maintenant les caractéristiques de biocompatibilité d'une surface de verre. Nous disposons de plusieurs lots de puces fonctionnelles ainsi que d'une méthodologie de caractérisation, qui nous permettent d'envisager sereinement leur utilisation dans des applications biologiques d'intérêt.

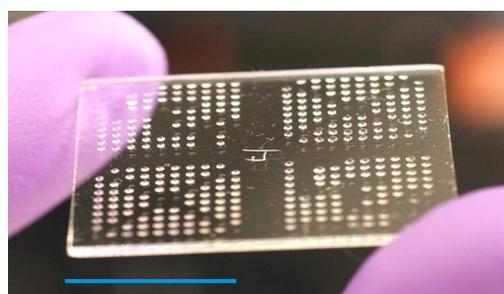


Figure 36 : Matrice de gouttes d'eau sur une lame Memscap. Échelle 1cm. Crédits photo P. Chignon BSIP/CEA

2.2 Robotisation de la formation de nanogouttes de culture cellulaire

2.2.1 Cahier des charges

Dispenser 400 gouttes de 100 nl environ sur des emplacements de 500 μ m de diamètre n'est pas une tâche réalisable manuellement. Le passage à un système robotisé est incontournable. Cette activité s'est développée avec la fabrication des puces à ADN, pour lesquelles des quantités très faibles de sondes sont dispensées sur des plots répartis de plus en plus densément pour augmenter le débit et le nombre de gènes analysés. Plusieurs technologies commerciales existent. La plupart utilisent une pointe creuse ou pleine, qui se déplace par rapport aux puces disposées sur un support mouvant ou immobile. La pointe transfère les liquides d'une plaque de stockage (généralement une ou plusieurs microplaques 96 ou 384) vers la ou les puces. Pour augmenter le débit, plusieurs pointes sont utilisées en parallèle (jusqu'à 1536 pointes sur une tête de dispense pour le MiniTrack de PerkinElmer développé avec VP-scientific). [http://www.vp-scientific.com/packard_biosciences_pin_tools.htm].

L'application de stratégies inspirées des puces à ADN à la dispense de gouttes de culture cellulaire n'est pas immédiate. Les cellules sont des organismes vivants fragiles qui ne présentent pas les mêmes besoins. De plus les dimensions des puces à cellules imposent des demandes différentes que nous allons détailler dans la suite de ce paragraphe.

↳ Positionnement :

La géométrie des puces à cellules telles qu'obtenues dans ce travail possède certaines similitudes avec celle des puces à ADN. La dimension des plots et leur densité sont des valeurs connues de ces dispositifs. Le format de la lame de verre est le standard dans les applications de puces à ADN.

Les principales contraintes imposées au système de positionnement sont la reproductibilité et l'absence de contamination croisée. Cela signifie que les axes de déplacement doivent avoir une précision suffisante pour éviter qu'une goutte ne soit dispensée dans le puits adjacent. De ce point de vue le différentiel de tensions de surface créé à l'interface hydrophile-hydrophobe des plots de la puce permet de ramener une goutte qui tombe sur la frontière du plot vers le centre du plot. Une précision **de $\pm 100\mu\text{m}$ sur les axes X et Y horizontaux** suffit. La précision de positionnement du dernier axe Z vertical est liée aux volumes dispensés pour que la pointe ne se brise pas sur les supports, tout en allant au plus près d'eux.

↳ Volumes dispensés :

Les gouttes de culture cellulaire font environ 100nl. Au cours d'une expérience de criblage, un stimulus chimique est souvent rajouté (molécules à transférer par exemple). Pour ne pas provoquer de toxicité et pour utiliser le moins de réactif précieux possible, nous effectuerons des dilutions de 1 à 10% des solutions en volume dans la goutte. **Le volume minimum dispensé de manière reproductible doit donc être autour de 1nl.**

De plus, d'un point de vue statistique, des variations de dispense de 10 cellules sur 100 par exemple commencent à limiter la significativité des résultats obtenus. La même limite est valable pour les produits rajoutés aux cultures cellulaires. La mesure caractérisant le mieux cette contrainte est le coefficient de variation (CV) défini comme le rapport entre l'écart type et la valeur moyenne pour un nombre de dispenses identiques. **Il doit être inférieur à 10%.**

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

↳ Débit : multiplexage et vitesse :

Au cours d'une expérience haut-débit, de nombreux réactifs différents doivent être dispensés rapidement dans des plots désignés. Les logiciels de contrôle doivent être capables d'implémenter des plans de dépôts complexes. **De plus les performances de lavage entre les prélèvements d'échantillon doivent empêcher toute contamination croisée.**

L'utilisation dans des applications à haut-débit appelle des vitesses de déplacement et de dépôt élevées. Cette préoccupation a été au centre des développements pour les puces à ADN. Les vitesses dépendent du type de robot considéré.

↳ Spécificités des cultures cellulaires

Une des contraintes principales concernant la dispense de cellules réside dans le fait qu'elles ne doivent pas subir « trop » de stress lors de leur dispense. En dehors des stress mécaniques indéniables de l'éjection, autant lors du passage dans la buse que lors de l'arrivée sur le substrat, de nombreux autres facteurs diffèrent des conditions normales de culture (atmosphère, température par exemple). Nous n'évaluerons pas précisément comment toutes les étapes de dispense pourraient influencer sur le développement cellulaire. Le réel point de contrôle concernera les tests cellulaires particuliers mis en place par la suite. D'une part, le passage dans les robots peut entraîner la cellule dans des voies de stress, qui vont pervertir le modèle cellulaire en tant que modèle prédictif (représentation de l'*in vivo* par exemple). De plus cela peut changer drastiquement les résultats si l'étude concerne ces mécanismes du stress en particulier. D'autre part, si l'amplitude de ce stress reste modérée, le modèle cellulaire pourra être récupéré et les résultats de l'expérience pourront conserver leur valeur prédictive, qui reste aujourd'hui à démontrer (discussion chapitre 1.2.2). L'amplitude du stress peut être évaluée en comparant des cellules qui passent par des étapes de dispense, avec d'autres cultures placées dans des conditions standard sur des substrats identiques. Les points de contrôle choisis (viabilité, prolifération, expression d'une protéine particulière par exemple) sont liés à la fonctionnalité particulière de la lignée cellulaire, choisie pour le test particulier mis en place.

De plus, si la comparaison entre le comportement de cellules stimulées (par un candidat médicament par exemple) et celui de cellules témoins cultivées en format standard (boîte de culture, plaque à puits, par exemple) est difficilement exploitable pratiquement, la comparaison entre deux plots de culture cellulaire dispensées et cultivées de manière identique, l'une étant stimulée et l'autre pas, a tout son sens. C'est le parti que nous avons pris dans ce travail. Cette discussion sur la pertinence des modèles cellulaires et leurs contraintes est diffuse dans l'ensemble de ce document.

2.2.2 Choix de la technologie optimale : dispense piézo-électrique

De nombreuses technologies de dispense existent et pourraient répondre aux caractéristiques techniques énoncées ci-dessus. Les déplacements dans les trois dimensions sont une nécessité commune à tout système de dispense et représentent un champ technique bien développé. Il existe trois manières de les réaliser :

- soit la puce se déplace sous la source de liquide. Dans le cas où le débit de dispense (nombre de puces par unité de temps) est élevé, cela implique des transferts de puces sur le support mouvant qui peuvent être coûteux (robotisés) et longs.
- soit la source se déplace au-dessus (ou en dessous voir chap. 2.2.2.4) de la puce. Cela permet de placer de nombreuses puces en parallèle sur un emplacement fixe.
- soit les deux se déplacent parallèlement, ce qui peut être beaucoup plus rapide que les deux autres solutions, mais demande une logistique (logiciels de contrôle) difficile à mettre en place.

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

La dispense de cellules est un domaine encore peu abordé et aucune machine commerciale spécifique n'est disponible. Parmi l'offre abondante de robots de dispense pour des solutions aqueuses de réactifs chimiques ou biochimiques, nous avons comparés quelques principes techniques différents [126-Rose,73-Comley, 127-Dunn].

2.2.2.1 Seringues et Capillaires

S'inspirant des méthodes manuelles de manipulation de liquide, les premiers robots de dispense automatisés ont fait appel à des seringues qui transmettent leurs déplacements à une colonne de liquide pour une aspiration ou une éjection. Afin d'utiliser des volumes plus faibles, les dispositifs terminaux sont constitués de capillaires (ou pointes) qui permettent de dispenser des volumes allant jusqu'au microlitre mais qui restent bien loin du nanolitre nécessaire aux dilutions dans les gouttes. Une optimisation supplémentaire [126-Rose] consiste à former une petite goutte de liquide à l'orifice de la pointe qui touche par la suite l'emplacement de dépôt. Cela permet de former des gouttes de l'ordre de 200 nl. Mais cette méthode est beaucoup moins reproductible. Elle dépend des caractéristiques physico-chimiques du liquide et du substrat considéré. Le volume dispensé peut être très variable.

2.2.2.2 Pointes et contacts

Proches de la technique précédente, des dispositifs constitués d'une pointe solide sans seringue ont été développés [126-Rose]. Le principe de fonctionnement repose sur les propriétés de tensions de surface des liquides. La pointe solide est plongée dans un liquide et ressort avec une petite quantité de celui-ci accrochée à son bout (Figure 37). Elle se déplace ensuite jusqu'à l'emplacement voulu et touche la surface. Le liquide est transféré à la surface. Il est possible de dispenser des volumes de l'ordre de la centaine de picolitres. Du fait de l'utilisation des tensions de surface, les volumes sont très variables et dépendent des qualités des liquides, des pointes, mais aussi des surfaces réceptrices. Par ailleurs avec une pointe simple, il n'est pas possible de dispenser en plusieurs emplacements à partir d'un seul prélèvement. Il faut aller en contact avec le liquide à chaque fois pour recharger la pointe, ce qui entraîne des durées de dispense très longues pour des matrices complexes. Cette limite a été dépassée en se rapprochant de la technique des capillaires. Une pointe creuse permet de retenir une plus grande quantité de liquide si elle est plongée profondément dans les réservoirs, qu'elle va ensuite dispenser partiellement à chaque emplacement. La reproductibilité de cette technologie n'est pas très élevée (CV de l'ordre de 10 à 25%). Elle nécessite des lavages complexes pour éviter les contaminations croisées après avoir touché la surface et elle ne permet pas de dispenser aisément dans des gouttes déjà formées.

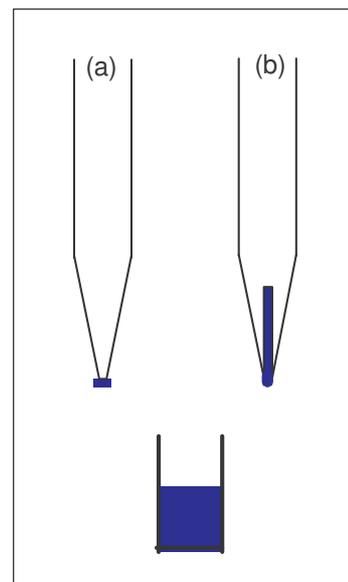


Figure 37 : Schéma de fonctionnement des pointes pour la dispense par contact. (a) pointe solide (b) pointe creuse. La pointe transporte un petit volume de liquide à son extrémité.

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

Le réservoir des pointes de contact peut être construit d'une autre manière avec la technologie Pin-and-ring™ [Affymetrix 417 Arrayer, Figure 38]. Lors du prélèvement, une petite quantité de liquide (environ 1-2 μ l) est retenu dans une bague par les tensions de surface. La pointe solide passe à travers le film liquide pour en récupérer une faible quantité. En descendant plus bas, elle touche la surface et transfère le liquide. Les mêmes limitations en terme de volumes et de multiplexage que pour les pointes solides s'appliquent.

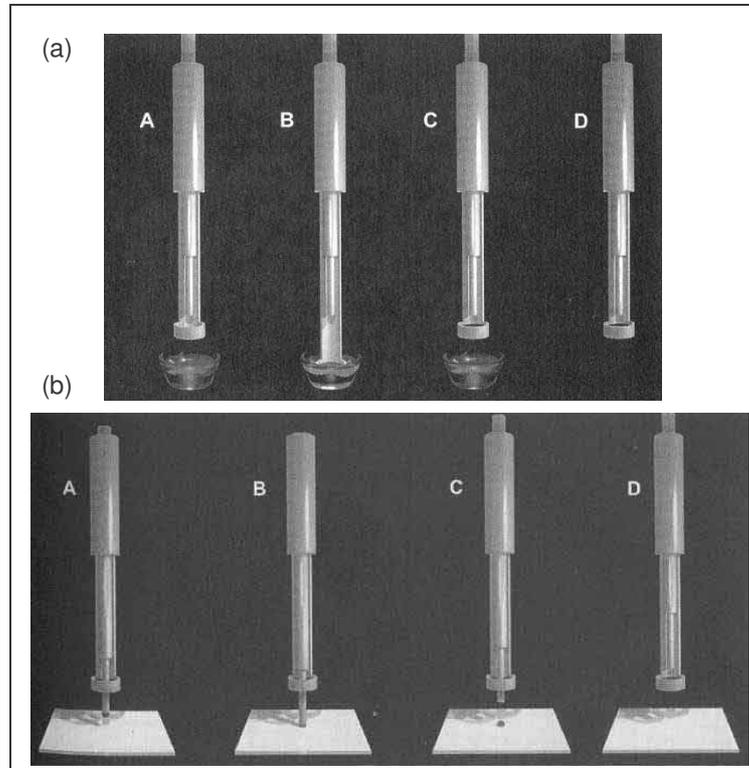


Figure 38: Principe de fonctionnement de la technologie Pin-and-Ring. (a) Prélèvement. Le liquide est retenu en film par les tensions de surface dans la bague. (b) Dépôt. La pointe récupère le liquide en traversant le film et touche la surface pour le transférer

2.2.2.3 Dispense sans contact :

Pour éviter les contacts entre l'outil de dispense et la surface à matricer, la dispense de liquide s'apparente à un jet (ou spray) de la solution prélevée. Ces techniques s'inspirent des technologies développées pour les imprimantes à jet d'encre. Elles sont basées sur la propagation d'une onde de pression à travers un fluide confiné dans une pipette dont l'orifice est petit (20-100 μ m de diamètre). L'onde de pression doit être assez forte pour pousser le liquide vers l'extérieur de la pipette. Lors de sa rétractation, les tensions de surface séparent le liquide en une goutte ayant une vitesse d'éjection assez élevée (de l'ordre de la dizaine de m/s). Plusieurs ondes peuvent être créées en séquence jusqu'à de hautes fréquences (1kHz généralement). Ainsi une grande gamme de volumes dispensés peut être envisagée puisqu'il suffit de faire plusieurs picogouttes les unes à la suite des autres pour obtenir un volume plus important.

Une première possibilité pour créer l'onde de pression consiste à chauffer localement le liquide dans le capillaire (imprimantes BubbleJet de Canon par exemple). Une bulle de vapeur se forme et pousse le liquide vers l'extérieur. Lorsque le chauffage s'arrête la vapeur se condense et le liquide se retire, en éjectant une goutte. Le principe de fonctionnement de ces appareils semble ne pas pouvoir convenir aux contraintes de dispense des cellules ou des

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

molécules biologiques du fait des élévations de température. Des applications de ce type ont été démontrées mais ne permettent pas de conclure à son innocuité [134- Xu].

Une deuxième méthode d'éjection par pression utilise des microvalves (solénoïdes par exemple). Une pression constante est appliquée sur le liquide au-dessus de la valve. Lorsque celle-ci s'ouvre la pression est transmise en dessous et le liquide est poussé. Lorsque la valve se referme, la pression descend et la goutte est éjectée. Les déplacements de la valve sont très reproductibles mais les volumes accessibles sont trop élevés pour nos applications (de 4 à 8 nl). Cette technologie peut être utilisée pour la dispense des cellules uniquement, une autre technique devant être mise en place pour l'ajout de réactifs en faibles quantités.

Enfin un dernier mode de fonctionnement consiste à déformer le capillaire à l'aide de céramiques piézo-électriques enserrant la pipette [133-Hsieh]. Lorsque les éléments piézo-électriques se contractent sous l'effet d'une tension, la section de la pipette diminue et le liquide est poussé vers l'extérieur. Le retour à l'équilibre a lieu lorsque la tension est annulée ou inversée, le volume de la pipette augmente et la goutte est éjectée. Ce système à l'avantage de fonctionner pour une grande gamme de volumes dispensés puisqu'une picogoutte contient environ 0,5nl. Par contre à la différence des systèmes utilisant des microvalves, la présence de bulles d'air dans le système fluide perturbe énormément son fonctionnement. Un soin tout particulier doit être pris quant à leur éradication.

Par ailleurs ces systèmes sont très coûteux et utilisent un volume mort très important. Un réservoir sur lequel est appliquée l'onde de pression doit être rempli. Il a généralement un volume de plusieurs microlitres. Ce réservoir est régulé en pression par un système fluide externe, dont le fluide (généralement de l'eau) est en contact avec le liquide à dispenser. Cela implique qu'une partie du contenu du réservoir se dissout dans le fluide de régulation et est perdu. De plus le remplissage se fait par aspiration de la solution à déposer dans un réservoir externe (généralement une microplaque 96 ou 384 puits). Les pipettes étant fragiles, elles ne peuvent descendre au fond des puits et n'aspirent donc pas toute la solution disponible. Enfin cette méthode de dispense par onde de pression n'est pas réellement sans contact puisque le liquide touche les parois internes de la pipette. Pour éviter les contaminations croisées, il est nécessaire de procéder à de nombreux lavages de celle-ci lors des cycles de remplissage.

2.2.2.4 Perspectives : éjection acoustique

Obtenir une dispense réellement sans contact revient à transférer le liquide directement de la plaque source sur la surface de destination. Richard Ellson (Picoliter Inc. devenu Labcyte Inc.) [129, 130, 131-Ellson] a eu l'idée originale d'utiliser une technique connue depuis 1989 [132-Elrod] pour des applications en biologie. Des ondes acoustiques sont focalisées aux environs de la surface du liquide en contact avec l'air. La focalisation transmet de l'énergie à la surface et permet d'arracher une goutte de liquide des tensions de surface. La goutte est recueillie sur la puce en face de la plaque source. La plaque source est située en dessous des puces, les gouttes sont maintenues sur la surface par les tensions de surface.

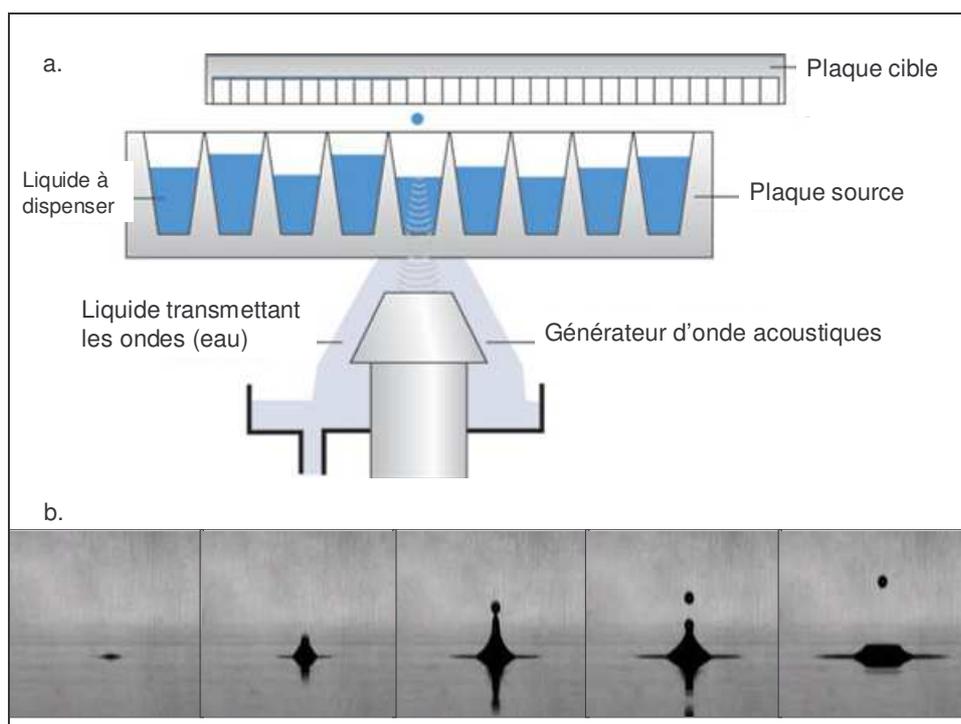


Figure 39 : Principe de l'éjection acoustique. (a) fonctionnement du robot de la société Labcyte. (b) séquence d'éjection d'une goutte de la surface d'un liquide. Explication dans le texte (source Labcyte, www.labcyte.com).

Cette technique permet de dispenser des volumes allant de 0.1nl à 1µl avec une reproductibilité très élevée (CV de 4% environ). Il n'y a aucune contamination croisée, pas de bouchage ni de problème de bulles d'air. Il est aussi possible de diagnostiquer la composition du liquide dispensé par effet Doppler, ce qui conduit à un ajustement très fin des paramètres de la dispense. Enfin les contraintes appliquées au liquide sont très faibles, ce qui permet d'envisager une application pour la dispense de cellules ou de molécules biologiques fragiles [128-Aerni]. Malheureusement l'exploitation de cette technologie protégée n'est pour l'instant possible que pour le transfert de réactifs dans du DMSO de microplaque à microplaque (Echo 550 de Labcyte par exemple), même si des dispenses de cellules ont été réalisées avec succès[‡].

2.2.3 Prototype et modifications

Les caractéristiques de la technologie piézo-électrique semblent s'accorder avec les demandes liées aux puces à cellules pour dispenser à la fois des cellules vivantes et des réactifs plus conventionnels. Toutefois la viabilité cellulaire n'est pas une contrainte prise en compte par ces robots, notamment pour le contrôle de l'évaporation et la taille des buses. Nous avons choisi la société Scienion qui nous a fourni un prototype de son sciFLEXARRAYER, sur lequel ont été adaptées des pipettes d'un diamètre de 90µm qui vont permettre de laisser passer des cellules dont la taille en solution peut varier de 15 à 100µm (brevet Eickhoff, H et al. « Device and procedure for the electrically triggered microdrop release with a dispensing head » US6599479)

[‡] [http://www.labcyte.com/news/events/Small_Talk_Big_Slides_2002.pdf].

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

La machine est composée d'une partie fluïdique classique comportant une pompe péristaltique pour faire circuler le liquide (eau distillée filtrée dégazée) dans les tuyaux connectant les pipettes (jusqu'à 8 en parallèle) et effectuer les prélèvements et les rinçages. La pipette est positionnée sur un bras magnétique se déplaçant sur les trois axes avec une précision de 5 μm dans le plan horizontal (X et Y) et 10 μm pour l'axe Z. Une bouteille dans laquelle la hauteur de liquide peut être réglée contrôle la pression appliquée sur la pipette lors des dispenses. Une autre pompe péristaltique alimente un bain de lavage dans lequel de l'eau circule pour nettoyer l'extérieur des pipettes lorsque celles-ci y sont plongées. Une aire de déplacement permet de recevoir des supports pour le positionnement précis de microplaques aux dimensions standard servant de réservoir de prélèvement, et des puces sur lesquelles les gouttes vont être formées.

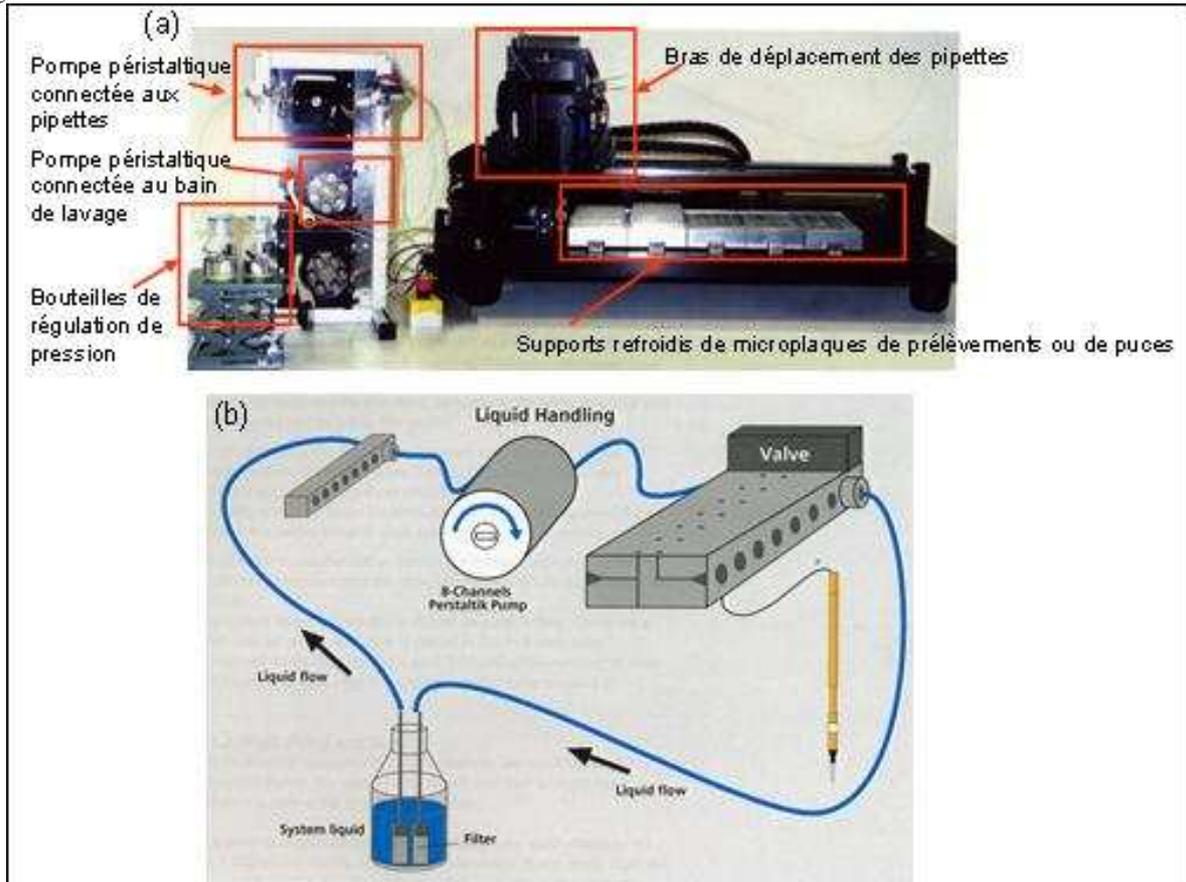


Figure 40 : Principe de fonctionnement du sciFLEXARRAYER v0. (a) vue d'ensemble du robot (b) principe du système fluïdique lié à la dispense. (d'après Scienion GmbH). Explications dans le texte.

Ce prototype incorpore aussi un contrôle de l'évaporation basé sur la maîtrise des conditions atmosphériques. Pour éviter l'évaporation, ou plutôt la ralentir, il est possible de se placer dans des conditions où l'humidité ambiante approche les 100%. Une première possibilité de réalisation passe par l'apport d'eau sous forme de vapeur directement. Cependant l'apport de vapeur se distribue dans toute l'enceinte du robot. Il empêche la pipette de sécher après les lavages par exemple, ou pose des problèmes de courts-circuits au niveau des connexions piézo-électriques. De plus la vapeur peut constituer un problème pour maintenir une stérilité relative de l'enceinte de dépôt.

La seconde possibilité consiste à abaisser la température pour passer en dessous du point de rosée. De cette façon on favorise le passage sous forme liquide de l'eau présente sous forme de vapeur dans l'air ambiant. Par exemple pour une atmosphère française de printemps classique à 35% d'humidité et 22°C (à l'intérieur), le point de rosée se situe à 6°C comme le montre la figure ci-dessous (Figure 41).

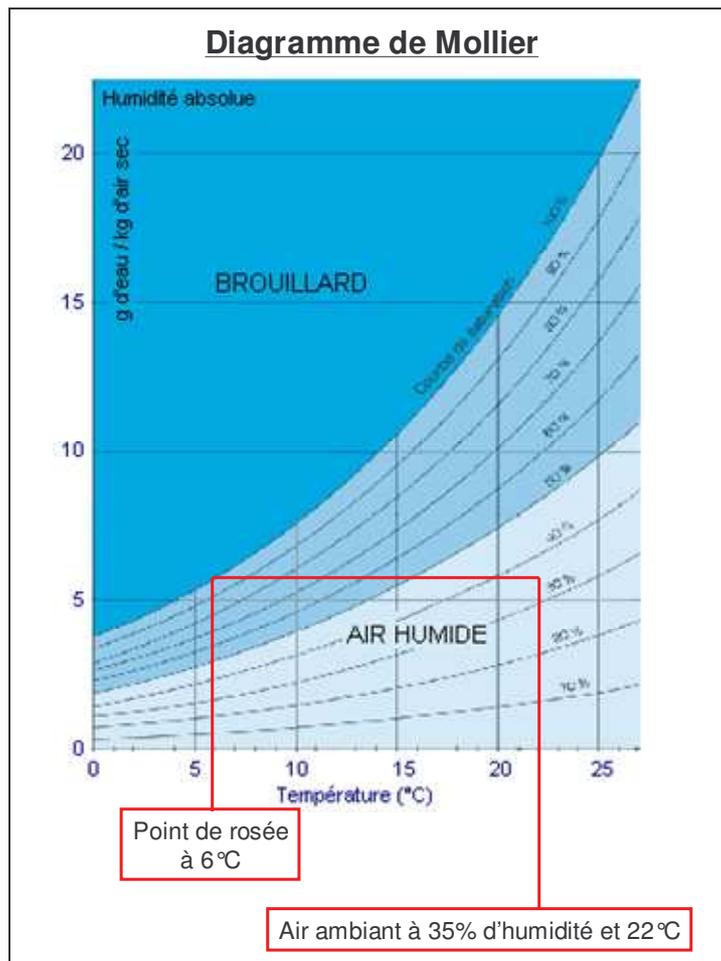


Figure 41 : Utilisation du diagramme de Mollier pour identifier le point de rosée. La correspondance entre les conditions de l'atmosphère ambiante et une humidité totale à quantité d'eau constante est tracée.

En réalité nous sommes obligés de nous placer juste au-dessus du point de rosée pour ne pas provoquer un surplus de condensation qui, plus que compensant l'évaporation, augmenterait le volume des gouttes et pourrait provoquer des fusions entre gouttes voisines ou des modifications de concentrations préjudiciables aux cultures cellulaires.

Cette solution s'adapte très bien au printemps français (ou à Singapour où l'humidité est de 80% toute l'année), mais en hiver, l'air à l'intérieur s'assèche et le point de rosée passe en dessous de 3°C (28% d'humidité et 22°C à l'intérieur par exemple, donnent un point de rosée à 2.6°C). A ces températures, les cellules subissent un stress conséquent et inacceptable. De plus les variations constatées nous empêcheraient de comparer des résultats provenant de deux moments différents. Les deux approches sont combinées dans un système retro-contrôlé, qui reste dans des conditions identiques quelque soit la saison : environ 40% d'humidité apportée par un humidificateur, couplé avec un refroidissement constant des puces à environ 8°C. Une sonde hydrométrique active l'humidificateur.

Le contrôle de l'atmosphère en humidité dans l'enceinte des robots de dispense est disponible en entrée de gamme chez tous les constructeurs et démontre son intérêt. A l'époque de l'acquisition du robot, tous les développements restaient à faire.

2.2.4 Mise en place du sciFLEXARRAYER : 1^{ers} résultats

Vérifier la viabilité et la capacité des cellules à être transfectées est le principal prérequis à l'utilisation de ce robot dans des expériences de puces à cellules complexes.

2.2.4.1 Calibrages

Pour dimensionner ces expériences, plusieurs calibrages sont nécessaires. Le diamètre des pipettes fournies par Scienion est très reproductible mais le procédé de fabrication est encore manuel et influe sur le reste des dimensions (longueur, forme du capillaire). Les paramètres des piézo-electriques (tensions, durée du pulse) pour une éjection optimale s'en ressentent et varient de manière importante selon les pipettes même si des zones de fonctionnement corrélées au diamètre peuvent être identifiées. De façon absolue, ces volumes dépendent aussi étroitement de la solution dispensée notamment à cause de la viscosité, de la densité et des forces de tensions de surface. Pour des solutions de caractéristiques proches comme l'eau, le PBS ou les milieux de cultures (avec ou sans SVF), les variations sont minimales (non mesurables avec les méthodes employées).

- **Volumes éjectés :**

Pour vérifier des données fournies plutôt imprécises (sans garantie du constructeur) qui stipulaient que toutes les pipettes éjectaient des gouttes d'un volume de 500 pl, indépendamment de leur diamètre, deux méthodes ont été employées.

La première a été utilisée par la suite par le constructeur pour ses propres caractérisations. Elle consiste en la mesure du volume construit par l'éjection de plusieurs milliers de gouttes. Le volume est récupéré dans un tube et pesé sur une balance de précision. La reproductibilité de cette méthode n'a pas permis d'obtenir des mesures fiables. Le volume mesuré dépendait de l'humidité de la pièce et montrait des variations très importantes. Le liquide s'évaporait rapidement (avant fermeture du tube et/ou pendant le transfert vers la balance).

La deuxième méthode repose sur l'analyse des images des gouttes prises « en vol » par la caméra de vérification (Figure 38). Le diamètre des disques est mesuré sur plusieurs dispenses puis le volume est extrapolé à une sphère. La dimension de l'image est calculée en mesurant les déplacements de l'axe X (horizontal, mais vertical sur la figure) plus précis que l'axe Z (horizontal sur la figure). Les résultats sont variables mais permettent de donner un ordre de grandeur plus précis que les mesures du constructeur. La figure (Figure 42b.) présente un exemple de résultats pour 3 pipettes de différents diamètres, comparés au volume calculé pour une goutte qui aurait le diamètre de la pipette. Les gouttes sont plus grosses que l'orifice de la pipette. La variabilité du volume pour la pipette de 70 μ m de diamètre s'explique par la forme non sphérique des gouttes dispensées (plusieurs diamètres peuvent être considérés). La forme sphérique des gouttes a été vérifiée par la suite en tournant la même pipette dans le plan de l'image (autour de l'axe Z).

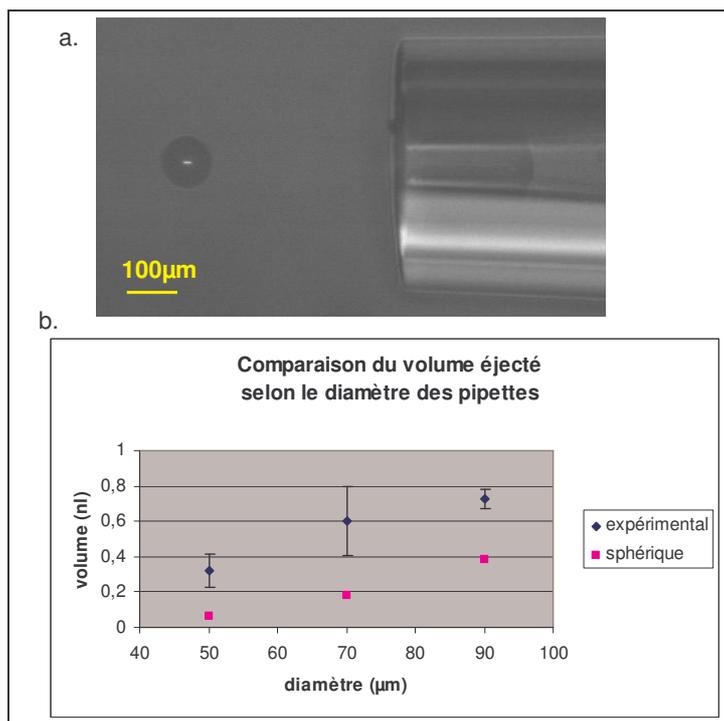


Figure 42 : Calibrage du volume des gouttes éjectées – (a) exemple d’image utilisée pour les mesures. Il s’agit d’une pipette dont le diamètre interne mesure 90µm. Les gouttes sont formées en excitant la céramique piézoélectrique avec des pulses de 115V d’une période de 47µs. (b) comparaison des volumes de gouttes éjectées en fonction des diamètres des orifices des pipettes (série « expérimental »), par rapport au volume d’une goutte dont le diamètre serait celui de la pipette (série « sphérique »). Les barres d’erreurs représentent les écarts types

- Volumes prélevés

Le système de circulation des liquides est particulier à chaque machine. Les pompes appliquent des forces réglées par des vis de serrage par exemple. Les éléments fluidiques vieillissent (les tuyaux ramollissent) et doivent être contrôlés fréquemment. Ces comportements influent sur le fonctionnement des pompes et les volumes qu’elles entraînent. Plusieurs calibrages ont été effectués au cours de la thèse. Un exemple est donné dans la Figure 43. Le volume prélevé ne dépend pas de la pipette utilisée. Les variations observées au fur et à mesure des expériences (vieillessement) ne sont pas significatives.

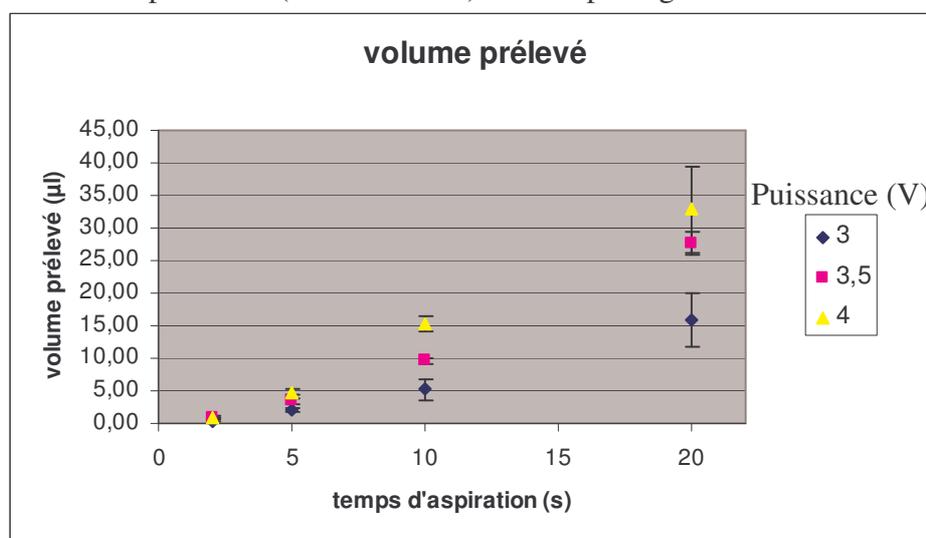


Figure 43 : Exemple de mesure de volumes aspirés par les pompes en fonction de la tension appliquée et des temps d’aspiration - les barres d’erreur sont les écarts types

- Contaminations croisées

Nous avons vérifié que nos protocoles de lavages permettaient d'éviter les contaminations croisées, même si certaines optimisations ont été nécessaires. La figure ci-dessous (Figure 44) présente une dispense d'oligonucléotides fluorescent avant et après lavage.

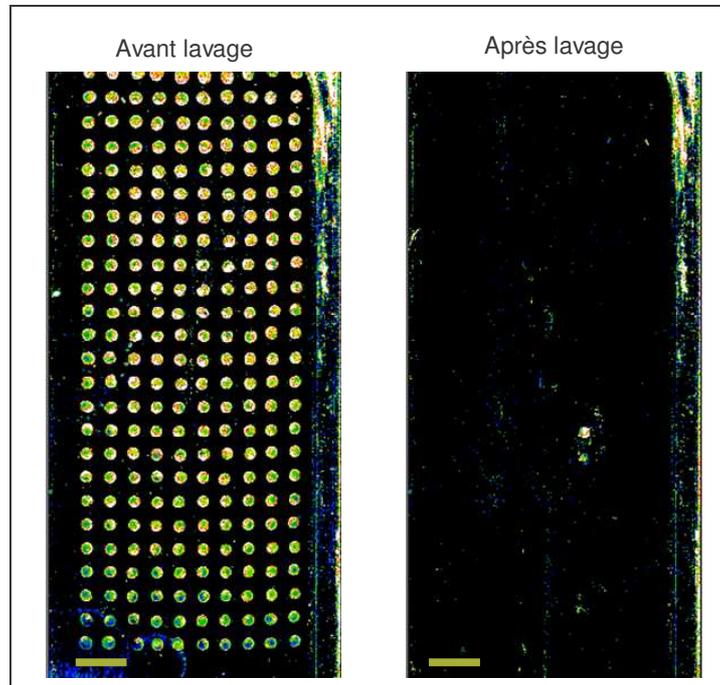


Figure 44 : Effet des lavages sur la contamination croisée. Dispense d'une matrice 10*25 plots de 100 gouttes de dUTP cy3 avec une pipette de 70 μ m de diamètre directement après prélèvement (à gauche) et après prélèvement et lavage automatique de la pipette (à droite). Aucune molécule fluorescente n'a été déposée après les lavages. Les deux images ont été prises avec des réglages du scanner identiques (temps d'exposition, gain et bruit de fond).

- Variabilités de la dispense

La variabilité de la dispense a été évaluée pour des solutions homogènes de molécules dans un premier temps. Nous avons utilisé une solution d'une molécule fluorescente. La reproductibilité a été évaluée en mesurant la fluorescence (moyenne d'intensité par plot). Différents nombres de pico-gouttes ont été dispensés par plots. Plusieurs prélèvements ont été effectués. La figure ci-dessous (Figure 45) présente la mesure d'intensité en fonction du nombre de gouttes par plot qui reproduit une dépendance linéaire en fonction de la quantité de molécule fluorescente. Les écarts observés pour différents prélèvements ont du même ordre de grandeur que les écarts entre plots. Le CV est d'environ 15% de plot à plot et 10% pour différents prélèvements. Cela représente une variabilité conséquente bien au-delà des spécifications requises dans le cahier des charges.

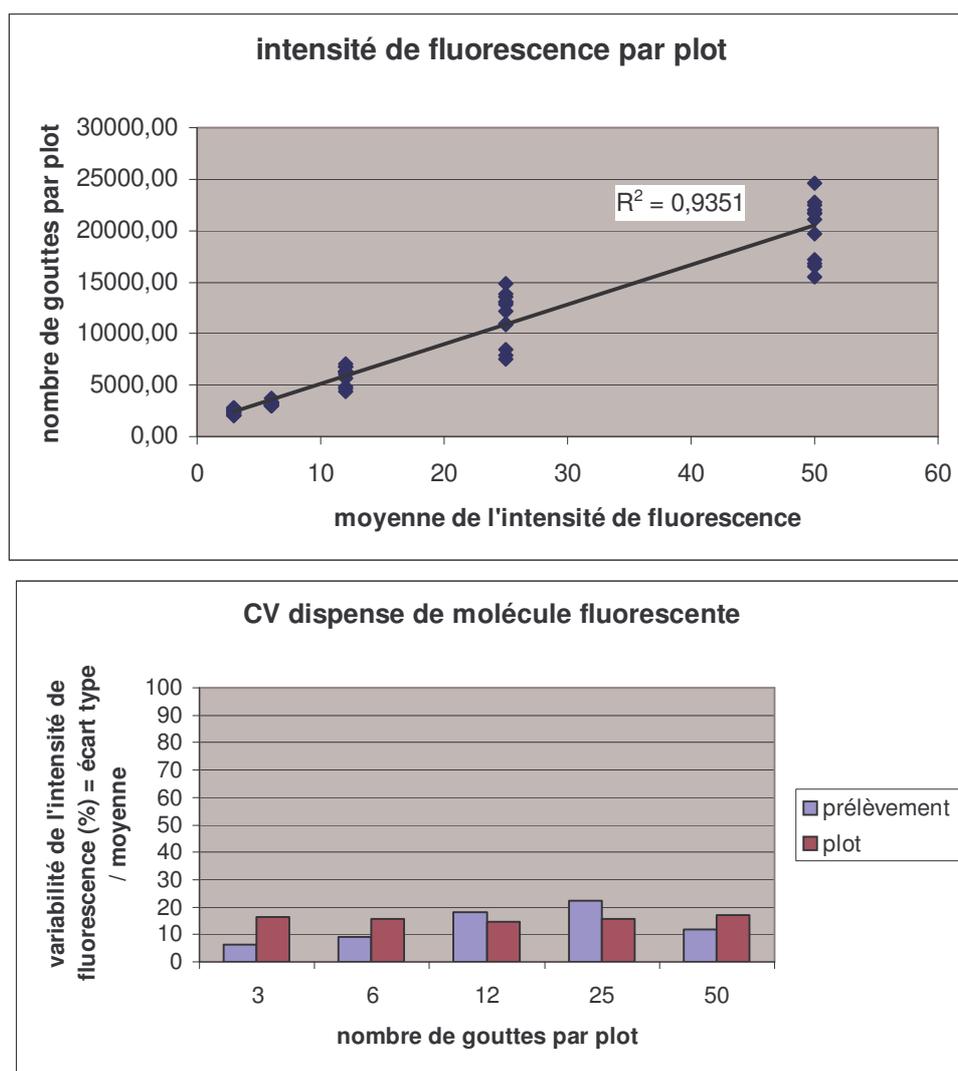


Figure 45 : évaluation du CV de la dispense de molécules fluorescentes. En haut, la linéarité de la dépendance entre l'intensité de fluorescence et la quantité de molécule fluorescente permet de conclure à une dispense reproductible (coefficient de corrélation R^2 sur le graphique). En bas la variabilité des dispenses ne dépend pas du nombre de picogouttes dispensées. Elle est aussi élevée entre plusieurs prélèvements qu'entre chaque plot. (30 plots par condition)

De la même manière nous avons cherché à évaluer la reproductibilité de la dispense en terme de nombre de cellules. La variabilité provient essentiellement du fait que la dispense de cellules s'apparente à un tirage au sort d'un échantillon d'une population. Par exemple pour une concentration de cellules HeLa à $5 \cdot 10^5$ cellules/ml, il y aura en moyenne 1 cellule toute les 4 gouttes de 500pl dispensées. Cependant il semble difficile de prédire la variance d'une telle distribution. Nous avons compté manuellement le nombre de cellules par plot après 1 jour de culture dans les gouttes sur un bloc de 100 plots. Le comptage des cellules juste après la dispense est très difficile pour des raisons d'observation : la goutte crée des zones d'ombres optiques qui cachent toutes les cellules en périphérie (voir Figure 52, chapitre 3.1). Pour pouvoir les imager à plat, il faut leur laisser le temps de s'accrocher à la surface pour que les traitements de lavage des gouttes n'apportent pas une variabilité de décrochage supplémentaire. Les résultats sont présentés sur la Figure 46.

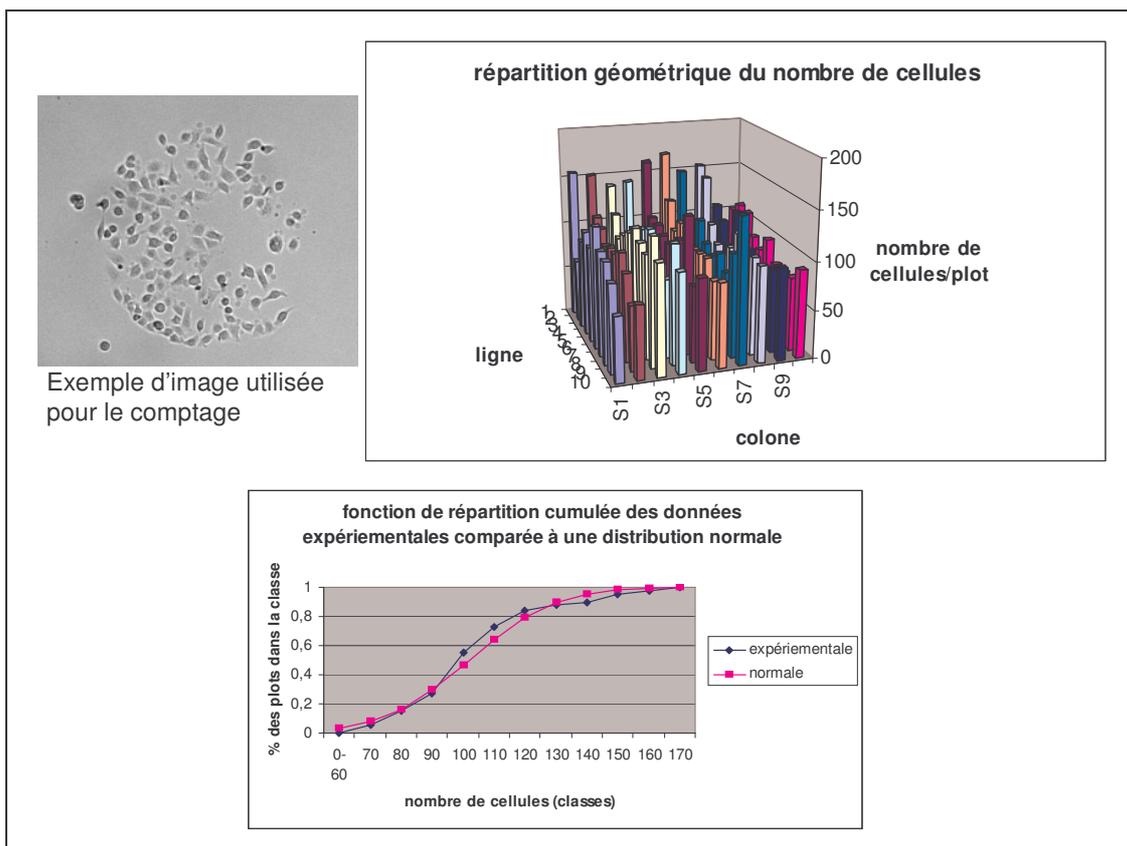


Figure 46 : 1^{ère} étude de la répartition du nombre de cellules par plots – des cellules HeLa sont dispensées à la concentration d'environ 5.10^5 cellules/ml en 250 picogouttes d'une pipette de 70 μ m de diamètre, les observations ont lieu 1 jour après la dispense, après fixation au PFA4% - le comptage est manuel. La distribution du nombre de cellules par plot paraît suivre une loi normale (test Kolmogorov-Smirnov, rejet à 5%)

Pour une concentration de départ de l'ordre de 0,5 cellules/nl et une dispense de 250 gouttes avec une pipette de 70 μ m (environ 500pl/goutte), la concentration moyenne au sein des gouttes après un jour de culture est d'environ 100 cellules, pour environ 62,5 cellules théoriquement dispensées. Cela pourrait attester d'un bon développement cellulaire puisque la prolifération aurait repris dans la goutte. Le temps de génération des cellules HeLa en conditions standard de culture est de l'ordre de 24h. Cependant les incertitudes sur le volume des gouttes (± 200 pl pour les pipettes de 70 μ m) ne permettent pas de conclure dans ce sens. Par ailleurs, nous avons constaté par la suite que les méthodes de comptage de la concentration dans la pipette n'avaient qu'une précision de l'ordre de 10%, ce qui ne permet pas de calcul absolu de la prolifération.

La variabilité de la distribution de cellules par plot est d'environ 20%. Elle est plus élevée que celle observée plus haut pour les molécules fluorescentes, du fait du volume des cellules. Des expériences indépendantes avec des billes de latex ont confirmé ce résultat. Les conséquences de ces mesures sont très importantes en terme d'analyse de données issues de ce système. Plus particulièrement, toute molécule ou traitement visant à modifier le nombre de cellules par plot ne pourra pas être analysé simplement si son action ne dépasse pas la variabilité de ce paramètre, ce qui n'est pas fréquent pour des tests couramment effectués (toxicité, prolifération par exemple). Cette considération sera omniprésente dans le chapitre 4.

2.2.4.2 Validation : premiers essais de transfections automatisées

Nous avons démontré la faisabilité d'expériences de transfections sur des lignées cellulaires en utilisant le système de dispense piézo-électrique et les puces fonctionnalisées Memscap. Les expériences ont été conduites selon le protocole décrit dans la Figure 47. Les cellules (HeLa) et les réactifs de transfections ont été dispensés le même jour. La dilution des réactifs de transfection s'est effectuée en déposant 5 fois moins de picogouttes que pour obtenir les gouttes de culture cellulaire. Cette méthode permet de mélanger efficacement les cellules et les réactifs. La reproductibilité de la dispense de cellules avec la pipette utilisée a été préalablement testée pour cette lignée cellulaire. Pour éviter des problèmes de bouchage et pour simplifier l'expérience nous n'utilisons qu'une seule pipette pour toutes les dispenses. Le robot est configuré pour en utiliser 8 en parallèle qui permettront d'augmenter le débit de traitement.

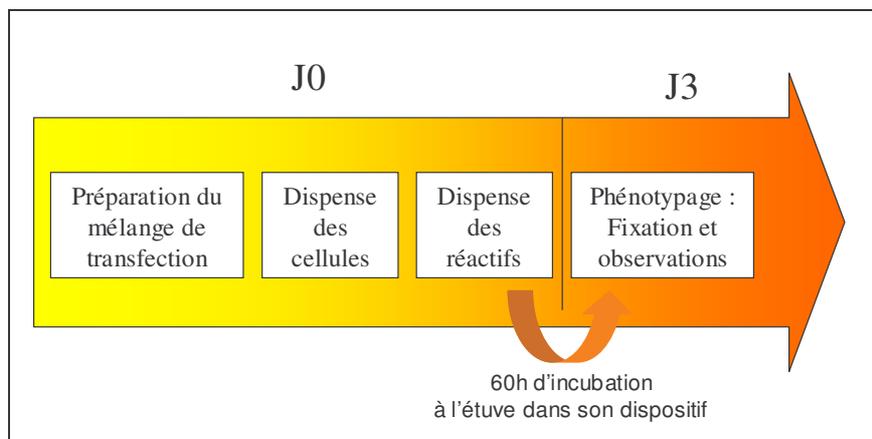


Figure 47 : Protocole de réalisation des premières transfections directes de produits PCR sur puces avec le robot Scienion.

Les échantillons cellulaires utilisées sont issus de boîtes de culture standard dont elles sont décollées en utilisant de la trypsine. Juste avant de réaliser des gouttes avec le robot de dispense, les cultures cellulaires homogénéisées sont placées dans une plaque 96 puits (jusqu'à 200µl par puits). Par la suite, la pipette prélève un volume de la solution contenant les molécules à transférer (complexées avec leur agent de transfection, formant ce que nous appelons un mélange de transfection) dans les puits. Dans le cadre de criblages, les molécules utilisées pour stimuler les cellules sont souvent précieuses (candidats médicaments ou molécules d'ADN par exemple). Les technologies utilisées doivent donc faire le moins de déchets possibles. Pour ce qui nous concerne, la différence entre le volume prélevé par la pipette et le volume dispensé dans les gouttes (appelé volume mort) est élevé puisque nous prélevons environ 3 µl de mélange de transfection pour en dispenser 0,4nl environ (500 picolitres par gouttes de culture cellulaire en 20 exemplaires ici).

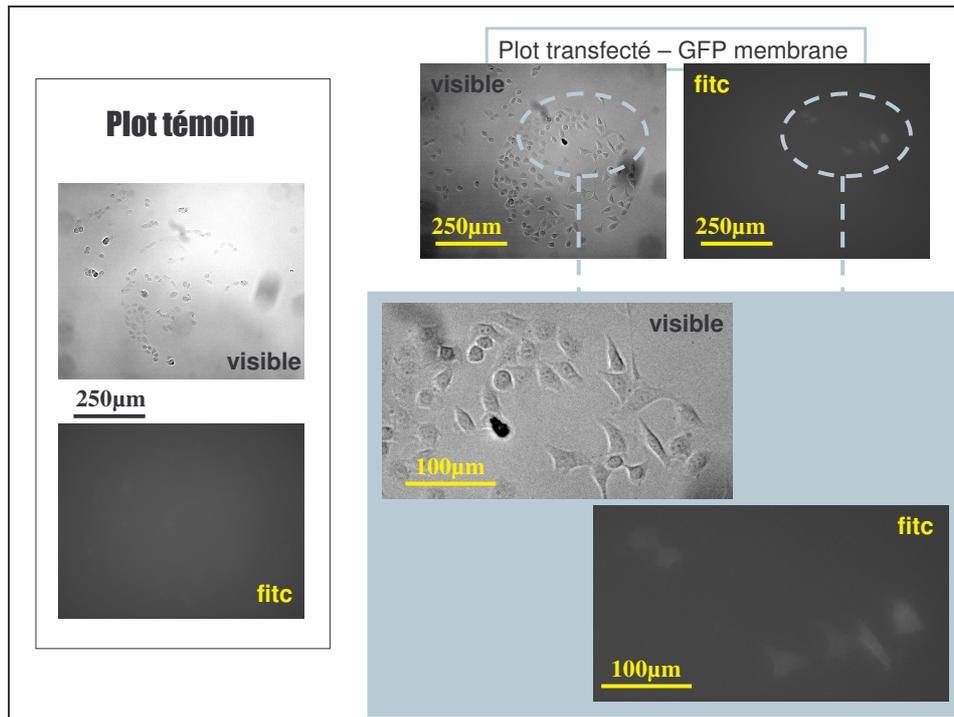


Figure 48 : exemples de résultats de transfection sur puces avec le robot Scienion. Chaque goutte de culture est réalisée avec 500 picogouttes de cellules HeLa (5.10^5 cellules/ml) + 100 picogouttes d'un mélange de JetPEI™ (kit de transfection, Poly-plus transfection, ref : 101-05) et de fragments PCR codant pour l'expression de la GFP dans la membrane. (a) photos d'un puits témoin (cellules sans mélange de transfection) à 3 jours après la dispense montrant des cellules attachées dans un plot de 500µm de diamètre en lumière visible (en haut) et en lumière fluorescente (en bas) au grossissement 20X. Le plot hydrophile est la principale surface d'attachement cellulaire, mais quelques cellules sont présentes en dehors du plot, témoins d'une taille de goutte bien trop importante du fait d'un manque d'optimisation des volumes de dispense. Des dispenses après ces optimisations seront présentées dans le chapitre 4. L'image fluorescente ne montre aucune cellule transfectée. (b) photos d'un plot contenant des cellules transfectées (format identique à (a)). Les cellules d'intérêt sont agrandies dans l'encart bas.

Sur cette première expérience, le rendement de transfection (nombre de cellules exprimant la protéine rapporté au nombre total de cellules dans le plot) de fragments PCR est très faible, Cela pourrait provenir du fait que le protocole utilisé ne permet pas aux cellules de résorber les stress subi pendant la dispense (dispense elle-même ou évaporation par exemple) pour pouvoir produire de manière importante les protéines en question. Des expériences parallèles ont montrées que les cellules exprimaient bien les protéines lorsqu'elles étaient cultivées en macro-gouttes [87-Schaack]. Des études plus approfondies sur la prolifération cellulaire et leur capacité à récupérer de l'étape de dispense seront présentées plus loin (paragraphe 2.2.4.4.2).

Par ailleurs, durant les premières utilisations et malgré les réussites relatives des expériences de transfusions, de nombreux problèmes sont apparus conduisant à un manque de reproductibilité flagrant : parfois plus de 50% des plots d'une puce pouvaient poser problème en terme de dispense de cellules.

2.2.4.3 Optimisations

Comme tout système fluide, la dispense piézo-électrique dépend principalement de l'état de surface de chacun des éléments constituant la machine. La surface ne doit pas gêner la circulation des liquides pour que les contrôles sur les pressions d'entrée et de sortie puissent permettre la formation des picogouttes. La majeure partie des problèmes rencontrés peut être reliée à un problème de qualité de surface. La principale solution sera d'optimiser les conditions de lavages et leur automatisation pour restaurer un état de surface satisfaisant.

2.2.4.3.1 Lavages

Bulles d'air

L'apparition de bulles d'air a été observée à tous les niveaux du système fluide. Dans le système de régulation des pressions et dans les pompes, elles sont souvent le fait de problèmes d'étanchéité des connexions ou de gaz dissous dans l'eau qui forment des bulles par agrégation à la surface des tuyaux. Elles jouent le rôle d'amortisseurs et contrairement à l'eau qui est un fluide relativement incompressible, elles empêchent la transmission des différentiels de pressions nécessaires à la création d'un ménisque puis d'une pico-goutte à la pointe de la pipette.

Dans la pipette, aux deux causes citées ci-dessus peuvent s'ajouter l'aspiration de bulles d'air présentes dans les échantillons prélevés, l'action des surfactants présents dans les solutions dispensées (comme pour les bulles de savon), et la présence d'amas cellulaires qui peuvent boucher la pipette à plusieurs niveaux. Ici encore elles jouent leur rôle d'amortisseurs, mais du fait de la taille des capillaires dans la pipette, elles peuvent aussi provoquer un bouchage difficilement résorbable.

Deux types d'actions peuvent résoudre les problèmes causés par ces bulles d'air. Préventivement, la préparation de solutions dégazées pour le système fluide et sans bulles dans les plaques de prélèvement évite leur apparition trop rapide. Les nettoyages des parties incriminées par des vidanges systématiques (cycles de lavages complets quotidiens par exemple) complètent l'arsenal préventif.

De manière curative, plusieurs possibilités sont offertes pour se débarrasser des bulles malheureusement difficilement évitables. Les protocoles associés à ces manipulations sont en constante évolution et représentent un savoir-faire difficilement transférable par écrit, tant l'efficacité réside dans les détails. La principale caractéristique de ces actions consiste à pousser les bulles d'air vers les sorties de liquide avec les pompes en utilisant de plus grosses bulles créées par rupture de l'étanchéité du trajet fluide (cycles de déconnexion connexion par exemple). Plusieurs protocoles plus détaillés ont été transférés au laboratoire Biopuces.

Etat de surface des pipettes :

La dispense par piézo-électrique est un phénomène essentiellement gouverné par des forces de capillarité. Dans des systèmes microfluidiques comme les pipettes, l'état de surface est primordial. Cet aspect n'avait pas été correctement pris en compte à la fabrication de ce prototype et de nombreuses conditions ont dû être améliorées pour faire face à des dégradations.

L'utilisation d'un robot dans le développement d'un dispositif complexe de puce à cellules est nécessairement différente de celle d'un environnement de production haut-débit pour lequel il est destiné à l'origine. Des périodes d'inactivité prolongées, liées

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

essentiellement à la durée de l'incubation des cellules et à l'analyse des résultats, entraînent un vieillissement de l'installation qui n'avait pas été anticipé. Les conditions de stockage des pipettes par exemple ont dû être revues. Au départ, un stockage où les pipettes étaient connectées au robot devait éviter les conditionnements de surface à répétition, liés aux déconnexions. Il peut être particulièrement long (plusieurs heures) de restaurer la mouillabilité optimale des pipettes après un stockage à sec. Cette option a entraîné la stagnation de l'eau dans les pipettes pendant des périodes longues (plusieurs jours d'inactivité, voire plusieurs semaines parfois), ce qui a été préjudiciable à leur bon fonctionnement. Le stockage à sec a dû être préféré, conduisant à des contraintes logistiques pour le conditionnement des pipettes lors de leur connexion.

L'utilisation du robot pour des applications telles que la dispense de cellules ou de protéines, qui constituent des liquides « collants » (les composés se lient à la surface de la pipette) nécessite des conditions de lavage plus draconiennes que pour des applications classiques. Au-delà des lavages par circulation d'eau à l'intérieur des pipettes et à l'extérieur par trempage dans un bain par exemple, les piézo-électriques permettent de créer des conditions de lavage proches des ultrasons qui facilitent le décollement de molécules adsorbées à la surface du capillaire. Cela permet en outre de s'affranchir plus rapidement des contaminations croisées. Nous avons aussi amené la société Scienion au développement de solutions de lavage spécifiques (contenant des acides plus ou moins concentrés et de l'acétonitrile par exemple), puisque l'eau distillée filtrée ne restaurait plus les propriétés de surface des pipettes.

Malgré tous ces efforts, les problèmes liés à l'état de surface des capillaires ne sont pas complètement résolus. Ils conduisent à un vieillissement rapide des pipettes (bouchage après 2 à 3 mois d'utilisation) qui doivent être considérées comme des consommables, rendant la technologie très chère. Dans les phénomènes de miniaturisation inévitables que rencontre la biologie aujourd'hui, les effets de surface vont devenir de plus en plus limitant dans les systèmes de dispense qui entrent en contact avec les liquides à éjecter. Le développement de solutions réellement sans contact comme la dispense par ondes acoustiques représente une avancée très attendue (chap. 2.2.2.4).

Pour prolonger les qualités des surfaces, la détection précoce des problèmes et la systématisation des lavages sont nécessaires. Elles passent par le développement de l'automatisation du système de dispense et des protocoles.

2.2.4.3.2 Automatisation poussée

Evaluation de la dispense en ligne

Les problèmes décrits ci-dessus impliquent l'impossibilité de lancer une dispense de plusieurs centaines de réactifs sans aucun contrôle : comment savoir que tous les réactifs ont bien été dispensés ? Pour ce qui est de la première création de gouttes (généralement de cultures cellulaires), une vérification visuelle de la présence de la goutte est aisée, même si à ces dimensions des erreurs d'évaluation sont possibles : des gouttes fusionnées peuvent passer pour une goutte simple, le plot n°45 peut être pris pour le n°46 par exemple. Par contre lorsqu'il s'agit d'un ajout de réactifs dans une nano-goutte déjà existante, les contrôles visuels sont impossibles : une augmentation de volume est indécélable. Avec l'aide de la société Scienion, nous avons mis au point un protocole de dispense qui inclut le contrôle de la création d'une goutte après chaque prélèvement. Ce contrôle était déjà possible en dehors de toute séquence automatique, notamment pour adapter les paramètres des piézo-électriques à la pipette et à la solution. Une caméra horizontale permet d'observer le bout de la pipette, un stroboscope réglé sur la fréquence d'éjection rend la visualisation stable. Ce système a été

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

augmenté d'une détection automatique de la picogoutte dans l'image prise par la caméra, par des procédés identiques à ceux développés dans la partie 3 (analyse d'images).

Cela permet aussi de prévenir les problèmes de dispense et le bouchage des pipettes. Si aucune goutte n'est détectée, la pipette ne tente pas la dispense sur le substrat mais va directement effectuer les lavages adéquats, avant de passer à l'échantillon suivant. Cette option peut également être rajoutée à la fin de la dispense d'un échantillon pour vérifier que la dispense s'est bien effectuée sur l'ensemble des plots prévus.

Boucles de contrôles et de lavage.

Sur des cycles de dispense de plusieurs dizaines d'échantillons, une altération des conditions de dépôt apparaît : les paramètres des piézo-électriques doivent être augmentés par exemple. Cela est le signe d'une modification de l'état de surface de la pipette. Les étapes de lavage à l'eau, déjà intensives (30s sous « ultrasons » pour un prélèvement de 10s par exemple), ne suffisent pas à maintenir une surface optimale. Si rien n'est fait, la pipette se bouche après quelques échantillons supplémentaires (de 20 à 40 pour une dispense de siRNA dans du milieu de culture sans sérum par exemple). Une étape de lavage à l'aide de solutions spécifiques, prélevées dans un puit, est nécessaire. Deux possibilités peuvent être envisagées. Un puits de la plaque de prélèvement d'échantillon peut être réservée à ces lavages au cours de la séquence de dispense. Cela entraîne des contraintes sur la préparation des plaques d'échantillons qui sont difficilement compatibles avec des traitements automatisés. Nous avons choisi d'implémenter une boucle conditionnelle dans les séquences de dispense : au bout d'un nombre spécifié d'échantillons dispensés, variables selon les solutions, des tâches de lavage plus intensives sont effectuées.

Les erreurs de dispense rencontrées lors des premières expériences étaient trop nombreuses, tout en étant souvent facilement résorbables par de simples lavages supplémentaires. Cela signifie que l'intégration d'étapes de lavage supplémentaires après chaque échantillon auraient suffi à améliorer drastiquement le rendement des dispenses. Seulement les erreurs étaient ponctuelles (non systématiques) et les protocoles de lavage relativement longs. Quelques dizaines de secondes qui, multipliées par 100 échantillons, pouvaient conduire à plusieurs heures supplémentaires par expériences. Or il fallait déjà plus d'une heure pour dispenser 100 réactifs en quatre exemplaires sur une puce de 400 plots. Les étapes de lavage supplémentaires ont été intégrées à une boucle décisionnelle après le contrôle de la détection automatique des pico-gouttes devant la caméra de visualisation, de manière à ce qu'elles ne soient réalisées que lorsqu'un problème survenait. De la même manière des boucles plus complexes peuvent être imaginés suivant les différents problèmes rencontrés, avec une réponse graduelle aux problèmes. Cela pourrait se traduire par l'algorithme suivant : si aucune pico-goutte n'est détectée, lancer la tâche de lavage 1, tester la dispense, si échec lancer la tâche de lavage 2, etc... Un compromis entre complexité et efficacité doit être mis au point. Ces développements sont en cours de réalisation.

2.2.4.4 Spécificités des cultures cellulaires :

2.2.4.4.1 Amas cellulaires

Les cellules, plus particulièrement les cellules adhérentes, ont tendance à s'agglomérer en solution pour former des amas qui peuvent contenir quelques dizaines de cellules. Chaque cellule fait en moyenne 10-40 μm de diamètre, avec quelques cellules au-delà de 70 μm . Elles peuvent passer individuellement à travers l'orifice de pipettes de 70 à 90 μm (Figure 49), mais un amas bouche irrémédiablement les pipettes. Pour prévenir leur formation, les protocoles de préparation des cellules ont été optimisés et standardisés. Ils contiennent plusieurs étapes de pipetages manuels (avec cônes de 1ml) par aspirations/refoulements, ainsi que le passage sur un filtre de 70 μm . Ces améliorations ont grandement facilité la dispense de cultures cellulaires.

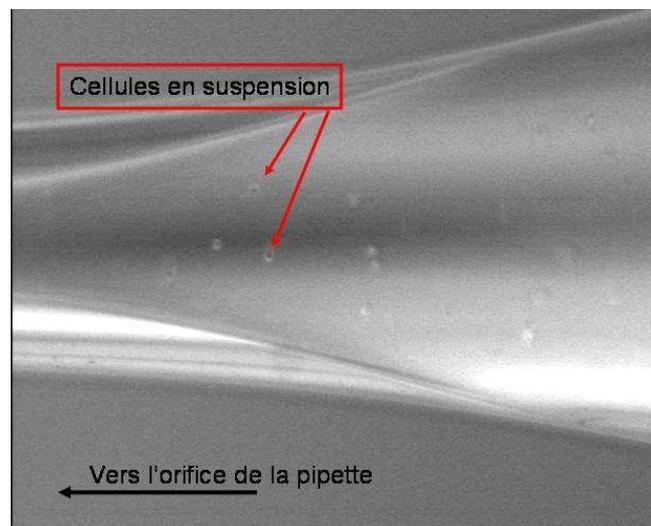


Figure 49 : photographie juste au-dessus de l'orifice d'une pipette de 70 μm de diamètre contenant des cellules vivantes (MCF10A) à la concentration de $2,5 \cdot 10^5$ cellules/ml

La réalisation d'un bloc de 100 gouttes de cultures de 100nl environ (soit 100 picogouttes d'une pipette d'un diamètre de 80 μm) nécessite environ 5 min en intégrant les lavages. Pendant cette période, les cellules au sein du puits de prélèvement ont le temps de s'agréger en amas au gré de leurs rencontres, et surtout ont sédimentées au fond du puits. La pipette prélève alors une concentration très différente de celle du bloc précédent. Une homogénéisation du milieu est nécessaire. En l'absence de tout système automatisé d'agitation disponible qui ne soit pas dangereux pour la pipette, nous utilisons une pipette manuelle pour resuspendre les cellules avant prélèvement. Cette étape manuelle n'est pas envisageable dans le cadre d'un système automatisé et devra être remplacée.

Plusieurs systèmes peuvent être envisagés. Le premier utilise la faible différence de densité entre les cellules et leur milieu (1,04 $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ pour des cellules sanguines jusqu'à 1,1 $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ pour des hépatocytes [143-Neugebauer]). Si cette différence est résorbée, les cellules seront agitées d'un mouvement brownien qui les empêchera de sédimenter. Cette solution a l'inconvénient de devoir changer le milieu de culture naturel des cellules (le liquide doit être biocompatible au sens large du terme) vraisemblablement différent pour chaque type cellulaire, et de plus ne représente pas un moyen efficace de lutter contre les amas. Le deuxième consiste à agiter la plaque de prélèvement avec des moyens conventionnellement utilisés pour les préparations de plaques de réactifs (vortex). Cette solution impose des

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

contraintes aux volumes disposés dans les puits pour que l'agitation ne déborde pas, et semble dangereuse au regard de la fragilité des pipettes de dispense. Enfin une troisième voie consiste à intégrer ce problème directement dans la pipette d'éjection. Avec le système actuel, il a été proposé d'utiliser les piézo-électriques comme moyen d'agitation (en mode « ultrasons »). En dehors des problèmes d'automatisation et de durée que cela implique, la pipette n'est pas adaptée pour supporter ce genre de mouvement fluide qui crée de nombreuses bulles et empêche une dispense reproductible. Les volumes prélevés ne permettant pas de dispenser une puce entière, les problèmes de prélèvements à intervalles longs ne disparaissent pas. Cette dernière possibilité est toutefois très prometteuse et pourra être intégrée dans le design de nouvelles têtes d'éjection.

Enfin la durée de la dispense de cellules, qui peut dangereusement s'allonger lorsque des problèmes fluidiques apparaissent (au-delà d'une heure), pose la question du vieillissement de ce réactif. Les conditions de stockage des cellules au sein du robot ne sont pas idéales pour leur survie. La température est autour de 8°C sur la puce et de 22°C dans la plaque réservoir au lieu des 37°C à l'intérieur d'une étuve pour éviter l'évaporation et l'air ambiant ne contient que 0,035% de CO₂ contre 5% dans l'étuve. Plusieurs criblages pendant lesquels des problèmes fluidiques ont fait durer la dispense ont montré que la présence dans l'enceinte du robot ne devait pas dépasser une heure, ce que les biologistes de projets de recherche associés ont confirmés à l'aide de leur expertise.

2.2.4.4.2 Viabilité/Prolifération

Les considérations des paragraphes précédents montrent que la viabilité cellulaire est très sensible aux conditions de dépôt et plus particulièrement à la concentration cellulaire. Nous avons vu que les contraintes géométriques liées au format micro-gouttes entraînent des marges de manœuvres restreintes en terme de volumes (rapport S₁ plus faible que dans les puits). Pour chaque phénotype analysé (modèle cellulaire et marqueur), la concentration optimale de cellules à dispenser doit être étudiée. Si les cellules sont trop nombreuses dans la goutte elles ne prolifèrent pas ; si elles sont trop peu nombreuses, elles meurent de solitude. Nous prenons l'exemple des cellules MCF10A dont on étudie la prolifération après 4 jours de culture.

Il n'est pas possible d'observer les cellules dans les gouttes de cultures pendant les phases d'incubation. Les éclairages lumineux nécessaires chauffent trop le liquide qui s'évapore très rapidement même si la puce est laissée dans son dispositif de vapeur saturante. Les focales des objectifs de microscope ne permettent pas de faire des agrandissements suffisants et les contraintes optiques des gouttes empêchent un comptage précis des cellules. Pour évaluer la prolifération, nous ne pouvons pas nous contenter de la mesure de la concentration des cellules lors de la dispense puisque les volumes des gouttes ne sont pas connus en détail. Nous avons réalisé de la même manière avec la même concentration cellulaire deux puces de 3 ou 4 blocs de 100 plots. Les concentrations cellulaires sont très proches. Elles ne peuvent parfois pas être différenciées par un comptage manuel. Pour une meilleure précision de comptage nous avons utilisé le Guava EasyCyte System (Guava technologies), un cytomètre de paillasse très efficace. Une puce a été imagée un jour après la dispense par le même protocole de phénotypage (fixation au PFA 4% en bain, marquage des noyaux au Hoechst) que la deuxième 3 jours après.

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

La Figure 50 montre une prolifération dépendante de la concentration de départ. Plus les cellules sont nombreuses au départ, moins elles prolifèrent conformément aux hypothèses. Ce genre d'expérience est effectué lors des procédures de calibrage avant des criblages. Le modèle utilisé ainsi que la cinétique de réaction ont été optimisés par ailleurs (par exemple en utilisant les « macro-gouttes »). Ceux-ci sont considérés comme fixés. Un compromis doit être trouvé entre un modèle de cellules proliférant pleinement et l'obtention d'un nombre de cellules suffisant en fin d'expérience pour pouvoir espérer arriver à des résultats statistiquement significatifs.

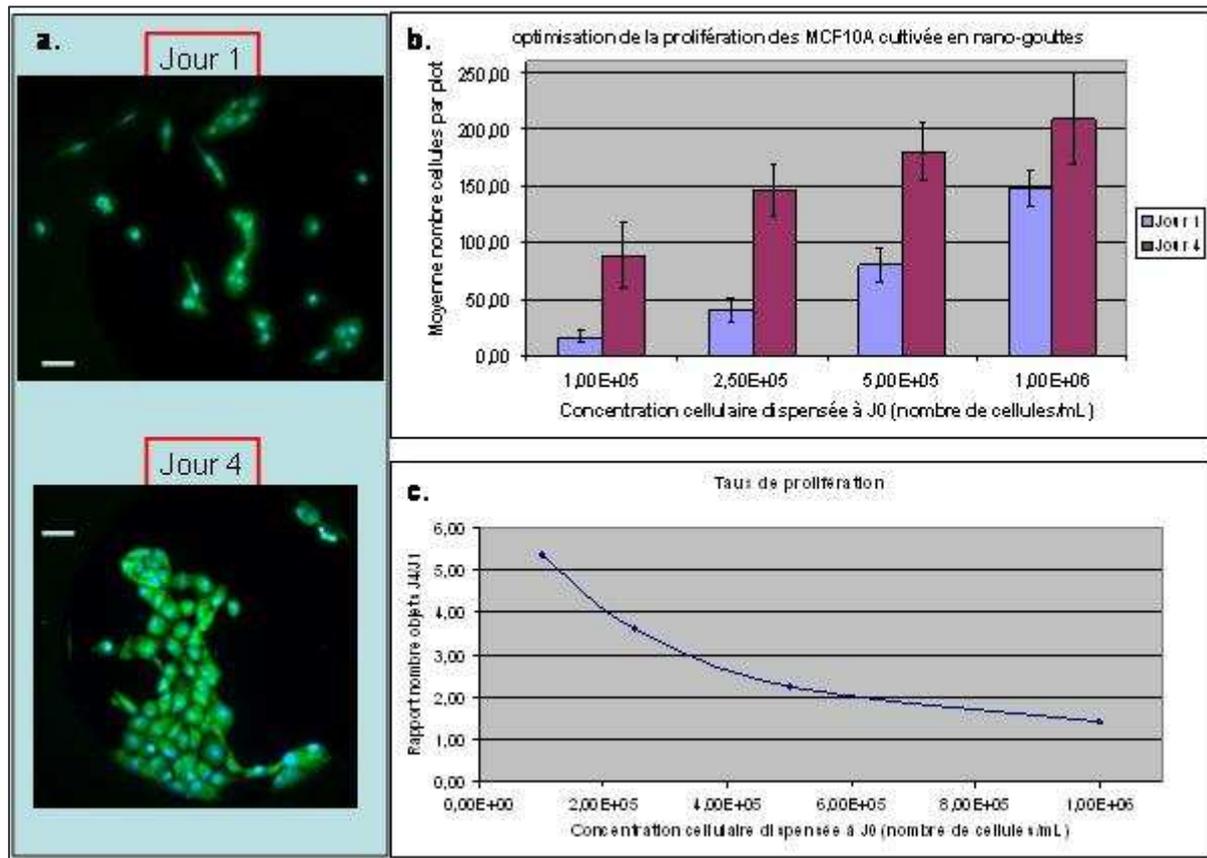


Figure 50 : Exemple de résultats pour l'optimisation de la concentration de dépôt cellulaire. Les cellules MCF10A sont déposées à l'aide du robot Scienion (pipette de 80µm de diamètre, 200 picogouttes par plots) à différentes concentrations à J0. Elles sont phénotypées (imagées et comptées) 1 jour et 4 jours après (J1 et J4). (a) Exemples de plots contenant des cellules après 1 jour et 4 jours de culture. Les cellules sont marquées par trempage avec du Syto10 (vert - Molecular Probes) localisé dans le cytoplasme puis fixées au PFA 4%. Le noyau est marqué au Hoechst (bleu - Molecular Probes) après fixation. Le premier jour les cellules sont attachées au substrat, il y a peu d'amas. Après 4 jours, le développement caractéristique en amas est observé. Echelle : environ 50µm. (b) Les cellules sont détectées automatiquement par analyse d'image (chapitre 3.1) avec le logiciel Pathfinder (IMSTAR). Les résultats par concentration et par jour sont agrégés. Barres d'erreurs : écart type. (c) rapport entre le nombre de cellules détectées par plots à J4 et à J1, par concentration. Interprétation dans le texte.

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

Dans des conditions classiques (boîtes de Pétri par exemple), une population de MCF10A double tous les jours. La première concentration cellulaire ($1 \cdot 10^5$ cellules/ml) permet une bonne prolifération, mais ne conduit pas à un nombre de cellules suffisant compte tenu de la variabilité de la dispense. La troisième ($5 \cdot 10^5$ cellules/ml) au contraire mène à un nombre de cellules suffisant mais le modèle cellulaire pourrait être biaisé pour une multiplication par 2 seulement en 4 jours. La concentration optimale se situe autour de $2,5 \cdot 10^5$ cellules/ml. La dynamique de prolifération est très variable sur cette petite fenêtre de concentration, ce qui implique de pouvoir la déterminer de manière précise et reproductible. Un contrôle de la qualité des cultures cellulaires est indispensable.

Avec les calibrages considérés (500pl par picogouttes), la prolifération du premier jour peut être évaluée à un facteur 1,5 indépendamment de la concentration. Cela est explicable par le fait qu'au premier jour les cellules ne sont pas encore limitées par la quantité de milieu de culture. Cependant, le rapport observé (1,5 à la place de 2) fait état d'une influence de la dispense sur la prolifération. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de mytomicine, une drogue arrêtant la prolifération, qui nous a permis de vérifier cette différence entre le nombre de cellules dispensées et le nombre de cellules après un jour de culture. Le format de culture en goutte joue aussi un rôle puisqu'au bout de 3 jours (entre J1 et J4), le nombre de cellules aurait dû être multiplié par 23. A la concentration optimale, elles perdent environ 1 jour de prolifération.

Nous pouvons en conclure que ce modèle cellulaire n'est pas utilisable pendant 1 jour après la dispense durant lequel elles récupèrent de ce stress et ne se divisent pas de manière optimale, et après le 4^{ème} jour de culture où elles ne prolifèrent plus par manque de carburant. Le protocole et la cinétique utilisée doivent être adaptés à ces constats.

Ces résultats se retrouvent pour d'autres types cellulaires. Nous n'explorerons pas plus avant l'impact de la dispense sur le modèle cellulaire. Les cellules utilisées après optimisation des conditions de cultures prolifèrent et se comportent normalement par rapport aux stimulations qu'elles subissent au cours des expériences (voir chapitre 4). La concentration cellulaire de dépôt dépend de chaque modèle étudié, comprenant le type cellulaire, la cinétique de l'expérience et les volumes des « nano-gouttes ». Le même genre de test sera présenté pour l'application du chapitre 4.

En l'état des technologies actuellement disponibles, la dispense piézo-électrique reste le meilleur choix pour réaliser des dispenses de culture cellulaire et de réactifs dans des micro-gouttes. Pour pouvoir construire une plateforme de puces à cellules robuste, de nombreuses améliorations doivent encore être considérées. Le développement d'une tête de dispense dédiée aux cultures cellulaires pourra permettre de s'affranchir des inconvénients inhérents à l'adaptation de robots utilisés pour des fins bien différentes de leur orientation initiale. Plus particulièrement, la dispense de gouttes contenant 100 nl de culture cellulaire par un robot classique ne permet pas d'obtenir un nombre précis et identique de cellules au sein de chaque plot. Il s'agit d'un prélèvement statistique au sein d'une population d'une concentration donnée. A ces volumes, nous avons vu que la variabilité devient importante (plus de 20%). Celle-ci nous amènera à des questions complexes au moment de l'analyse des résultats (chap 4.4). Le développement d'une pipette pouvant intégrer un comptage des cellules dispensées, conduit par une autre équipe au laboratoire Biopuces, sera une avancée majeure pour cette technologie.

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

La miniaturisation des dispositifs physiques a entraîné le recours à des techniques de réalisation des micro-gouttes de culture cellulaire automatisées et haut-débit qui ont permis la réussite d'expériences de transfection. La mise en place de ces deux éléments a conduit à des optimisations des techniques choisies et à des adaptations des méthodes conventionnelles de culture cellulaire. Celles-ci questionnent directement la pertinence des modèles biologiques étudiés. De nombreuses expériences de mise au point sont nécessaires et ont été dimensionnées et conduites pour évaluer l'adéquation entre le modèle et la culture en « nano-gouttes » et les paramètres optimaux des protocoles (tests de cinétiques par exemple). Cette tendance va s'accroître avec la miniaturisation de l'ensemble des processus d'une expérience biologique. Des changements profonds dans la manière d'analyser les résultats issus de ces travaux s'imposent. Le haut contenu est une nécessité et va permettre de révéler le potentiel des puces à cellules en gouttes.

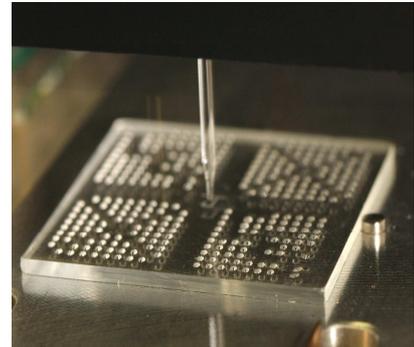


Figure 51 : photo d'une puce Memsicap sur laquelle repose une matrice de gouttes dispensées à l'aide de la buse piézo-électrique Sciension (au-dessus). Deux motifs sont réalisés par absence de goutte : croix et "CEA" en diagonal.

Chapitre 2 : Réalisation de « nano-gouttes »

Chapitre 3

Détection et Quantification du signal

3.1 Microscopie Haut-contenu	92
3.1.1 Acquisition automatique à haute résolution en fluorescence.....	92
3.1.1.1 Parallélisme des traitements : trempages.....	92
3.1.1.2 Contraintes liées à l'acquisition.....	93
3.1.2 Caractéristiques de la plateforme d'imagerie (PathFinder OSA, IMSTAR)	94
3.1.3 Traitement d'images	96
3.1.3.1 Détection.....	97
3.1.3.2 Quantification du signal.....	98
3.1.3.2.1 Résultats obtenus et principe d'analyse.....	98
3.1.3.2.2 Bruit de fond	99
3.1.4 Conditions d'utilisation et optimisations nécessaires	99
3.2 Phénotypage par spectrométrie de masse.....	101
3.2.1 Contexte et méthodologie	101
3.2.1.1 Spectrométrie de masse et protéomique	101
3.2.1.2 Choix de la technique et concept.....	102
3.2.2 Faisabilité : culture cellulaire, viabilité et spectres.....	104
3.2.2.1 Viabilité et prolifération	104
3.2.2.2 Obtention de spectres.....	106
3.2.2.3 Influence du nombre de cellules	108
3.2.3 Signature phénotypique en spectrométrie de masse.....	109
3.2.3.1 Principe	109
3.2.3.2 Différenciation de phénotypes : apoptose et prolifération.....	110
3.2.3.2.1 Conditions expérimentales.....	110
3.2.3.2.2 Stratégie d'analyse	111
3.2.3.2.3 Résultats.....	113
3.2.3.3 Perspectives : applications.....	114
3.2.4 Imagerie de culture cellulaire par spectrométrie de masse	115
3.2.4.1 Principes	115
3.2.4.2 Spectrométrie TOF-SIMS.....	116
3.2.4.3 Preuve de concept.....	117
3.2.4.3.1 Mise au point : étude des contaminations	117
3.2.4.3.2 Imagerie cellulaire (durée, cellules, contaminants).....	118
3.2.4.4 Perspectives	120

Chapitre 3 : Détection et Quantification du signal

Phénotypages haut-contenu

La mise au point de moyens physiques pour réaliser des micro-gouttes a permis d'obtenir un nombre élevé de conditions analysées en une expérience. À l'inverse, le nombre de cellules considérées par condition diminue avec la taille des réacteurs. Par ailleurs, les outils d'imagerie (notamment ceux utilisant la fluorescence) atteignent des résolutions de plus en plus fines qui rendent possible l'individualisation de chaque cellule d'une culture. Ces deux évolutions ont permis la mise en place d'une analyse « haut contenu », qui s'intéresse au comportement de chaque cellule de manière indépendante, caractérisée par plusieurs dizaines de paramètres (voir chapitre 1.3). Dans un premier temps, nous expliciterons l'utilisation de la fluorescence avec les puces à cellules en gouttes. Une illustration dans un criblage en cancérologie sera présentée dans le chapitre suivant (chap. 4).

Le contrôle rigoureux des conditions de culture, les dimensions des échantillons analysés, et les développements en spectrométrie de masse ont rendu possible l'utilisation de cette technique pour la détection des phénotypes cellulaires. Dans un deuxième temps, nous présentons une preuve de concept de cette innovation technique.

3.1 Microscopie Haut-contenu

Ce paragraphe décrit séquentiellement les contraintes et les solutions apportées à chaque étape de l'analyse d'une expérience de criblage sur une puce à cellules par microscopie à épifluorescence. D'autres types d'analyses sont possibles, notamment la luminescence et la colorimétrie, mais elles sont beaucoup moins utilisées que la fluorescence.

3.1.1 Acquisition automatique à haute résolution en fluorescence

3.1.1.1 Parallélisme des traitements : trempages

Le format puce à cellules en gouttes contient plusieurs centaines de réacteurs biologiques indépendants sur un même support. L'analyse par fluorescence nécessite souvent des traitements postérieurs à la stimulation des cellules, que nous avons appelés « phénotypage » (chap 1.). La comparaison des cultures issues de différents plots, qui représente la base de l'analyse, implique un traitement parallèle de la puce dans son ensemble. Le format « lame de verre » donne la possibilité d'effectuer des trempages dans des solutions liquides pour l'incorporation de marqueurs fluorescents, des liaisons d'anticorps, ou plus simplement des rinçages du milieu de culture par exemple. Ce mode opératoire rend l'étape de traitement indépendante du plot considéré. Par contre, une normalisation complexe sera nécessaire si deux puces doivent être comparées entre elles.

D'un point de vue pratique, les trempages peuvent se faire dans des bacs avec plusieurs puces en parallèle. Cela accélère grandement les traitements par rapport au format puits, qui nécessite une opération par puits. Dans les plateformes très haut-débit fondées sur les microplaques, des robots de dispense adéquats ont été fabriqués qui possèdent autant de pointes que de puits (96, 384), ce qui accélère cette étape sans toutefois la rendre parallèle. Ces robots coûtent très chers et utilisent de grands volumes de liquide. Des solutions techniques comme les chambres d'hybridation pourraient aussi permettre de réduire les temps de marquage et d'augmenter la reproductibilité.

3.1.1.2 Contraintes liées à l'acquisition

Le phénotype des cellules est donné par l'intensité de fluorescence de la culture cellulaire, dont nous avons vu le principe au chapitre 1. Pour évaluer la fluorescence, la culture cellulaire est imagée pour chaque longueur d'onde d'intérêt. Des outils très performants sont disponibles commercialement pour prendre des photos de lames de verre sur lesquelles ont poussé des cellules. Nous ne reviendrons pas sur leur fonctionnement précis que nous n'avons pas modifié. Nous précisons toutefois quelques caractéristiques nécessaires à leur choix et à leur adaptation pour des applications de puces à cellules. Pour plus d'informations sur l'imagerie en fluorescence, une revue très complète est proposée dans [« Focus on Fluorescence Imaging » Nature Methods 2 (2005) 901-950].

Les optiques des appareils comme les microscopes ou les scanners ne peuvent pas s'accommoder facilement de la présence de gouttes liquides de petites dimensions (Figure 52). Les éclairages intenses et localisés forment des gradients de température qui accélèrent l'évaporation même si les gouttes sont disposées dans des systèmes saturés en vapeur : les gouttes s'évaporent et de la condensation apparaît très rapidement sur les parois des enceintes (moins de 5 min pour la disparition d'une goutte de 100nl environ). De plus, les gouttes distordent les images par effet de lentille et créent un gradient de lumière (Figure 52) lorsqu'elles sont observées par dessus. Ces deux contraintes sont très importantes puisqu'elles empêchent la réalisation d'expériences où le phénotypage est réalisé en continu. Les cellules doivent être prises en photo à plat sur le substrat. L'utilisation de cellules adhérentes est plus aisée que celle de cellules non adhérentes, même s'il existe des solutions pour les accrocher à la surface de la puce. Dans la suite de notre travail nous n'avons utilisé que des cellules adhérentes.

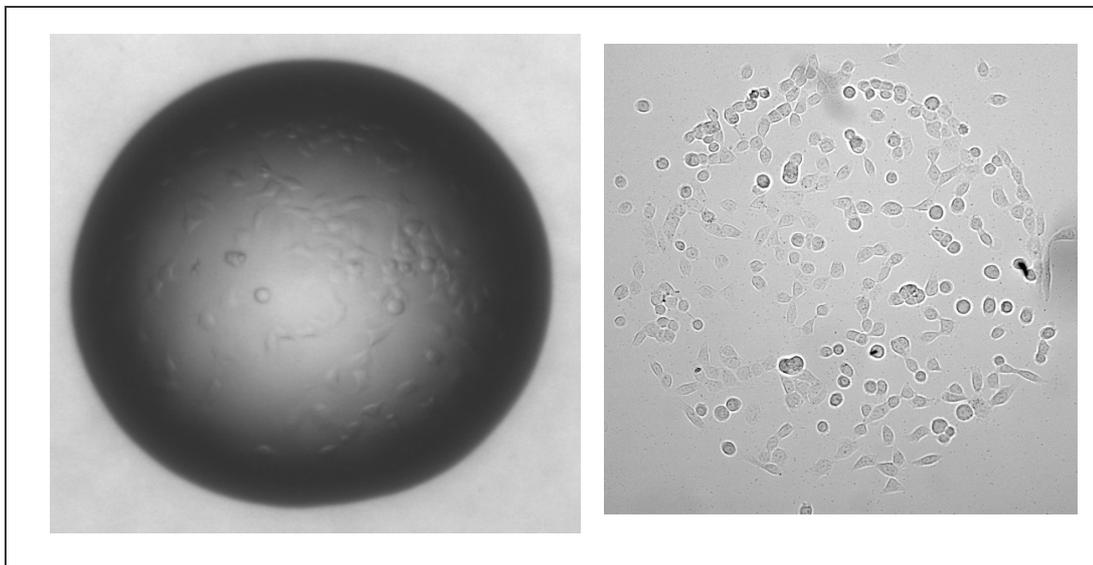


Figure 52 : Visualisation des cellules. Les images de gouttes permettent de distinguer les cellules (à gauche), mais ne permettent pas de faire de quantification. Les cellules doivent donc être imagées à plat (à droite).

Chapitre 3 : Détection et quantification du signal

L'acquisition à plat implique des contraintes liées à la viabilité des cellules. Pour survivre elles doivent se trouver en milieu liquide dans des conditions atmosphériques et salines très précises (voir chap. 1.5.1). Les longs temps d'acquisition (plusieurs dizaines de minutes), les dissipations d'énergie lumineuse dans des couches de liquide importantes et les réfractions aux interfaces empêchent d'utiliser des bains suffisants pour la survie cellulaire. Les cellules sont « fixées » (et donc tuées) à l'aide d'un traitement chimique qui les fige dans un état donné sans induire de modification majeure : la morphologie, la localisation des éléments internes sont conservées. Pour l'observation sous le microscope, nous avons utilisé une technique classique dite « montage entre lame et lamelle », où une résine « de montage » (qui peut être spécifique de l'application étudiée) est comprimée en une fine couche sur la lame de verre à l'aide d'une lamelle de verre.

L'analyse haut contenu est rendue possible par l'acquisition d'images haute résolution qui permettent d'identifier chaque cellule de chaque plot de manière individuelle. L'acquisition des centaines de plots de la puce doit être réalisée rapidement pour conserver un débit de traitement intéressant. Enfin le positionnement des images doit être reproductible et précis pour pouvoir ensuite les intégrer dans des processus de traitement automatisés.

3.1.2 Caractéristiques de la plateforme d'imagerie (PathFinder OSA, IMSTAR)

Des scanners initialement destinés à la quantification des fluorescences des puces à ADN sur le même format physique ont été utilisés pour l'acquisition d'image de puces à cellules [31-Sabatini]. Ils ont l'avantage de posséder des sources lumineuses intenses et très précises en longueur d'onde (lasers). Ils analysent le support point par point : un point du substrat est illuminé et sa fluorescence est recueillie, puis on passe au point suivant. Ils sont donc capables d'imager une lame entière en une seule acquisition. Toutefois, leur résolution (jusqu'à 2 μ m pour les plus précis) n'est pas suffisante pour identifier précisément des cellules qui peuvent faire 20 μ m environ. [36-Sabatini] Les scanners représentent une option indéniable lorsque l'intérêt principal de l'étude concerne des intensités de fluorescence globales par condition, mais ils ne sont pas encore utilisables pour des analyses à la cellule près.

Nous avons installé une plateforme d'imagerie par microscopie à fluorescence, commercialisée par la société IMSTAR. A l'aide d'une caméra CCD (pour « charged coupled device » en anglais) elle permet d'acquérir de manière automatique une image par longueur d'onde par plot de culture cellulaire, dont les dimensions (500 μ m de diamètre) s'intègrent dans une image prise au grossissement 20X (environ 850 μ m de large). La résolution (jusqu'à 0.6 μ m/pixel) est confortable pour l'identification des cellules (Figure 53). Le microscope est entièrement automatisé : une platine motorisée se déplace sur les 3 dimensions.

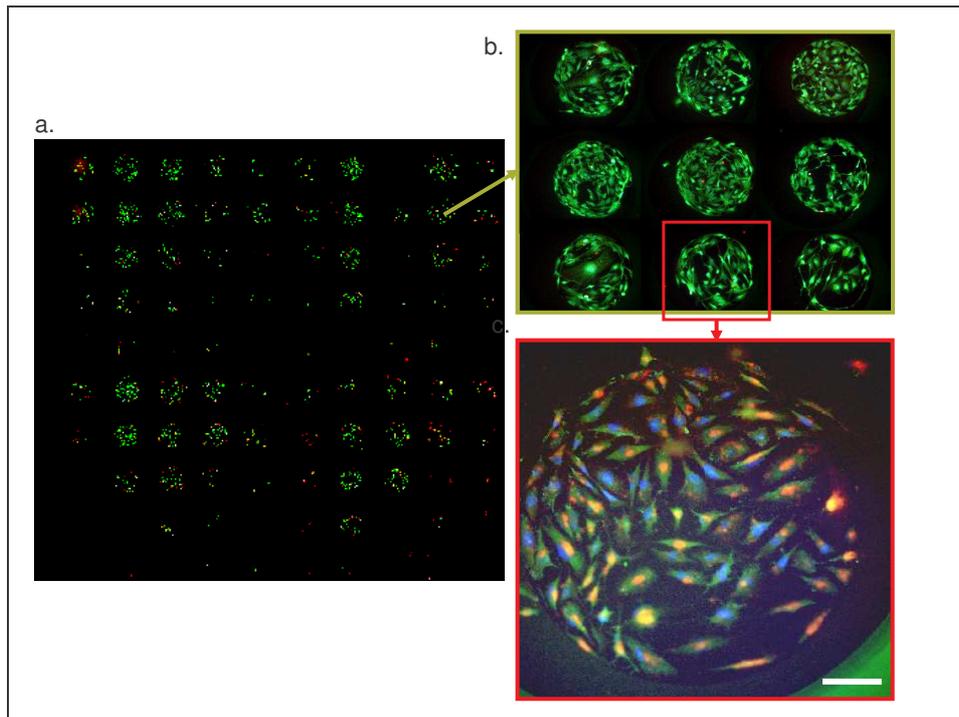


Figure 53 : Résultats obtenus après l'acquisition automatisée d'images haute résolution. (a) Mosaïque présentant les images d'un bloc de 100 plots issu d'une puce de 400, prises automatiquement. (b) 3×3 plots de 500µm reconstitués à partir des images individuelles de la puce. Les images sont en niveaux de gris (monochromes) ; elles sont colorées en vert par le logiciel. (c) image d'un plot de cellules U373 en trois couleurs. Le cytoplasme est marqué au syto10 (représenté en vert), le rouge représente indique les cellules mourantes (marquage éthidium homodimer-2). Les noyaux sont marqués au Hoechst (couleur bleue). 3 images différentes en niveaux de gris sont superposées. Echelle 250µm.

Pour pouvoir facilement automatiser l'analyse, les positions des plots de cellules doivent être repérées précisément. Disposer d'un support solide de calage est une première façon de placer de manière reproductible les lames de verre sous le microscope, comme sous le robot de dispense. Cependant ceci ne permet pas de changer facilement les dimensions du support, et ne donne pas une précision suffisante. Cette fonctionnalité a été améliorée par la présence des croix de positionnement (voir chap. 2.1.5.3) directement sur le substrat. Le microscope est capable de repérer séquentiellement deux croix situées aux coins supérieurs de la puce, ce qui lui permet d'obtenir la transformation (translation, rotation) entre le repère des platines (absolu) et le repère de la puce (relatif). Les positions sont ensuite très précisément déduites et le plot se retrouve au centre de l'image.

3.1.3 Traitement d'images

Le processus de traitement des images obtenues pour en faire ressortir une information quantitative sur le comportement des cellules est représenté sur la figure ci-dessous (Figure 54).

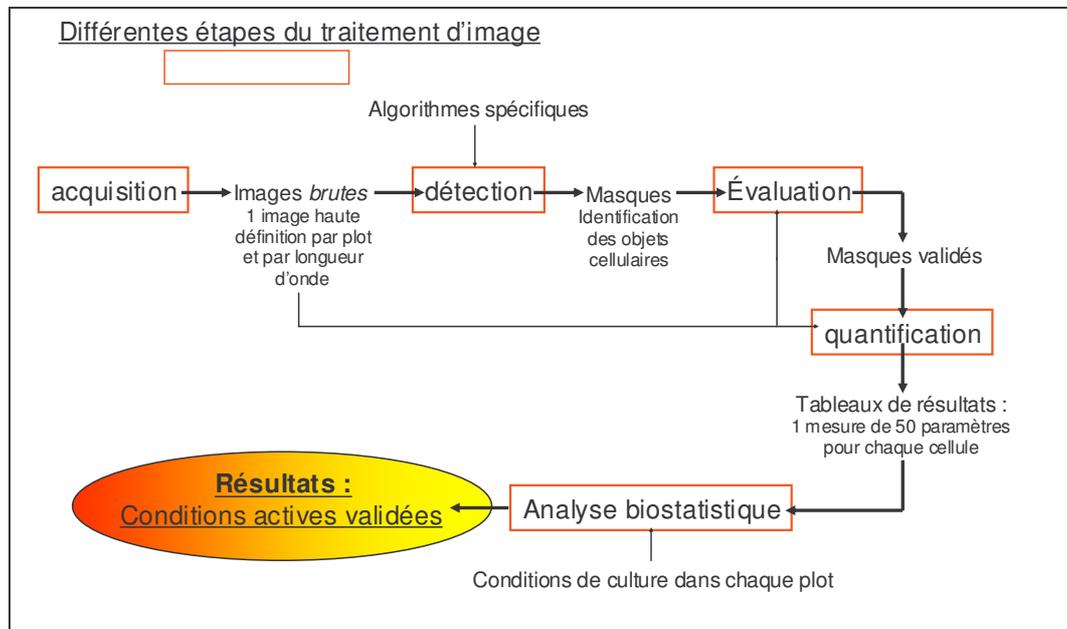


Figure 54 : Processus simplifié d'analyse des résultats d'une expérience de puce à cellules.

3.1.3.1 Détection

L'étape de détection au sein d'une image contenant une population de cellules, consiste à regrouper entre eux les pixels représentant une cellule individuelle. Le groupe de pixels constitue un objet plein sur lequel est appliqué un contour. Dans le jargon du domaine, ces contours sont appelés des « masques ». Dans les figures ci-dessous, ce masque est représenté par un contour virtuel rouge autour de chaque cellule.

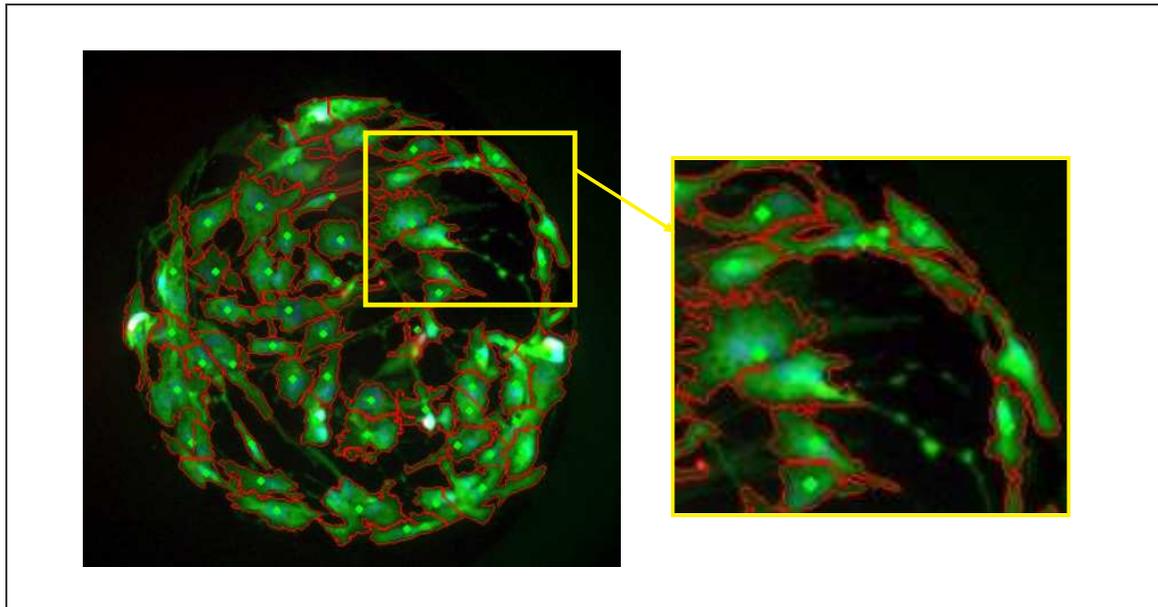


Figure 55 : Définition du masque issu des algorithmes de détection des cellules. Le masque représente les contours des cellules, il est matérialisé par le liseré rouge sur les images. A gauche une vue d'ensemble d'un plot de 500µm de cellules U373 marquées au syto10 (vert) dans le cytoplasme. Un seuillage par rapport au bruit de fond (noir ici pour des raisons de confort visuel) permet d'identifier les limites des cellules. Les amas sont découpés grâce à des algorithmes spécifiques. A droite, un agrandissement montrant les contours.

La principale méthode pour segmenter les objets est issue du domaine des mathématiques morphologiques, qui mettent en jeu des compétences mathématiques et informatiques pointues que nous ne maîtrisons pas. Pour une description vulgarisée du fonctionnement de certains algorithmes, le lecteur intéressé pourra se tourner vers les manuels d'utilisation du logiciel CellProfiler [75-Carpenter, 76-Wheeler].

Pour des objets dont la morphologie est à peu près constante et l'intensité de fluorescence assez homogène, des algorithmes de seuillage simples peuvent suffire à les identifier. Il s'agit de déterminer l'ensemble des pixels de l'image qui ont une intensité au-dessus d'un seuil arbitraire. Idéalement, si toutes les cellules ont la même intensité, le seuil correspond à l'intensité des cellules ; dans la pratique, il est situé entre le bruit de fond et les cellules. Ensuite des filtres morphologiques sont appliqués pour délimiter des groupes de pixels qui représentent une cellule individuelle.

Pour des objets plus complexes comme des cellules en amas ou des morphologies très différentes, il faut faire appel à des algorithmes plus complexes. Ceux-ci sont généralement fondés sur la détection rapide du noyau des cellules par un protocole de seuillage classique (les noyaux sont ronds et marqués de manière homogène). Le contour obtenu autour des noyaux est alors grossi pour aller toucher les limites de la cellule, repérées par une autre

Chapitre 3 : Détection et quantification du signal

couleur (longueur d'onde). Cette méthodologie implique la présence de deux marquages distincts pour la détection : les noyaux et les contours cellulaires. Cela représente une contrainte sur le choix des fluorophores utilisés pour étudier un phénotype d'intérêt. Analyser l'intensité de fluorescence de la GFP dans le cytoplasme, utilisée comme gène rapporteur d'un stress par exemple, implique de marquer les noyaux d'une couleur, et la membrane ou le cytoplasme d'une autre puisque la GFP n'est pas exprimée dans les contrôles négatifs non stressés et ne permettra pas d'en délimiter les contours. Le choix des marqueurs est donc une étape importante d'une expérience de haut contenu et doit être effectué en prenant en compte la biologie et l'analyse d'image.

Il existe des solutions logicielles pour la détection des cellules qui se développent de plus en plus. Par exemple une solution libre de droit, CellProfiler (sortie le 13/12/2005), est développée par le laboratoire de David M Sabatini. Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé des algorithmes développés spécifiquement par la société IMSTAR au cours d'une collaboration de deux ans.

3.1.3.2 Quantification du signal

3.1.3.2.1 Résultats obtenus et principe d'analyse

D'un point de vue statistique, un objet représente une distribution de pixels d'intensité variable (de 0 à 4096 niveaux de gris par exemple) sur laquelle toutes sortes d'opérations peuvent être appliquées : calcul des moyennes, des médianes, des moments de différents ordres (variance par exemple). Par ailleurs, le contour apposé à l'objet peut être mesuré, donnant accès à des caractères morphologiques comme l'aire de la cellule ou son périmètre, mais aussi à des combinaisons plus complexes : rotondité, linéarité du contour, direction de la plus grande ellipse inscrite ou de l'ellipse au plus près du contour par exemple. Enfin une combinaison des deux éléments conduit à des mesures de localisation de la fluorescence : position du centre de gravité de la fluorescence, des modes spatiaux par exemple. Ces calculs peuvent se faire sur chaque longueur d'onde de chaque marqueur utilisé.

Avec le haut contenu, l'expérimentateur dispose d'un très grand nombre de paramètres pouvant qualifier les conditions des cultures, par exemple l'ajout d'un candidat médicament. La grande majorité d'entre eux n'était pas accessible auparavant et est donc très peu documentée. Les biologistes ne faisaient réellement confiance qu'à un ou deux paramètres pertinents (nombre de cellules, intensité de fluorescence moyenne par condition). La pertinence et la significativité des paramètres nouveaux obtenus devront être étudiées de manière approfondie. La stratégie que nous proposons tente une approche double. Dans un premier temps il convient de mettre en place des marqueurs validés expliquant les phénotypes étudiés, comme l'intensité de fluorescence d'une molécule bien connue par exemple. Au regard des considérations de variabilité explicitées précédemment, le nombre de cellules ne pourra pas faire partie de cette catégorie. Cette approche implique la validation de contrôles négatifs et positifs du phénotype pour ce ou ces marqueurs. Dans un second temps, une démarche exploratoire pourra être menée pour faire ressortir les paramètres inconnus dont les variations sont significatives et corrèlent avec les résultats obtenus avec le marqueur validé. Ces paramètres pourront aussi être des combinaisons (ou vecteurs) de paramètres indépendants qui, pris un à un, ne permettent pas de caractériser le phénotype. Cette démarche ne peut se faire qu'avec une comparaison de plusieurs expériences indépendantes pour évaluer la significativité des résultats obtenus. Deux exemples de la conduite de ce genre d'analyse seront développés dans les paragraphes 3.2 et 4.4.

3.1.3.2.2_Bruit de fond

Malgré le traitement en lot et l'utilisation de procédures standardisées, chaque puce d'une expérience est indépendante et différente des autres. Par exemple les temps d'exposition aux illuminations pour les excitations des fluorophores sont différents. Cela provient du fait que de nombreuses parties des protocoles utilisés sont effectuées manuellement, ou bien que les protocoles de fabrication des puces ne sont pas encore totalement invariants. De plus il existe des inhomogénéités spatiales pour les intensités de fluorescence des puces en dehors des signaux spécifiques. Pour s'affranchir de cette variabilité supplémentaire, il est possible d'utiliser le bruit de fond. Dans notre cas il représente tout signal dans le plot physique hydrophile qui n'est pas associé à un objet. Il s'agit du signal en dehors du masque de détection. Les images utilisées pour les quantifications sont souvent plus grandes que le plot physique, elles contiennent des parties correspondant à la couche hydrophobe, qui ne seront pas considérées dans le calcul du bruit de fond. Cela implique de pouvoir repérer précisément la position du plot dans l'image pour ne considérer que le signal en provenant. Nous avons envisagé deux possibilités. La détection par traitement d'image de l'emplacement du plot a l'avantage d'être tolérante sur le positionnement de la lame sous le microscope, mais nécessite un marqueur de la couche hydrophobe (ou du plot). L'utilisation des croix de positionnement est l'option retenue. Elle conduit à des images où les plots sont des disques de 250 μ m de rayon centrés précisément dans l'image. Un traitement informatique spécifique exclue le signal présent à l'extérieur de ce cercle.

3.1.4 Conditions d'utilisation et optimisations nécessaires

La détection des cellules par le logiciel de traitement d'images est une étape cruciale pour l'obtention des résultats d'une expérience sur les puces à cellule. Principalement si des objets ne sont pas détectés ou bien s'ils sont coupés en deux par les algorithmes, les distributions associées seront faussées de manière importante. La criticité de la détection du contour cellulaire dépend quant à elle de la stratégie d'interprétation des résultats. Dans une optique exploratoire (recherche d'un marqueur inconnu), toute erreur de détection entache la validité des paramètres pertinents identifiés. En revanche, dans une démarche validée comme l'utilisation d'un marqueur connu, si les intensités de fluorescence quantifiées permettent de différencier les témoins positifs et négatifs, la question devient moins cruciale. Les procédés automatisés utilisés produisent inévitablement des erreurs. Celles-ci doivent être prises en compte dans l'analyse des résultats par leur identification ou bien par l'évaluation de leur influence sur les données mesurées pour pouvoir étudier la significativité des résultats obtenus.

Ce constat plaide pour une étape d'évaluation des masques issus de la détection des cellules. D'une part le nombre d'objets détectés ne doit pas « trop » différer du nombre de cellules présentes à l'image. Comme les analyses des phénotypes sont fondées sur des mesures cellule par cellule, le seuil d'acceptabilité doit être très important : à titre d'exemple, nous avons décidé de ne pas considérer les expériences dans lesquelles plus de 10% des images présentent un taux de faux objets ou d'objets non détectés supérieur à 10%. Ce critère est évalué manuellement sur une centaine d'image d'une lame pour l'instant.

D'autre part, la morphologie cellulaire varie dans de grandes proportions selon le type cellulaire. Les algorithmes utilisent des filtres morphologiques pour vérifier que les objets détectés sont bien des cellules. Ceux-ci doivent être adaptés à chaque type cellulaire. En réalité, ils dépendent aussi des marqueurs utilisés pour la détection. Nous avons vu que la

Chapitre 3 : Détection et quantification du signal

détection était généralement fondée sur un marqueur nucléaire et un marqueur membranaire ou cytoplasmique. La texture du signal fluorescent d'un marqueur lui est propre et va influencer sur les algorithmes de segmentation. De même l'incorporation du marqueur par les cellules dépend du type cellulaire. Un processus de mise au point est nécessaire pour chaque modèle cellulaire (type cellulaire et marqueurs), ce qui signifie que les algorithmes de détection sont spécifiques et subissent des modifications à chaque changement de modèle. Cette limitation de la technologie haut-contenu n'a pas été anticipée du fait de l'universalité revendiquée par les logiciels d'analyse d'images lors des premières implémentations. Cette revendication venait de l'immatunité de ce domaine, où des protocoles de segmentations fondés sur le seuillage du signal d'une seule longueur d'onde pourraient s'appliquer à tous les modèles après quelques optimisations. La prise de conscience de l'impossibilité de cette démarche et de la nécessité de définir des algorithmes plus complexes (détection du noyau puis grossissement jusqu'au contours cellulaires) a nécessité le recours à des compétences spécifiques, sur chaque expérience. La simplicité d'utilisation revendiquée a priori par l'innovation des puces à cellules s'en trouve réduite. Cependant des développements dans ce champ de recherche (notamment avec le logiciel CellProfiler™) laissent penser que des méthodologies plus ou moins universelles ou rapidement optimisables pourront permettre dans un proche avenir de pallier à cet inconvénient.

Ces développements ont fourni une plateforme d'analyse d'image automatisée comprenant les appareils optiques et physiques nécessaires à la capture des images haute résolution de chaque plot pour chaque longueur d'onde considérée. Par ailleurs le fonctionnement des traitements d'image impose des processus de mise au point des algorithmes de détection, afin d'obtenir une individualisation satisfaisante de chaque cellule.

Depuis l'apparition des analyses « haut contenu », quelques machines spécialisées ont fait leur apparition (« ArrayScan » de Cellomics et « InCell Analyser » d'Amersham, maintenant GE Healthcare par exemple). Leur fonctionnement repose sur le même principe que celui que nous avons décrit ici. Il s'agit de « boîtes noires » dans lesquelles tout le processus est intégré. Elles sont dédiées à l'analyse de microplaques et ne sont pas adaptables aux formats de puces à cellules sans accès aux sources des logiciels. Quelques essais pour utiliser leurs algorithmes de détection se sont avérés infructueux, ceux développés par IMSTAR étant plus avancés. Pour une revue de ces appareils, on peut se référer à [73-Comley].

L'analyse d'image permet d'obtenir des mesures pour plusieurs dizaines de paramètres pour chaque cellule. Des études exploratoires seront nécessaires pour valider l'intérêt de chacun dans une application donnée. Un exemple d'implémentation de ce genre d'analyse multiparamétrique sera développé dans le chapitre 4.3. Des considérations similaires sont explicitées dans le paragraphe suivant (3.2) dans lequel nous présentons l'utilisation de la spectrométrie de masse comme méthode de phénotypage.

3.2 Phénotypage par spectrométrie de masse

Spectrométrie de masse *in situ* pour l'analyse de cultures cellulaires en micro-nanogouttes.

Les protéines sont les acteurs principaux des processus cellulaires. Une grande partie du phénotype d'une cellule vivante peut se traduire par sa composition protéique, autrement appelée « protéome » [144-Liotta]. La caractérisation par fluorescence par exemple s'attache souvent à détecter la présence d'une ou plusieurs d'entre elles, mais cela ne représente qu'une partie infime de la totalité des protéines produites. L'accès à un plus grand nombre de « marqueurs » pourrait permettre d'être plus spécifique et descriptif. Dans ce chapitre nous abordons l'utilisation de la spectrométrie de masse comme technique pour quantifier la présence de plusieurs centaines de protéines dans des cultures cellulaires miniaturisées.

La majorité du protéome d'une cellule n'est pas informatif quant à la description précise d'un état cellulaire (apoptose, différenciation par exemple), il ne représente que du bruit. Même si plusieurs recherches commencent à montrer que le bruit véhicule une information cruciale pour la régulation des processus biologiques [67-Rao], les technologies aujourd'hui disponibles ne permettent pas de l'étudier. Par contre la présence de ce bruit protéique appelle de nouvelles méthodes d'analyses pour faire ressortir les variations significatives et informatives de la masse de données issue de la spectrométrie de masse.

Cette technique a fait l'objet d'un dépôt de brevet [145-Reboud]. Nous ne décrivons pas toutes les caractéristiques de l'invention, mais nous nous attacherons aux intérêts les plus directs. Les résultats obtenus avec cette approche et présentés ici ne constituent pas une mise au point d'une nouvelle méthode de détection, qui représente un travail de thèse en soi. Nous n'explicitons qu'une preuve de faisabilité (en cours de publication), qui permet toutefois d'évaluer les enjeux inhérents à cette technologie.

3.2.1 Contexte et méthodologie

3.2.1.1 Spectrométrie de masse et protéomique

La spectrométrie de masse, qui analyse un échantillon par la quantité (souvent relative) de différentes molécules caractérisées par leur masse, est une technologie en pleine expansion en biologie. D'un point de vue général, elle consiste à désorber de la matière d'un échantillon solide ou liquide, puis les molécules ou ions produits sont analysés un à un, et caractérisés par leur masse (ou le rapport de leur masse sur leur charge). Historiquement ses capacités en ont fait une technique adaptée à l'étude d'échantillons de plus en plus complexes en sciences chimiques ou physiques.

Par ailleurs, nous avons vu que l'engouement pour la génomique (chap 1.2) s'était heurté à la nécessité d'une interprétation fonctionnelle des comportements découverts. Plus particulièrement il a été postulé que l'étude des protéines d'un échantillon pouvait mieux rendre compte des phénotypes. Les puces à protéines que nous avons déjà mentionnées sont un exemple des nouvelles technologies issues de ce pan de recherche, la protéomique. Techniquement ces dispositifs sont entachés de quelques limitations et difficultés de mises en œuvre comme le fait de conserver natives les protéines accrochées sur une surface par exemple.

Chapitre 3 : Détection et quantification du signal

De la même manière que la génomique, la protéomique cherche à identifier l'ensemble des protéines produites par un organisme. La sensibilité et la résolution de nombreuses techniques de spectrométrie de masse ont récemment permis leur utilisation dans des applications en biologie pour la détection et l'analyse de nombreuses protéines présentes dans un échantillon complexe. L'avantage principal de cette technologie réside dans l'identification possible des signaux obtenus. Là où les puces à protéines signalait un appariement, la spectrométrie de masse donne accès à la quantité relative de protéines ainsi que sa séquence. Dans des études fonctionnelles, la spectrométrie de masse permet de se passer de l'utilisation de marqueurs (molécules fluorescentes par exemples), ce qui est un avantage indéniable puisque les molécules ainsi détectées restent dans leur environnement natif pendant toute l'analyse.

3.2.1.2 Choix de la technique et concept

Les cultures cellulaires en gouttes se présentent sous forme liquide. La seule technique capable de les manipuler directement est l'ionisation par electro-spray (ESI pour « ElectroSpray Ionisation » en anglais) [146-Gaskell]. Cependant l'ionisation du liquide a lieu dans une buse de Taylor, dont l'adaptation aux substrats de culture cellulaire en gouttes semble difficile. De longues mises au point techniques seraient nécessaires : des circuits microfluidiques de transport jusqu'au spectromètre et le décollement des cellules adhérentes par exemple.

La spectrométrie MALDI (pour « Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation » en anglais, désorption et ionisation laser assistées par une matrice) couplée à l'analyse en temps de vol (TOF pour « Time Of Flight » en anglais) est utilisée de manière intense pour caractériser des échantillons issus du vivant : sang, sérum ou tissus par exemple [147-Drexler, 152-Hayman]. Elle utilise un laser pour transférer localement de l'énergie à un échantillon sec placé sur un support solide. Certaines molécules sont désorbées sous forme d'ions et dirigées sur un détecteur. Celui-ci mesure le temps mis pour l'atteindre, directement proportionnel au rapport entre la masse et la charge de l'échantillon (noté généralement M/Z sur les spectres obtenus). Une substance chimique, la matrice, est nécessaire au bon fonctionnement du processus destructeur de désorption-ionisation. Elle sert d'intermédiaire entre la puissance laser et l'échantillon pour répartir l'énergie de manière homogène et ainsi éviter la destruction de la matière étudiée (Figure 56). Pour une description plus détaillée du fonctionnement, on peut se tourner vers la référence [151-Caprioli].

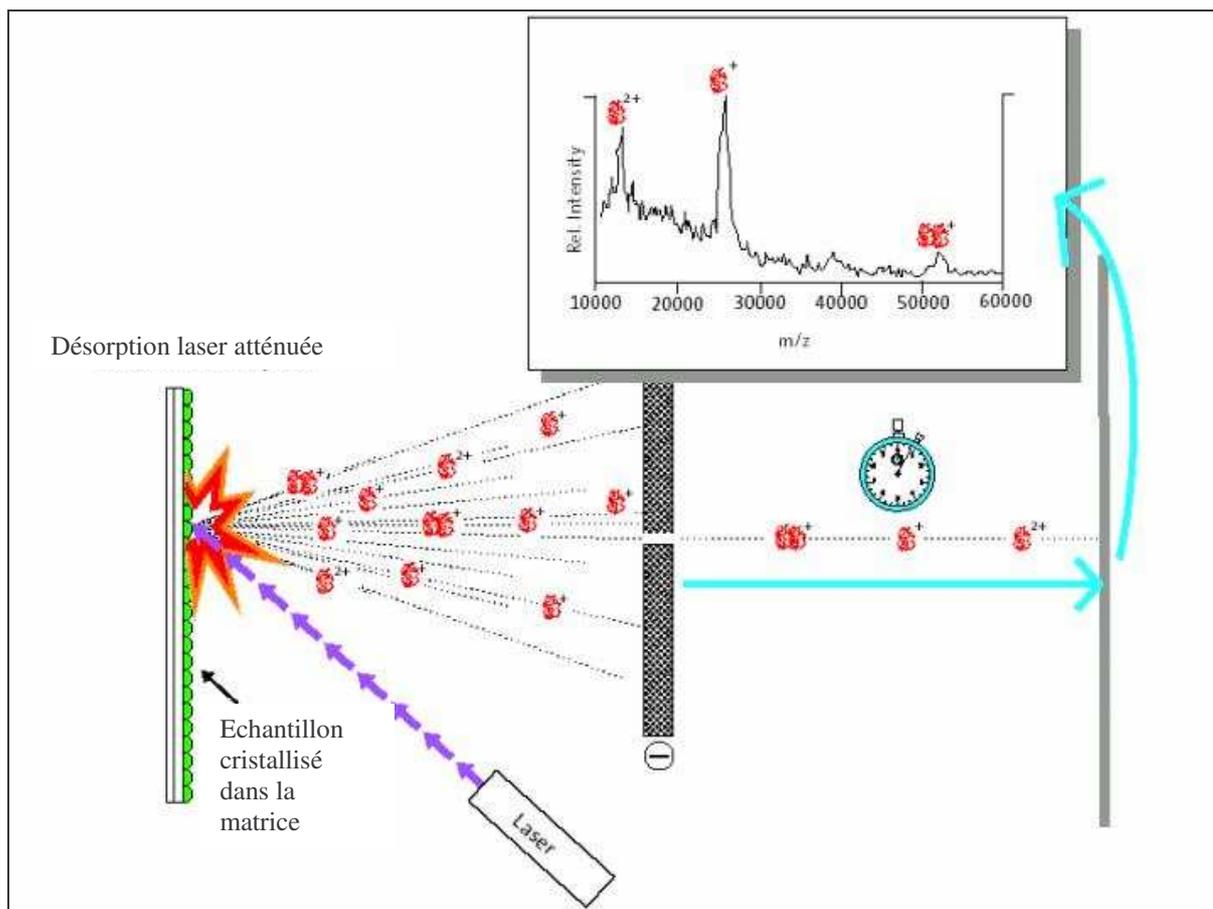


Figure 56 : Principe de l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le faisceau laser transfère de l'énergie à l'échantillon situé à la surface d'une source par l'intermédiaire d'une matrice. Les molécules de l'échantillon sont désorbées et ionisées, puis conduites à un analyseur par temps de vol qui classe les molécules selon leur temps d'arrivée sur le détecteur, directement proportionnel au rapport de la masse par la charge de la particule. (adapté de <http://www.hi.is/~agust/kennsla/ee5/myndir/mynd2nobel.jpg>)

L'utilisation de la spectrométrie MALDI dans des applications de découverte de marqueurs en biologie (notamment clinique) s'est heurtée à des problèmes de sensibilité. Les échantillons biologiques contiennent de nombreuses protéines « majoritaires » (en grande abondance) dont la détection masque les protéines « minoritaires » qui sont souvent porteuses de l'information d'intérêt. Pour donner accès à ces molécules peu abondantes, la stratégie SELDI mise au point par la société Ciphergen (pour « surface enhanced laser desorption ionisation » en anglais soit « ionisation et désorption laser améliorée par la surface ») permet de sélectionner les protéines directement sur le substrat introduit dans le spectromètre par leurs propriétés physico-chimiques. Des lavages évacuent une grande partie des protéines majoritaires inintéressantes qui brulent le signal. Cette technique a ouvert la voie à de très nombreuses applications de la spectrométrie de masse à des échantillons biologiques complexes (sérum, tissus, par exemple).

Elle a été utilisée pour analyser la composition protéique d'échantillon de culture cellulaire [152-Shiwa]. De manière générale, pour augmenter la quantité de protéines analysées, les cellules sont cultivées en échantillons abondants (plaques à 6 puits par exemple), puis détachées, lysées et introduites dans le spectromètre de masse. Ces traitements induisent des pertes de molécules au cours de l'expérience. Nous allons montrer que la réalisation d'une expérience sur un support unique du début à la fin est possible, en analysant

Chapitre 3 : Détection et quantification du signal

par spectrométrie de masse des cultures cellulaires cultivées et stimulées en gouttes directement sur les surfaces actives. Cela permet d'envisager des développements de mesures sur des cultures cellulaires mariant les performances exceptionnelles de la spectrométrie de masse en terme de phénotypage avec la miniaturisation et le haut-débit d'un format puce.

Pour ce travail nous avons utilisé les appareils SELDI présents sur la plateforme de l'unité INSERM 318 (CHU de Grenoble, François BERGER).

3.2.2 Faisabilité : culture cellulaire, viabilité et spectres

3.2.2.1 Viabilité et prolifération

Dans la mise en œuvre de l'analyse par spectrométrie de masse, les cellules sont directement cultivées sur le substrat inséré dans le spectromètre. De la même manière que lors de la caractérisation des substrats miniaturisés pour l'observation en fluorescence (chap. 2.), démontrer la viabilité et la prolifération des cellules dans ces conditions est un pré requis à toute expérience. Les substrats standards SELDI (barrette NP20 – CIPHERGEN, C553-0043) ont une géométrie comparable à celle des lames de verre Teflon utilisées pour les tests de faisabilité en fluorescence (chapitre 1.8) : des plots hydrophiles en silice (composition semblable au verre) sont entourés d'une couche hydrophobe (dont nous ne connaissons pas la composition).

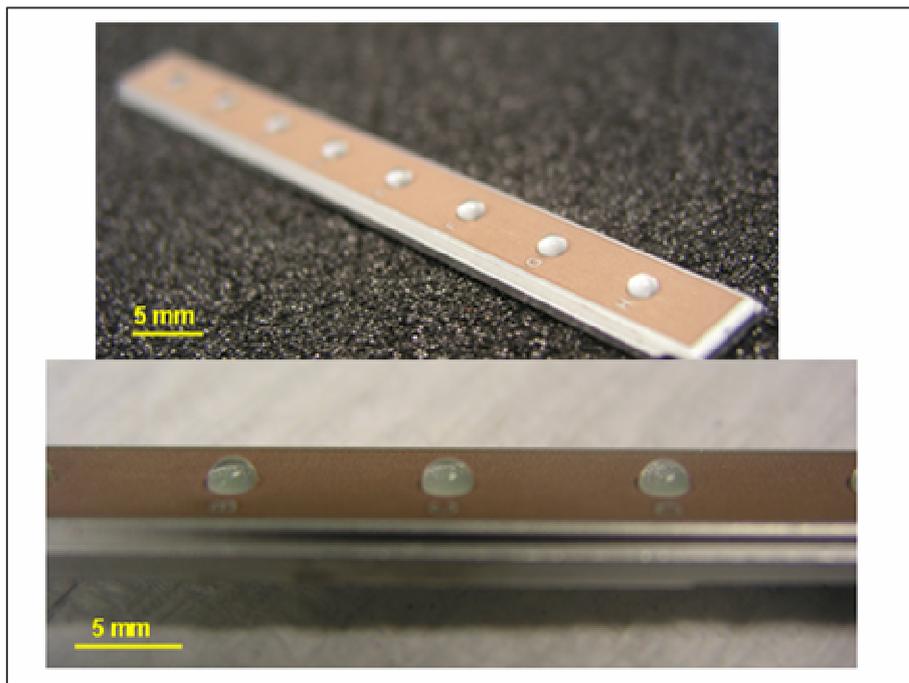


Figure 57 : Gouttes d'eau de 5 μ l sur puces SELDI NP20 révélant l'interface hydrophile-hydrophobe.

Les 8 plots sont notés de A à H.

Chapitre 3 : Détection et quantification du signal

La surface active en silice réfléchit beaucoup la lumière excitatrice, ce qui empêche de faire des analyses en lumière visible (Figure 57). Cependant la spécificité des signaux fluorescents est suffisante pour pouvoir clairement distinguer les noyaux cellulaires. Les contours (membranes) sont difficiles à visualiser, même si la forme caractéristique de ces cellules semble conservée. Cela permet de valider dans une certaine mesure le comportement cellulaire et les phénotypes étudiés par des méthodes de phénotypage classiques. L'imagerie par microscopie confocale, sensée atténuer l'influence de la lumière parasite, n'apporte pas d'amélioration déterminante. Une optimisation des marqueurs pourrait permettre une meilleure distinction des cellules. L'utilisation d'analyses d'images automatisées n'a pas été possible avec les algorithmes et les marquages dont nous disposons.

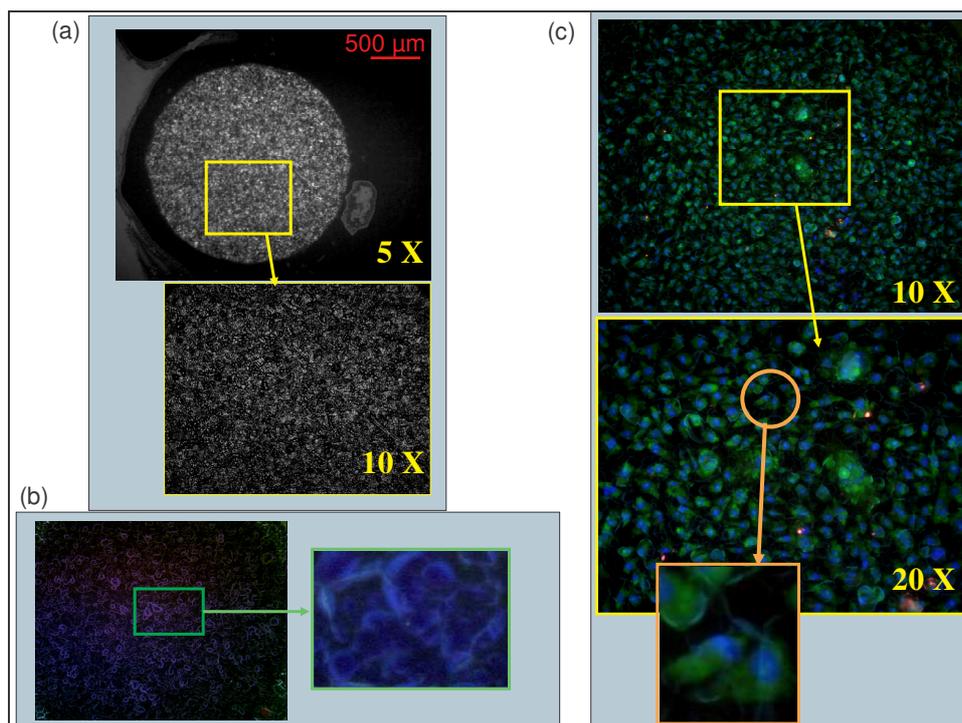


Figure 58 : Imagerie de cellules U373 cultivée en gouttes sur support SELDI (NP20). Une goutte de 5 μ l d'une culture cellulaire U373 à la concentration d'environ $2,5 \cdot 10^5$ cellules/ml est déposée sur chaque plot d'une barrette NP20 (8 plots). Après 3 jours d'incubation dans un dispositif de vapeur saturante à l'étuve, les gouttes sont rincées dans du PBS. Puis les cellules sont marquées au syto10 (Molecular Probes S32704), avant d'être fixées au PFA4% et marquées au Hoechst (noyaux). (a) image visible d'un plot de silice hydrophile rond contenant des cellules, entouré d'une couche hydrophobe (noire) à deux grossissements différents. Les structures du substrat ne permettent pas de distinguer des cellules. (b) image et grossissement d'un plot hydrophile sans cellules avec les filtres correspondant au marqueur Hoechst, révélant les structures mentionnées. (c) Image et grossissements du même plot que (a) en fluorescence : syto10 dans le cytoplasme en vert, Hoechst dans le noyau en bleu. Les noyaux peuvent être comptés. L'étalement caractéristique des cellules est conservé.

Des contraintes similaires à une culture de cellules en micro-nanogouttes sur les substrats précédents sont à prendre en compte (Figure 59). Plus particulièrement, la concentration cellulaire de dépôt doit être adaptée pour rester dans un modèle de croissance dynamique si nécessaire. Les résultats obtenus sont comparables pour le même type cellulaire (U373) à ceux obtenus sur les substrats en Téflon. D'autres modèles ont été testés depuis (cellules HeLa par exemple) comme les PC12, une lignée cellulaire plus difficile à cultiver.

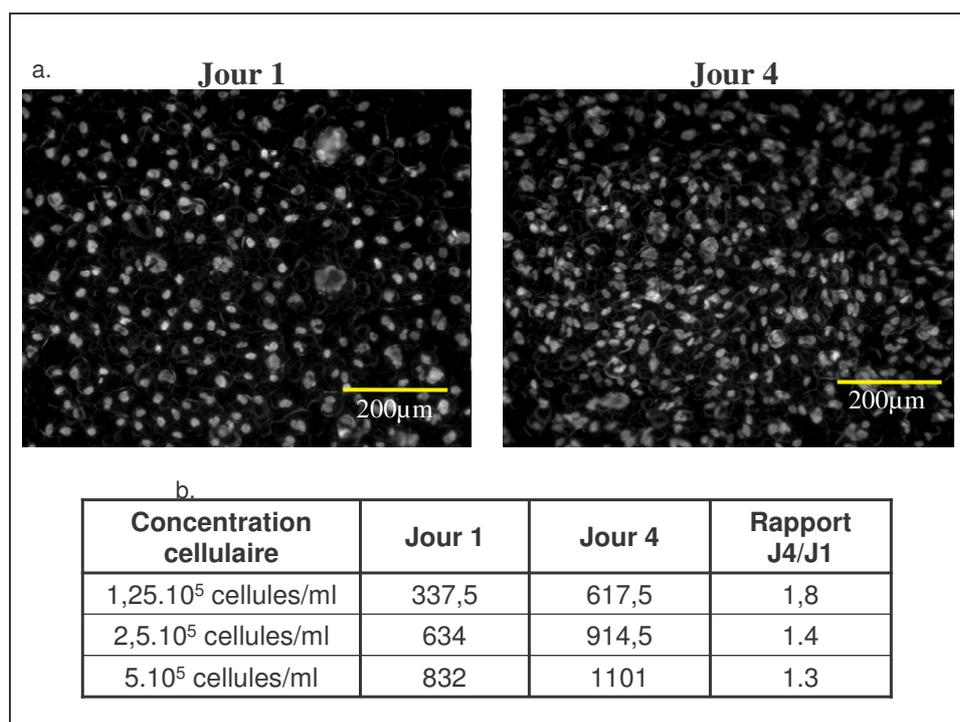


Figure 59 : Prolifération de cellules U373 sur substrat NP20. Les cellules sont cultivées et préparées selon le protocole décrit dans la légende de la Figure 58 précédente avec plusieurs concentrations de dépôt par puce. Pour évaluer la prolifération, une partie des puces est fixée puis imagée au 20X après 1 jour d'incubation, l'autre l'étant après 4 jours. Les noyaux sont comptés manuellement sur les 3 exemplaires par concentration cellulaire. (a) exemples d'images obtenues pour le marquage Hoechst des noyaux après 1 jour d'incubation (à droite) et 4 jours (à gauche) pour la concentration $1,25 \cdot 10^5$ cellules/ml. (b) table de résultats montrant la prolifération différentielle par le nombre de noyaux moyens par concentration (3 exemplaires). Les concentrations plus élevées n'ont pas pu être quantifiées, les noyaux étant trop nombreux et se recouvrant souvent.

3.2.2.2 Obtention de spectres

Les cellules peuvent être cultivées et stimulées en gouttes sur les supports de spectrométrie de masse. La réduction des traitements des échantillons permise par une analyse *in situ* représente un avantage particulièrement intéressant de cette technique. Le spectromètre SELDI utilise des échantillons secs, ce qui implique que les traitements minimaux nécessaires à un bon fonctionnement de la machine sont simplement le séchage et l'ajout de la matrice. En réalité un lavage des sels présents dans l'échantillon est également nécessaire puisque la présence de ces ions sature le détecteur et cache les autres composés. Ce protocole a minima est satisfaisant pour l'obtention de pics informatifs à l'aide du « ProteinChip System, Series 4000 » de CIPHERGEN. Les résultats obtenus dépendent beaucoup du type de machine utilisé, il n'est pas évident qu'un protocole similaire soit efficace sur un autre spectromètre. Les machines utilisées doivent avoir des résolutions et des sensibilités importantes.

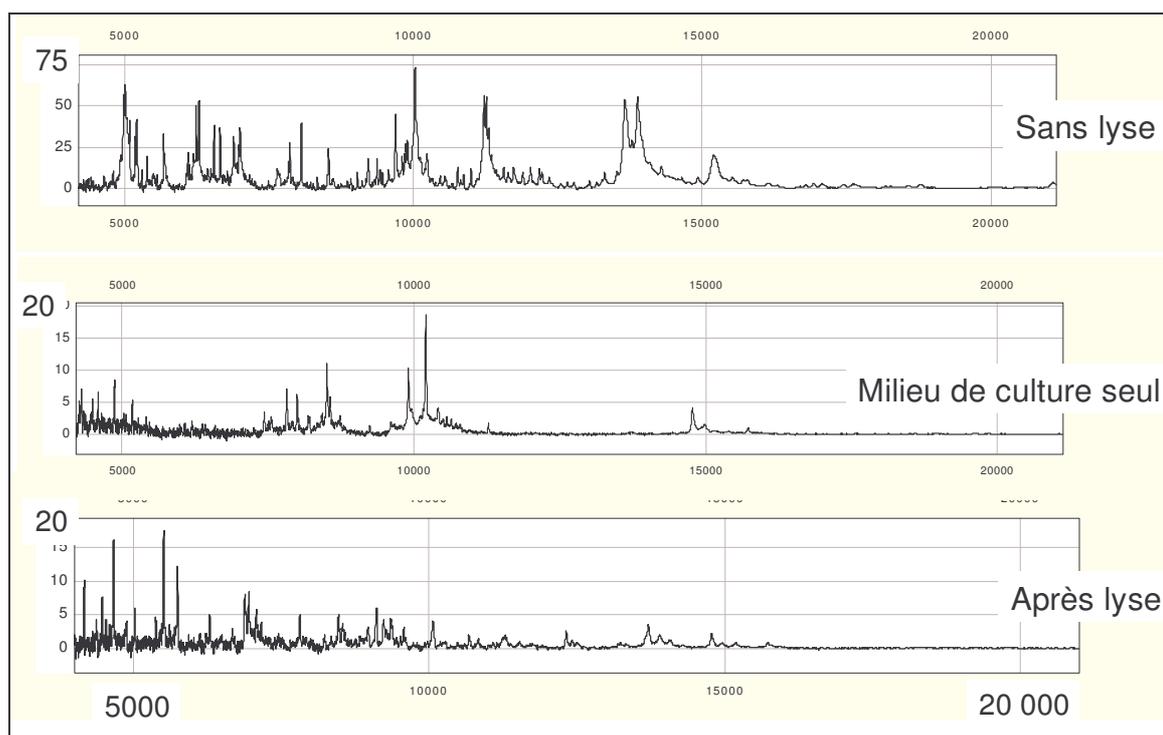


Figure 60 : Exemples de spectres globaux obtenus pour des cellules U373. Elles sont cultivées en gouttes de 5 μ l pendant 2 jours sur les substrats NP20. Les puces sont rincées une fois au PBS et deux fois à l'Hepes 2mM (trempages) pour retirer les sels et les composés non adsorbés du milieu de culture. Les puces sont séchées à l'ambiante puis 2 \times 0,8 μ l de matrice (SPA) sont ajoutés par plot. Après séchage, elles sont analysées dans le spectromètre de masse : accumulation de 15 tirs lasers par position sur 50 positions. En haut, exemple de spectres issus de ce protocole minimal. Au milieu, un plot sans cellules montrant le bruit de fond attribuable au milieu de culture. En bas, les cellules ont été lysées avant traitements. Discussions dans le texte.

Les expériences d'analyse de culture cellulaire (ou bactérienne) par spectrométrie de masse mettent souvent en œuvre une étape de lyse (rupture de la membrane cellulaire) afin d'avoir accès à l'intérieur du cytoplasme. Les tests que nous avons menés (Figure 60) ont montré que, contrairement à ce qui était attendu, l'étape de lyse réduit l'information disponible dans les spectres. Pour pouvoir obtenir une qualité comparable, il est nécessaire de recueillir une quantité plus importante d'échantillon, d'un puits d'une plaque 96 par exemple (résultats confirmés par une équipe INSERM U318). Les lavages supplémentaires induits par l'étape de lyse peuvent expliquer la perte de signal qu'elle engendre.

Cela pourrait aussi signifier que l'information recueillie par les deux méthodologies n'est pas de même nature. Dans la désorption « directe », où le spectromètre n'a pas accès au contenu interne des cellules, les molécules analysées seraient issues du milieu de culture (peptides ou protéines circulants) ou de la membrane cellulaire. L'étape de lyse et les lavages qui s'ensuivent enlèveraient ces molécules, ne laissant la place qu'à des molécules issues de l'intérieur des cellules qui ne seraient pas présentes en quantité suffisante pour pouvoir être correctement détectées. Cette hypothèse se rapproche de résultats concernant des découvertes de biomarqueurs, issus de peptides fragmentés circulants, qui sont hautement informatifs. Les implications en terme de biologie fondamentale ne peuvent pas être avancées sans une exploration plus précise de l'identité des molécules détectées par les deux méthodes.

Par ailleurs, les cellules cultivées directement sur la barrette subissent des traitements extrêmes. La pression osmotique lors des lavages par exemple devrait les faire exploser.

3.2.2.3 Influence du nombre de cellules

La concentration cellulaire de dépôt sur la barrette (gouttes de 5 μ l) influe sur la prolifération et donc sur le nombre de cellules au moment de l'analyse. Le signal étant lié à la présence de cellules, une zone de concentrations optimales existe. Elle a été déterminée expérimentalement (Figure 61). Elle correspond à des concentrations de dépôt comprises entre 500 cellules/plot et 5000 cellules/plot, soit des concentrations d'environ 1.10⁵ cellules/ml et 1.10⁶ cellules/ml, ce qui par ailleurs entre dans la fenêtre de prolifération optimale déterminée précédemment.

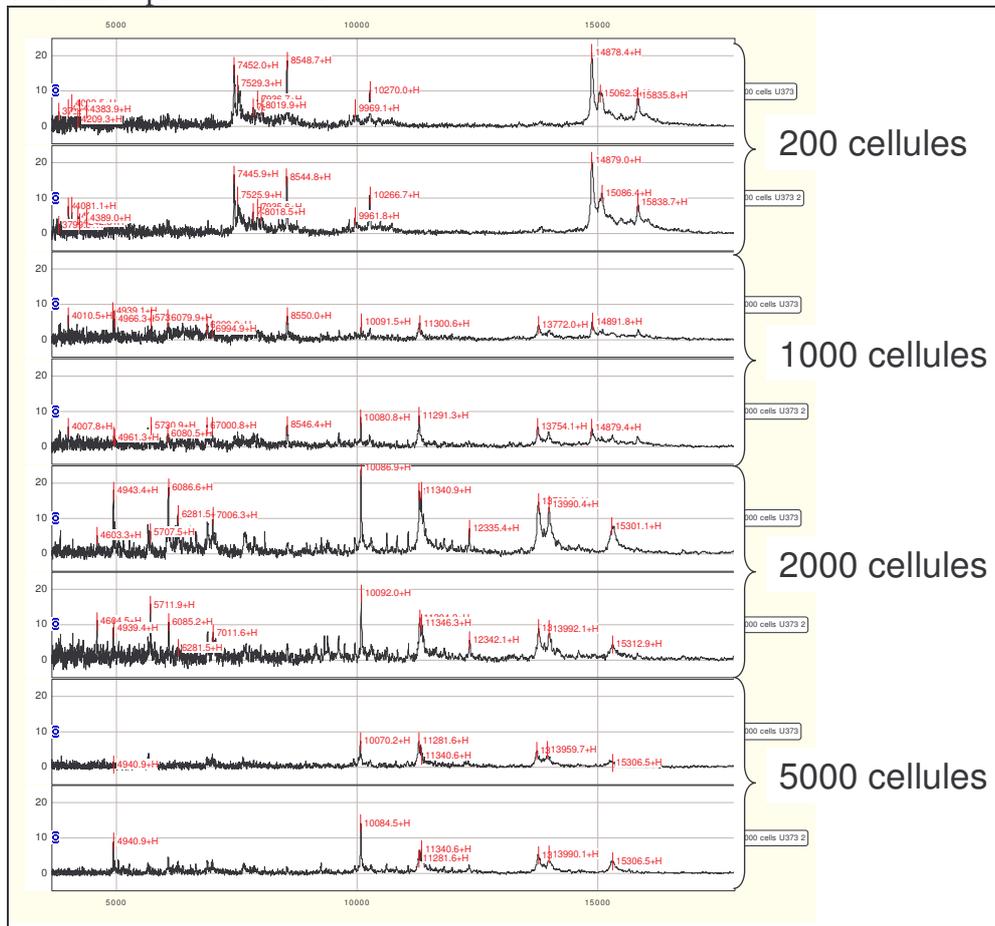


Figure 61 : Exemples de spectres pour différentes concentrations de dépôt de cellules U373. Les cellules sont cultivées et préparées selon le même protocole que précédemment. Elles sont analysées après 2 jours d'incubation. Les concentrations sont données en cellules/plot (dans des gouttes de 5 μ l), croissantes du haut vers le bas. Deux spectres correspondant à 2 plots différents montrent la reproductibilité après normalisation par intensité globale (explications dans le texte ci-dessous), dont l'utilisation est rappelée par le cercle bleu à droite des spectres. Les échelles d'intensités (verticales) et de masses (horizontales) sont identiques pour chaque spectre. Les spectres correspondants à 200 cellules par plots sont très similaires à ceux obtenus pour du milieu seul. Leur forme change lorsqu'on dépasse 500 cellules/plot (par exemple pour 1000 cellules/plot ici), attestant de l'influence de la présence des cellules. La qualité des spectres (résolutions des pics, intensités) est meilleure pour 2000 cellules par plot.

Chapitre 3 : Détection et quantification du signal

Au-delà de l'appréciation qualitative des spectres (plus ou moins de pics détectés, saturation par exemple – Figure 61), des analyses plus quantitatives ont posé le problème de la normalisation. Les acquisitions de chaque plot sont différentes, du fait de la cristallisation de la matrice ou de la puissance du laser par exemple. Pour pouvoir appliquer des opérations mathématiques faisant ressortir des différences d'intensités entre les différentes conditions (différentes concentrations), il est nécessaire de normaliser les spectres. Lorsque deux conditions sont relativement proches, pour plusieurs exemplaires d'une même condition par exemple, il est possible de considérer que la quantité totale de protéines présente dans l'échantillon doit être identique. Cela se traduit par une homothétie des spectres pour arriver à une aire sous les pics identique (multiplication par un facteur différent pour chaque spectre). Les différentes conditions peuvent être harmonisées entre elles à l'aide de cette méthode, mais aucune normalisation n'est évidente pour deux concentrations différentes par exemple.

Une autre méthode de normalisation possible repose sur la présence d'un (ou plusieurs) pic(s) dont l'intensité ne doit pas varier selon les conditions (un calibrant interne). Il peut être présent naturellement, ou alors ajouté à la préparation avant l'application de la matrice. Pour des cultures cellulaires, la complexité des spectres ne permet pas d'ajouter de calibrant, car leurs pics sont masqués par l'échantillon. Nous avons recherché un pic dont l'intensité soit proportionnelle à la quantité de cellules présentes, d'abord visuellement et sans succès, puis à l'aide de méthodes d'analyse bioinformatiques. Cette dernière étape sera présentée au paragraphe suivant.

La spectrométrie de masse directe sur des cultures cellulaires en micro-gouttes a été montrée. Nous avons identifié certains paramètres d'ajustement qui doivent être étudiés pour chaque modèle cellulaire. La suite de ce chapitre présente une application de cette technique pour la caractérisation multiparamétrique de plusieurs phénotypes cellulaires.

3.2.3 Signature phénotypique en spectrométrie de masse

3.2.3.1 Principe

La spectrométrie de masse permet de recueillir un spectre contenant de nombreux pics (plusieurs centaines) pour chaque échantillon testé. Les spectromètres et les manipulations ont atteint une qualité de reproductibilité qui rend possible la comparaison des échantillons entre eux, sur un même support, ou sur différents substrats (après normalisations). La culture cellulaire est un échantillon dont les caractéristiques globales sont relativement contrôlées et peu variables d'un échantillon à l'autre en ce qui concerne l'analyse par spectrométrie de masse (les spectres obtenus par la méthode directe sont reproductibles). Parmi la forêt de pics obtenue, certains quantifient la présence de substances (des peptides ou des protéines par exemple) qui peuvent être impliquées dans des phénomènes biologiques d'intérêt. Les modifications de leur quantité relative sont la révélation d'une différence de phénotype entre deux populations cellulaires.

Cependant la complexité (de nombreux pics non informatifs) et la variabilité (les pics non spécifiques du phénotype évoluent) des données résultant d'une analyse par spectrométrie de masse nécessitent l'utilisation de méthodologies bio-statistiques plus complexes qu'une simple observation visuelle (apparition – disparition de pics). Le but de ces analyses est de déterminer un ensemble de pics dont les modifications d'intensités entre deux conditions de culture différentes soient spécifiques d'une différence de phénotype. Ils représentent une signature phénotypique. Par analogie avec une méthode d'analyse haut-contenu en fluorescence, la signature phénotypique est le vecteur multiparamétrique discriminant deux conditions de culture, dans lequel les pics remplacent la morphologie ou l'intensité d'une fluorescence.

3.2.3.2 Différenciation de phénotypes : apoptose et prolifération

Pour démontrer la validité de cette approche nous avons choisi de caractériser deux phénotypes impliqués dans la mortalité cellulaire. Ce phénotype est un élément majeur de la recherche en biologie pour les applications de cancérologie ou de toxicologie/toxicité par exemple. Les différents projets d'application de la technologie que nous avons menés tournent autour de la mort cellulaire (cancer – voir chap 4 et toxicité par exemple). Elle est généralement étudiée de manière simple en comptant les cellules présentes dans une culture cellulaire.

En réalité la mortalité regroupe plusieurs mécanismes cellulaires différents qui peuvent mener à la diminution du nombre de cellules dans une culture apoptotique ou non (nécrose par exemple) [153-Edinger]. Pour les distinguer, il faut caractériser plusieurs marqueurs. Nous faisons l'hypothèse que l'utilisation de la spectrométrie de masse permet d'identifier une signature différenciant d'emblée la viabilité (conditions normales), la mort par apoptose et la mort non-apoptotique.

3.2.3.2.1 Conditions expérimentales

La diminution du nombre de cellules suite à des phénomènes de mortalité n'est pas immédiate. De nombreux événements ont lieu, de l'intégration de la drogue provoquant la mort à l'enclenchement des processus protéiques et leur impact sur la cellule par exemple. Une période d'« incubation » allant généralement de 4 à 6 jours est nécessaire. Des marqueurs moléculaires existent notamment pour l'apoptose (Annexin 5, Molecular Probes), mais leur utilisation est grevée du manque de sensibilité des mesures par fluorescence par exemple. Celles-ci nécessitent une accumulation de signal dans la cellule (protéines produites) pour permettre une séparation significative des cellules vivantes et des cellules d'intérêt. Les observations sont généralement effectuées 4 à 6 jours après une stimulation. L'utilisation de plusieurs marqueurs massiques reflétant les modifications fines des contenus protéiques permet d'envisager une détection précoce de ces phénomènes

De plus, nous avons vu précédemment que le nombre de cellules pouvait modifier le profil spectral obtenu de manière importante. L'étude par spectrométrie ne peut pas être réalisée dans des conditions où le phénotype de mortalité se traduirait par une diminution du nombre de cellules sans un processus de normalisation complexe nécessitant des recherches approfondies que nous n'avons pas abordées. Nous avons recherché une signature différenciant des cellules U373 traitées avec une drogue utilisée en chimiothérapie (Cisplatine, appelée CDDP, pour une description plus précise de son mode d'action voir chap. 4) de cellules traitées avec une drogue provoquant l'apoptose (TNF pour « Tumor Necrosis Factor » en anglais ou « facteur de nécrose des tumeurs » en français) sur plusieurs concentrations. Le protocole est décrit dans la figure ci-dessous (Figure 62).

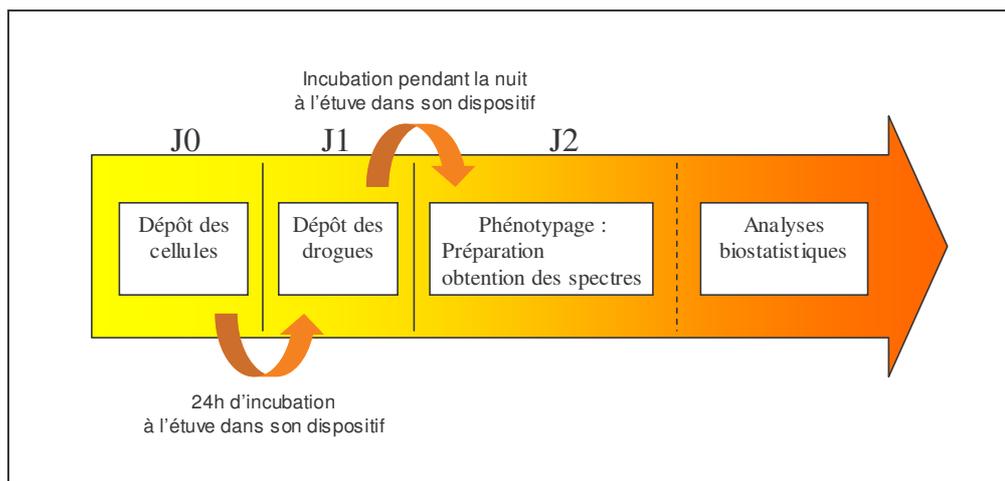


Figure 62 : Protocole d'obtention d'une signature phénotypique sur cellules U373 cultivées en gouttes de 5µl sur un support de spectrométrie de masse NP20

3.2.3.2.2 Stratégie d'analyse

L'appareil de spectrométrie de masse utilisé pour ces manipulations (PBSII – CIPHERGEN) fait partie d'une plateforme complète dédiée à la découverte de biomarqueurs en cancérologie clinique au CHU de Grenoble (unité INSERM U318 – François BERGER). Le logiciel associé intègre des outils statistiques robustes que nous avons adaptés à notre problématique. Nous n'entrons pas dans le détail du fonctionnement de ce logiciel mais présentons quelques éléments qui permettront de juger de la pertinence de l'approche. Les statistiques ne donnant pas de résultats certains, une approche « aveugle » comme celle décrite ici ne peut se justifier que pour des modèles bien connus que nous avons précisément définis dans des expériences de mise au point utilisant des méthodologies éprouvées (voir perspectives paragraphe 3.2.3.3).

Normalisation

A la fin des expériences nous disposons de spectres correspondant à chaque exemplaire de chaque condition. La première étape de l'analyse consiste à normaliser (voir chapitre 3.2.2.3). Les différents exemplaires de chaque condition sont facilement normalisables en utilisant l'hypothèse selon laquelle le contenu moléculaire total doit être identique (l'aire sous les pics est conservée). A l'inverse, il est plus difficile de définir une stratégie de normalisation globale entre les échantillons. De même que précédemment nous ne disposons pas de témoin interne pouvant nous servir d'étalon. Une possibilité serait de considérer qu'au vu de la cinétique employée (une nuit de traitement), aucune modification globale ne doit apparaître sur la quantité de protéines produite (pas de diminution du nombre de cellules), la normalisation par intensité totale étant alors possible. Dans les faits, cela revient à appliquer un coefficient multiplicateur à chaque spectre dans son ensemble pour réaliser une homothétie, ce qui signifie que toute modification relative au sein d'un même spectre ne sera pas gommée (tout au plus pourra-t-elle être accentuée). Cependant des comparaisons d'intensité entre spectres peuvent devenir difficilement interprétables. Dans un premier temps nous nous sommes contentés d'une normalisation des différents exemplaires d'une même condition, sans normalisation entre conditions. Dans le cas où cette stratégie s'avèrerait infructueuse, une deuxième phase s'attacherait à explorer d'autres possibilités. Une manière rapide d'identifier une signature suspecte de ce point de vue consiste à vérifier qu'elle ne différencie pas simplement les groupes en fonction de leur normalisation. Ces signatures douteuses ne représenteraient que des modifications unidirectionnelles d'intensités, que des augmentations par exemple, qui sont corrélées aux facteurs multiplicateurs employés lors de

Chapitre 3 : Détection et quantification du signal

la normalisation. Par exemple si la normalisation a conduit à multiplier les intensités d'un spectre 1 par 2 par rapport à un autre (spectre 2), et que la signature ne contient que des pics dont les intensités dans le spectre 1 sont supérieures à celles du spectre 2, de sérieuses précautions doivent être prises dans l'interprétation de cette signature.

Identification des pics dont les variations sont significatives

Parmi la forêt de pics que représente un spectre, nombreux sont ceux dont les variations d'intensités ne reflètent que la variabilité de la détection (bruit technique) ou des cultures cellulaires (bruit biologique). Pour identifier les pics dont les variations sont significatives entre conditions mais pas au sein d'un même groupe de cultures cellulaires, nous appliquons une démarche statistique. Dans un premier temps nous ne considérons que les pics dont les variations à l'intérieur d'un spot et entre les réplicats sont faibles. Un test statistique de Mann-Whitney permet de les identifier. Le critère de rejet est imposé arbitrairement à 0,05. Il pourra être optimisé de manière itérative lors des étapes suivantes.

Evaluation de la capacité des pics sélectionnés à séparer des conditions de traitement

Dans une approche empruntée aux études transcriptomiques (puces à ADN [158-Eisen], voir 157), des algorithmes de clustering hiérarchiques non supervisés sont utilisés. Ils permettent de regrouper entre eux les échantillons (définis par leur signature constituée des pics sélectionnés à l'étape précédente) dont les comportements sont les plus proches, indépendamment de leur origine. Une bonne signature doit pouvoir regrouper les échantillons d'une même condition entre eux et classer les conditions. Lorsqu'un classement n'est pas satisfaisant (cellules sans drogue regroupées avec des cellules traitées par exemple), cela signifie que la signature utilisée n'est pas assez spécifique. Le critère de sélection des pics peut être durci (seuil de p-valeur plus faible) pour améliorer la signature.

3.2.3.2.3 Résultats

Ces analyses ont été menées sur des cellules stimulées par plusieurs concentrations des différentes drogues dans une même expérience. L'effet des concentrations utilisées sur les cellules U373 a été confirmé par des méthodes classiques (fluorescence et comptage) sur la barrette de spectrométrie de masse et en plaque 96 puits.

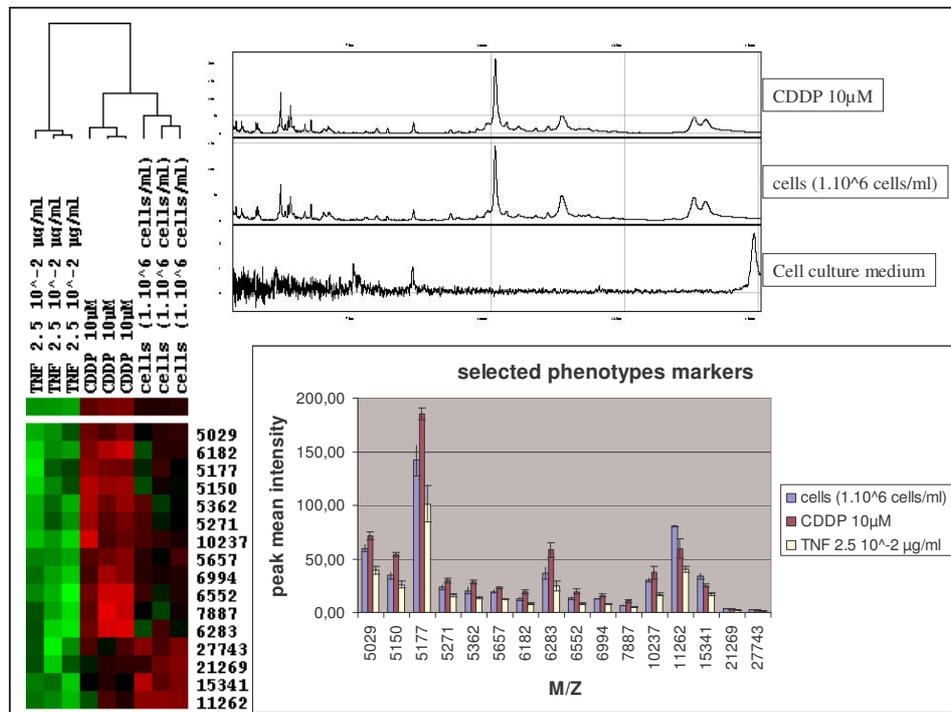


Figure 63 : Profil SELDI-TOF différenciant des cellules apoptotiques et des cellules traitées au CDDP, de cellules non traitées après un contact d'une nuit avec les drogues. Les cellules déposées en gouttes de 5µl sont incubées pendant un jour à l'étuve dans un dispositif de vapeur saturante avant d'être exposées aux drogues. Concentrations finales dans la goutte : CDDP 10µM, TNF 2,5.10⁻²µg/ml. 3 exemplaires de chaque condition ont été répartis sans lien géographique sur 3 puces (CIPHERGEN, NP20 C553-0043) et incubées pendant la nuit. Après 2 rinçages dans une solution d'Hepes 2mM, les puces ont été séchées à l'ambiante et 0,8µl de matrice (SPA, CIPHERGEN C300-0002) ont été ajoutés deux fois à chaque plot. Les 3 puces ont été analysées en même temps dans le spectromètre (ProteinChip® System Series 4000 - CIPHERGEN). (a) Spectre des cultures cellulaires. Une inspection visuelle ne révèle aucune différence notable entre les conditions de traitement. (b) Les pics significatifs (p-valeur < 0,05) ont été analysés par clustering à l'aide du logiciel proposé par M.B. Eisen [158]. 16 pics classent les conditions de culture. (c) Graphique montrant les moyennes par condition des intensités des pics sélectionnés. Les barres d'erreur sont les écart-types.

Un ensemble de 16 pics a permis de classer les concentrations les plus fortes de chaque drogue. La signature obtenue n'est pas unilatérale puisque par exemple les pics à 5177 Da et à 11262 Da se comportent de manière opposée (Figure 63). La normalisation effectuée n'est donc pas préjudiciable.

Ces résultats tiennent compte d'un filtre supplémentaire. Nous avons vu que la concentration de dépôt des cellules modifiait les spectres. Le nombre de cellules déposées par plot est très variable même dans des conditions macroscopiques telles que celles utilisées ici. Dans l'hypothèse où la rapidité du phénotypage ne permet pas un changement significatif du nombre de cellules lié à une mortalité induite par les drogues, les pics sélectionnés ne doivent pas refléter une variation du nombre de cellules. Avec la même méthodologie d'analyse, une

expérience supplémentaire nous a permis d'identifier des pics qui permettaient de séparer plusieurs concentrations cellulaires de dépôt. Quelques-uns avaient été pris en compte dans la signature phénotypique de la mortalité. Dans la mesure où, lorsqu'ils sont enlevés, les pics restants sont toujours capables de classer les conditions d'intérêt, ils n'ont pas été intégrés dans la signature terminale (présentée Figure 63).

Par ailleurs, il n'a pas été possible d'identifier un ensemble de pics qui soit capable de différencier l'action des drogues en fonction de la concentration appliquée. Cela peut être dû à l'utilisation de concentrations trop faibles (5 μ M et 1 μ M pour le CDDP par exemple) qui n'ont pas d'action pour une durée de contact aussi courte ou à une dérive dans les logiciels de clustering.

3.2.3.3 Perspectives : applications

Nous avons montré l'utilité de la spectrométrie de masse pour identifier des marqueurs moléculaires différenciant l'action de deux drogues dans un mécanisme de mort cellulaire. En la comparant avec les méthodes existantes, plusieurs avantages techniques s'imposent. Premièrement, la quantité d'échantillon utilisé se rapproche de la miniaturisation que nous poursuivons avec les puces à cellules. Plus particulièrement le phénotype se traduisant par la diminution du nombre de cellules est très sensible à la réduction du volume d'échantillon, puisque les variations observées sont difficilement significatives dans ces systèmes. La spectrométrie de masse permet d'obtenir une analyse plus fine de l'échantillon cellulaire, dont les résultats se rapprochent des techniques haut-contenu en imagerie (analyse multiparamétrique). Deuxièmement, la complexité des signatures (plusieurs pics) permet aussi une meilleure sensibilité de la détection des changements de comportement des cultures cellulaires. Ainsi une nuit de contact avec les drogues est nécessaire pour obtenir une information significative, alors que les méthodes classiques prennent plusieurs jours.

La signature identifiée peut être utilisée par la suite comme marqueur du phénotype. Toute modification de celle-ci par un stimulus externe (candidat médicament ou acteur de l'expression génétique) est interprétable fonctionnellement comme une action sur le phénotype. Cela a un intérêt dans les processus de criblage fonctionnel (génomique fonctionnelle ou criblage pharmaceutique par exemple), d'autant plus que cette technique permet des décryptages précoces.

Une application pharmacologique peut aussi être envisagée dans le cas où la signature renseigne sur « l'intensité » du phénotype à la manière d'un marqueur fluorescent : plus l'intensité de la signature (terme à définir, on peut encore une fois effectuer une analogie avec le haut-contenu) est élevée, plus le phénomène est accentué (mortalité par exemple). Nous n'avons pas démontré la faisabilité de cette approche.

Par ailleurs, les pics qui constituent la signature peuvent être identifiés par des méthodes plus poussées de spectrométrie de masse (MS/MS par exemple). Cela signifie que la masse du pic est traduite en séquence de fragments protéiques ou peptidiques. L'implication de ces molécules dans le phénotype étudié pourrait être mise en lumière pour conduire à une meilleure compréhension des mécanismes qui le gouvernent.

Les manipulations menées au cours de cette thèse n'ont eu vocation qu'à montrer la faisabilité technique d'une détection phénotypique par spectrométrie de masse sur des cultures cellulaires en gouttes. De nombreuses expériences complémentaires sont nécessaires pour évaluer la portée des signatures identifiées par l'approche évoquée ici. A court terme et pour envisager des applications pharmacologiques, il faudra démontrer leur capacité à séparer les différentes concentrations d'une même drogue. L'indépendance de la signature vis-à-vis

du type cellulaire reste à envisager. L'utilisation d'autres drogues liées aux mêmes phénotypes (mort cellulaire apoptotique et non-apoptotique) permettra de vérifier le fait qu'il s'agit bien d'une signature phénotypique globale et non pas simplement d'un marqueur de l'action d'une drogue particulière. A moyen terme, l'identification précise des fragments peptidiques et protéiques mis en jeu pourra valider biologiquement la capacité de cette technique à découvrir de nouveaux biomarqueurs. L'utilisation d'autres techniques de spectrométrie de masse (notamment MALDI) ou d'autres méthodes plus stringentes de préparation d'échantillons (autres barrettes SELDI, surfaces hydrophobes notamment) pourront sans doute augmenter la significativité des profils obtenus. Enfin à plus long terme et sous réserve de la validité de l'approche, l'automatisation poussée à haut-débit (robot de dispense, miniaturisation) pourrait entraîner l'intégration de la spectrométrie de masse dans les processus de recherche à grande échelle en biologie.

3.2.4 Imagerie de culture cellulaire par spectrométrie de masse

3.2.4.1 Principes

Les techniques de spectrométrie de masse analysant les surfaces d'échantillons solides (MALDI ou SELDI par exemple) utilisent des faisceaux énergétiques (lasers, ioniques ou atomiques) pour désorber et ioniser localement la matière. Suivant le principe d'un scanner de puces à ADN, si le faisceau parcourt la surface en opérant à chaque fois sur une partie localisée de celle-ci, les informations obtenues en chaque « point » de désorption peuvent être reliées à une position géographique : chaque point de désorption devient un pixel, élément d'une image. Un scanner de puces en fluorescence (ou un microscope confocal) permet d'obtenir une image de l'échantillon par « couleur », c'est-à-dire par marqueur fluorescent utilisé. Chaque point de l'échantillon est observé sous plusieurs modalités. Généralement il est nécessaire d'illuminer le point autant de fois qu'il y a de marqueurs.

En spectrométrie de masse, une « illumination » (un tir laser par exemple) par le faisceau de désorption conduit à un spectre, c'est-à-dire plusieurs dizaines (ou plus suivant la technique utilisée) de pics pour un pixel. Après un balayage complet de la surface, il est possible d'obtenir autant d'images de l'échantillon qu'il y a de pics dans les spectres. De plus et de la même manière que pour la technique décrite précédemment, aucune étape de marquage de l'échantillon n'est nécessaire.

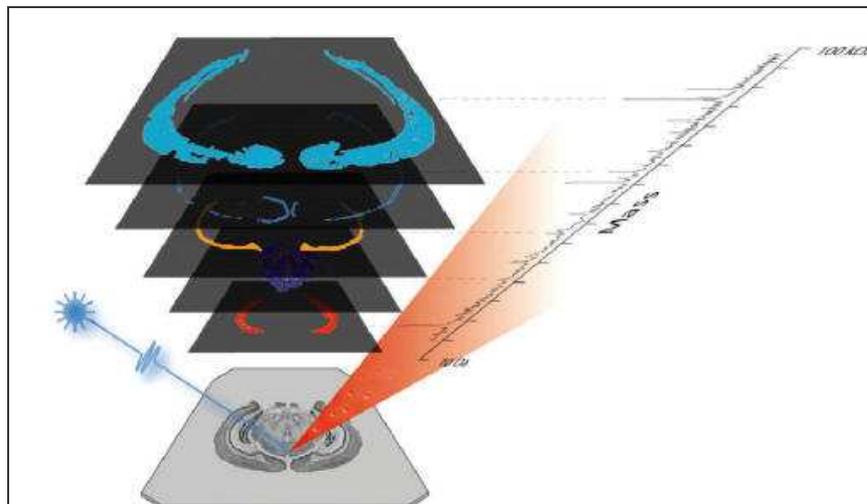


Figure 64 : Principe de l'imagerie par spectrométrie de masse (provenant de <http://maldi-msi.org/technology.htm>). Le faisceau (en bleu) désorbe l'échantillon en un point donné. Une image par pic des spectres est obtenue.

Cette technique d'observation est employée principalement pour des études de surfaces solides en sciences des matériaux par exemple. Les performances des technologies ont longtemps été insuffisantes pour pouvoir envisager leur utilisation sur du matériel vivant. La sensibilité aux contaminations et la résolution des faisceaux n'étaient pas en rapport avec les besoins biologiques. Des avancées récentes dans les traitements d'échantillon et dans les appareils de spectrométrie de masse ouvrent un champ très large de nouvelles applications [159-Rubakhin, 160-161-Chaurand].

3.2.4.2 Spectrométrie TOF-SIMS

Les machines dont nous disposons (SELDI 1^{ère} génération, MALDI) n'atteignent le niveau de qualité requis pour des expériences d'imagerie sur des cellules. La taille des faisceaux utilisés dépasse la dizaine de microns et ne donne pas accès à des résolutions spatiales assez précises. De plus leur sensibilité n'était pas suffisante pour pouvoir se passer des étapes d'accumulation des spectres sur toute la surface par exemple. Pour obtenir des pics interprétables dans un spectre de MALDI, il est nécessaire de bombarder l'échantillon plusieurs fois en des endroits différents. Les différents résultats sont ajoutés, pour augmenter le rapport signal sur bruit.

De nombreuses études utilisant des techniques de spectrométrie plus pointues ont montré la faisabilité et l'intérêt de l'imagerie par spectrométrie de masse dans des applications cliniques [162-Caprioli]. En particulier la technologie SIMS (pour « Secondary Ion Mass Spectrometry » en anglais, spectrométrie de masse d'ions secondaires), utilisée généralement avec un analyseur TOF (« Time-of-Flight », temps de vol mentionné plus haut) permet d'obtenir des résolutions très élevées (détections d'éléments atomique) avec une sensibilité allant jusqu'à la femtomole.

Cette technique consiste à bombarder un échantillon avec un faisceau d'ions qui interagissent localement avec la surface (par une cascade de collisions) pour désorber et ioniser les éléments de la couche superficielle. Ceux-ci sont récupérés dans l'analyseur. En mode d'imagerie, il est possible d'atteindre une résolution spatiale de l'ordre de 100 à 200nm pour des images d'environ 1mm de côté (entre 5 μ m et 9 cm mais avec une résolution qui diminue lorsque la taille de la zone imagée augmente).

L'imagerie de tissus ou de cellules a été réalisée en utilisant des techniques de préparation relativement complexes (freeze fracture ou découpe laser par exemple) qui permettent de conserver intacts (localisation) les constituants atomiques de l'échantillon (comme les ions calcium par exemple) [167-Wittig]. Enfin la majeure partie des expériences conduites avec cette instrumentation de pointe utilise des marqueurs isotopiques (rapports N par exemple) pour traquer les localisations et/ou les quantités d'une molécule au sein d'une cellule. Ces procédés sont très complexes et ne s'intéressent qu'à une seule molécule par expérience, alors que les spectres donnent accès à beaucoup plus d'informations.

3.2.4.3 Preuve de concept

L'accès à un spectromètre TOF-SIMS performant nous a été accordé par la société Tascon (Gievenbecker Weg 15, 48149 Münster, Allemagne) dans le cadre d'un projet européen. Il s'agit d'une instrumentation lourde et complexe qui ne peut être manœuvrée que par des personnes expérimentées. Les mesures des résultats présentés dans les paragraphes suivants ont été réalisées par du personnel de Tascon. Elles ont pour but de montrer une première faisabilité de mesures sur des cultures de cellules en goutte. De nombreux développements restent à faire pour démontrer l'applicabilité de cette technique à des problématiques biologiques haut-débit compatibles avec les puces à cellules. Ces développements sont en cours.

3.2.4.3.1 Mise au point : étude des contaminations

La technologie TOF-SIMS est dédiée à l'analyse très fine de surfaces solides. Elle est très sensible à toute trace de contamination. De nombreuses applications en tirent profit pour du contrôle qualité par exemple. Pour pouvoir analyser l'influence de la présence de cellules, il est nécessaire de s'assurer que le signal véhiculé par la surface lorsque aucune cellule n'est présente ne masquera pas un signal spécifique.

Comme pour toute première expérience de culture de cellules en gouttes, nous avons utilisé les lames macroscopiques Teflon rouge. Cela permet de vérifier la faisabilité technique avant de lancer des manipulations impliquant des puces de plus haute densité, qui nécessitent des mises au point d'automatismes très lourdes pour ce genre de technique. Un exemple de spectres globaux obtenus par accumulation des intensités sur toute la surface est présenté dans la figure ci-dessous (Figure 65)

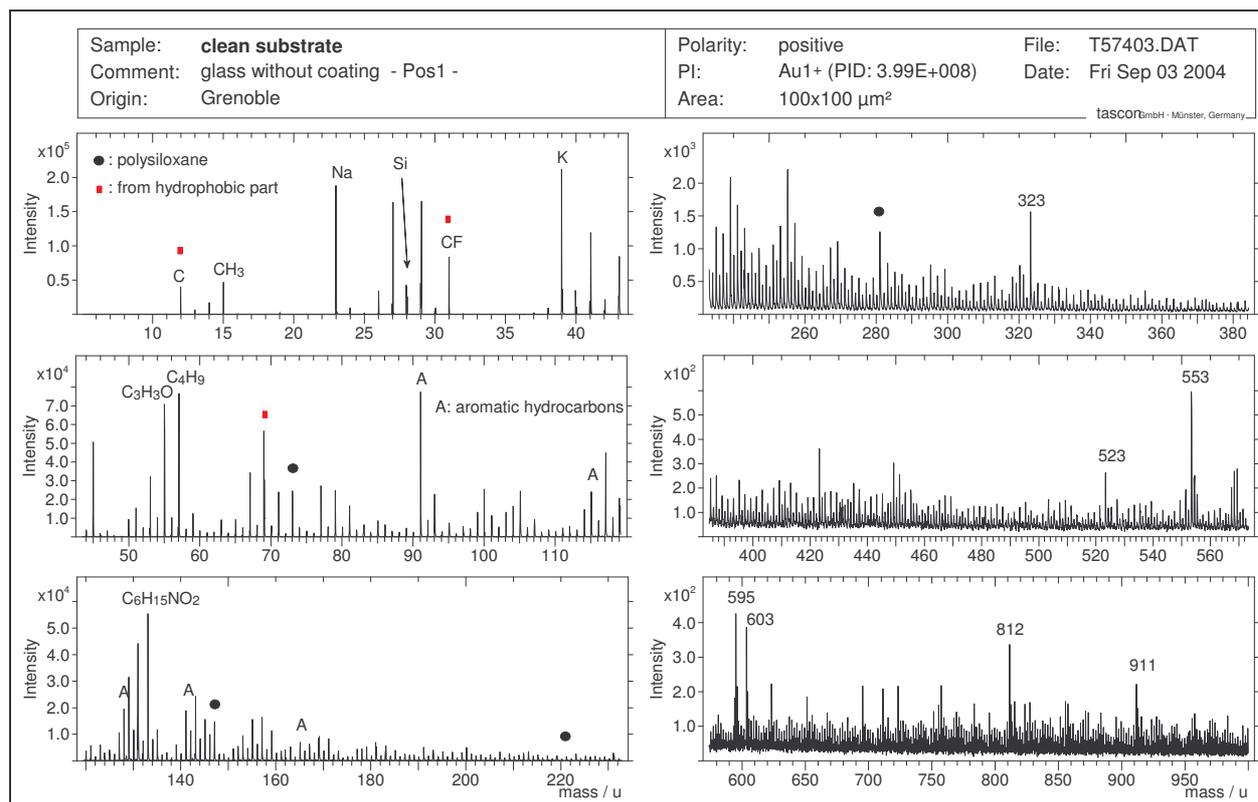


Figure 65 : Exemples de spectre global analysant la partie hydrophile (plot en verre) d'un substrat Teflon rouge en TOF-SIMS en polarité positive. Après des rinçages à l'eau et à l'éthanol (préparation identique à une expérience de culture cellulaire), le substrat est bombardé d'ions issus d'une source d'or (Au) plusieurs dizaines de fois en chaque point d'une surface de $100\mu\text{m}\times 100\mu\text{m}$. Les pics obtenus sont calibrés (on fait correspondre une masse à un temps de vol) et interprétés (on associe un élément à chaque masse) manuellement. Les polysiloxanes sont issus du verre de la surface. De nombreuses contaminations sont constatées. Plus particulièrement la présence de sels, d'hydrocarbones aromatiques (contamination organique), et de composés fluorés provenant de la couche hydrophobe sont détectés.

La présence des nombreuses contaminations gênera la détection des cellules par cette méthode. Les puces Teflon rouge sont acquises commercialement et aucune amélioration de leur état de surface n'est envisageable. Par contre cette technique a été utilisée pour quantifier la propreté et la qualité des substrats fabriqués au laboratoire et par la société Memscap. Par exemple aucune contamination ne provenait de la couche hydrophobe de silane, ce qui signifie que le procédé de fabrication est très propre. Des mesures sur les échantillons miniaturisés seront plus informatives.

3.2.4.3.2 Imagerie cellulaire

Le point majeur à considérer pour développer des mesures en imagerie sur des cultures cellulaires concerne les protocoles de fixation. Dans les études précédentes en TOF-SIMS, les préparations sont longues et complexes pour garder intacte la composition ionique des cellules (ions calcium ou potassium par exemple). Notre application ne se limite pas à l'analyse de ces constituants. Comme dans les expériences décrites au chapitre précédent (chap. 3.2.3), le but est d'obtenir une signature phénotypique. Les protocoles de fixation ne doivent changer ni la morphologie cellulaire ni la localisation des protéines par exemple, facteurs essentiels dans une optique d'imagerie. Nous nous sommes appuyés sur les compétences d'une équipe du professeur Jürgen Schnekenburger du centre hospitalier universitaire de Münster (Department of Medicine B, Westfälische Wilhelms-Universität,

Chapitre 3 : Détection et quantification du signal

Albert-Schweitzer-Strasse 33, 48149 Münster, Allemagne) qui avait déjà travaillé sur des spectromètres TOF-SIMS avec d'autres équipementiers.

Les premières études envisagées étaient destinées à essayer de distinguer deux lignées cellulaires du cancer du pancréas très proches : l'une se développe en amas (Patu 8988swt) et l'autre a tendance à former des métastases (Patu 8988tw). Les différences d'ordre morphologique sont facilement identifiables par microscopie (amas ou non). Une image de plusieurs pics de la lignée « Patu 8988swt » est présentée dans la Figure 66 ci-dessous.

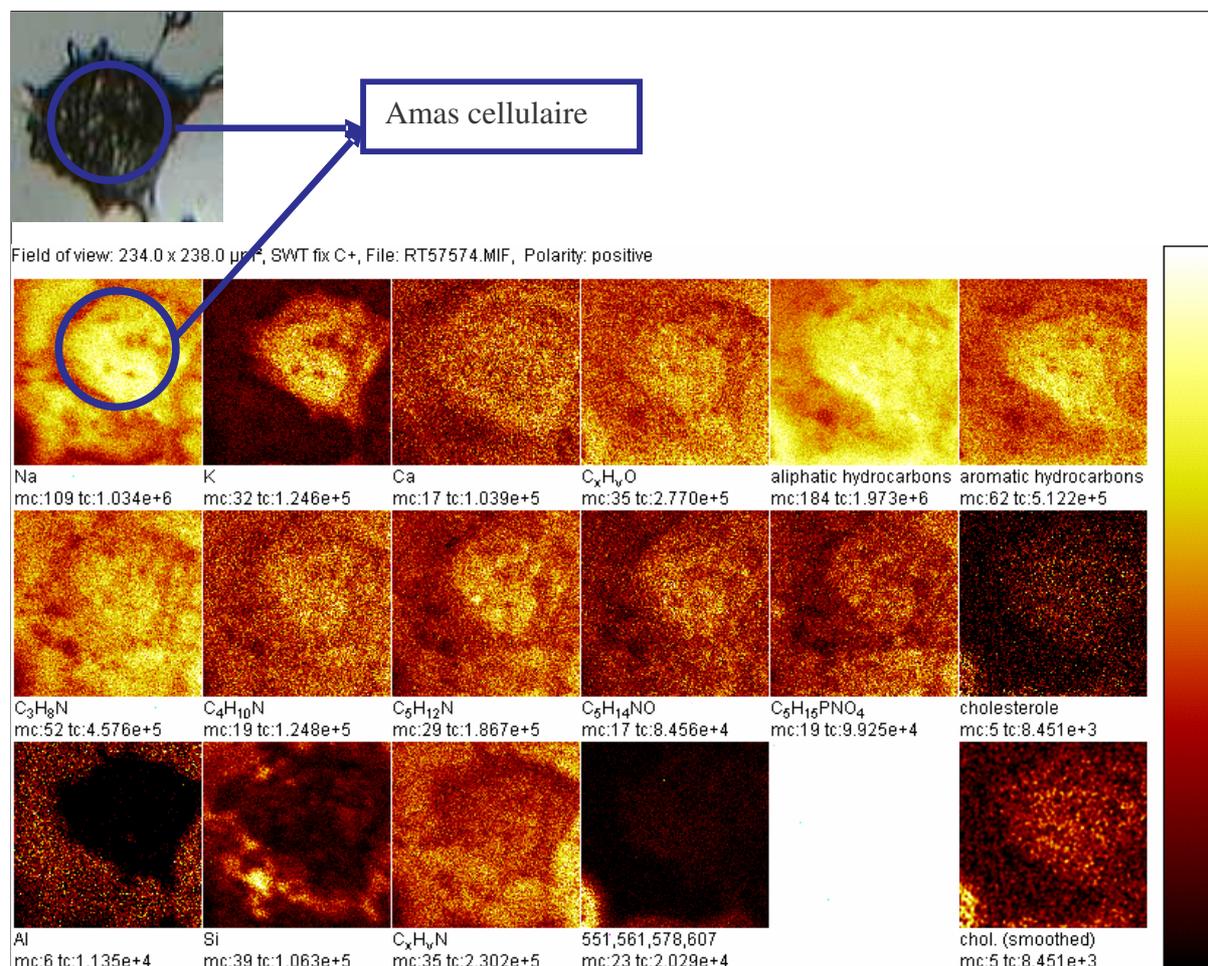


Figure 66 : images en microscopie et en spectrométrie de masse d'un amas de cellules (Patu 8988swt). Les cellules sont cultivées en gouttes de 5μl (50 000 cellules/ml) sur une lame de verre Teflon rouge pendant 2 jours. Elles sont ensuite fixées par trempage dans une solution de glutaraldéhyde 1%, puis rincées au PBS et à l'eau distillée avant d'être séchées à l'ambiante. Les images de 256×256 pixels obtenues ont une dimension de 250×250μm² environ (soit une résolution légèrement inférieure à 1μm²/pixel). La surface est bombardée avec des ions Au⁺, les ions secondaires sont récupérés en mode positif. Les codes couleurs correspondent à l'intensité relative de la présence de l'élément considéré du moins intense (noir) au plus abondant (jaune), le blanc signale une saturation du détecteur. En dessous de chaque image sont mentionnés l'élément considéré (interprété par des experts TASCAN) ainsi que l'intensité totale dans l'image en « mass count » (mc, nombre de détections unitaires par le détecteur).

Les contaminations identifiées plus tôt, notamment les sels (Na⁺ et K⁺) et les hydrocarbures aromatiques sont encore présents sur ces images. Quelques constituants organiques peuvent être corrélés visuellement avec la présence d'un amas cellulaire sans qu'une justification plus claire ne soit accessible.

Chapitre 3 : Détection et quantification du signal

En résumé, nous avons montré que des mesures par spectrométrie de masse TOF-SIMS sur des cellules cultivées en gouttes sont possibles avec des protocoles de fixation relativement simples. La masse d'informations accessible dans ces manipulations et l'expertise nécessaire à leur interprétation ont été des freins à l'élaboration d'un plan d'expérience plus complet au cours de cette thèse. Par exemple nous n'avons pas pu mettre en évidence des pics caractéristiques de la présence de cellules. Ces essais ont toutefois permis de prendre conscience de certains des enjeux inhérents à une technique de phénotypage aussi complexe.

3.2.4.4 Perspectives

L'applicabilité de la technologie TOF-SIMS à des expériences d'imagerie de puces à cellules semble limitée par plusieurs aspects. Tout d'abord, d'un point de vue pratique, l'acquisition d'une image d'un plot de 500 μ m de diamètre par exemple peut prendre plusieurs dizaines de minutes. Cette durée n'est pas due aux processus physiques mis en œuvre qui sont relativement rapides mais à la constitution des images elle-même (processus de reconstruction) par des méthodes informatiques. La prise d'image d'une puce entière de 400 plots peut durer plusieurs jours. Dans le même ordre d'idées, l'évaluation et la qualification des données sont encore manuelles et peuvent prendre plusieurs heures pour un spectre. Les analyses d'images complexes sans outils automatiques dédiés sont des processus beaucoup trop lents pour montrer un intérêt dans des applications de criblage. Cependant les progrès techniques accomplis par la spectrométrie TOF-SIMS sont très rapides et permettront sans doute de dépasser ces limitations. Plus particulièrement l'utilisation de marqueurs massiques peut grandement accélérer le processus d'analyse des données. Dès qu'on dispose d'une signature d'intérêt, vérifier son évolution et sa localisation est une tâche très facilement automatisable puisque les autres informations contenues dans les spectres ne sont pas prises en compte. Les outils utilisés en imagerie par fluorescence (haut-contenu notamment) doivent pouvoir être adaptés relativement facilement à ce type d'analyse d'image puisque les données en entrée sont pratiquement identiques dans ce cas. Seule la phase exploratoire de recherche de la signature est consommatrice de temps.

Ensuite, cette technique ne donne accès qu'à des composés dont les masses sont inférieures à quelques milliers d'unités de masse (u), ce qui est en dessous des masses des protéines recherchées dans les applications de protéomique (les unités sont identiques même si les symboles diffèrent : 1u = 1Da). L'hypothèse selon laquelle la modification des rapports d'intensité de certains de ces composés pourrait se corrélérer à un phénotype cellulaire reste à démontrer. La variabilité des cultures cellulaires posera vraisemblablement des problèmes dans cette approche.

Enfin, les techniques de préparation d'échantillons doivent être très propres et reproductibles pour pouvoir obtenir des spectres de qualité suffisante et la collecte d'informations non contaminées. Celles-ci sont un pré requis essentiel à la réussite de toute démarche exploratoire dans l'utilisation d'une technique aussi sensible sur des échantillons aussi variables. Par ailleurs la spectrométrie TOF-SIMS ne donne accès qu'à la couche superficielle de la surface analysée. Les traitements des échantillons peuvent permettre de dépasser cette limitation pour aller étudier l'intérieur des cellules, mais leur mise au point reste à faire.

Chapitre 3 : Détection et quantification du signal

Ces limites sont liées à la technique de spectrométrie et ne remettent pas en cause la faisabilité de l'approche d'imagerie considérée. En réalité la spectrométrie de masse est une science qui subit une évolution très rapide du fait du potentiel de son application dans les sciences du vivant, ce qui permet d'envisager des progrès techniques à très court terme. Plus particulièrement, les limitations que nous mentionnions au sujet des techniques MALDI et SELDI concernant l'automatisation spatiale et la taille des faisceaux lasers sont maintenant pratiquement obsolètes. Des études ont montré la faisabilité d'imagerie tissulaire [162-Chaurand] par exemple. Cependant l'application à des cultures cellulaires pose toujours la question de la préparation des échantillons puisque la compatibilité entre les procédures de fixation, l'ajout de matrice et la qualité des spectres n'est pas certaine. Enfin les analyses des données issues des échantillons hautement hétérogènes que sont les cultures cellulaires rejoignent les approches d'imagerie haut-contenu par fluorescence, en les complexifiant puisque le nombre de « marqueurs » étudiés peut être très élevé. Cela représente un défi pour les spécialistes en analyse de données et un axe de recherche très prometteur.

En résumé, la miniaturisation permise par la culture de cellules en gouttes sur puces apporte la possibilité d'analyses haut-contenu automatisées par microscopie. D'abord la population entière de la culture cellulaire peut être analysée à la résolution des individus qui la constituent. Cela permet de prendre en compte et d'étudier l'hétérogénéité des cultures cellulaires vivantes. Ensuite, chaque individu est caractérisé par plusieurs paramètres grâce à la détection du contour des objets. L'application de ces concepts à un criblage de génomique fonctionnelle dans un contexte pharmacologique sera développée dans le chapitre suivant.

La fluorescence impose des traitements de la culture (marquages par exemple) qui peuvent conduire à des modèles moléculaires biaisés. De plus elle n'explique qu'une partie du phénotype des cellules (morphologie et localisation de quelques molécules). La spectrométrie de masse pourrait permettre de caractériser un phénotype beaucoup plus complexe puisque dans l'absolu, elle peut donner accès à beaucoup plus d'éléments du protéome de la cellule. Nous avons montré la faisabilité de son utilisation dans des phénotypages globaux à l'échelle de la population pour différencier deux phénotypes par une signature spectrale. Cette technique permet en plus d'obtenir des résultats fonctionnels sur les phénotypes des cellules dans des cinétiques plus précoces (1 jour au lieu de 4 par exemple). Les possibilités en terme d'imagerie que nous avons abordées ensuite ouvrent de grandes perspectives à plus long terme, car elles permettraient d'effectuer des analyses de nombreuses protéines non marquées à l'échelle d'une population entière. Cela rejoint et dépasse les enjeux que nous abordons dans le chapitre suivant, en terme d'analyse statistique.

Chapitre 4

Applications

4.1 Contexte :	125
4.1.1 <i>Les tumeurs cérébrales sont un enjeu clinique majeur</i>	125
4.1.2 <i>Hypothèses de travail</i> :	126
4.2 Objectifs et modèle :	127
4.2.1 <i>Sélection des gènes et modèles cellulaires</i>	127
4.2.2 <i>Méthode d'extinction : interférence ARN</i>	127
4.2.3 <i>Phénotype : mortalité cellulaire</i>	129
4.2.4 <i>Objectifs des mesures et contenu d'une expérience de criblage</i>	130
4.3 Implémentation et tests préliminaires :	132
4.3.1 <i>Séquence d'un criblage type</i>	132
4.3.2 <i>Tests préliminaires et calibrage</i> :	133
4.4 Considérations technologiques.....	137
4.4.1 <i>Limitations</i>	137
4.4.2 <i>Conséquences sur le modèle cellulaire et l'interprétation</i>	139
4.5 Tendances et résultats	140
4.5.1 <i>Analyse globale</i>	140
4.5.2 <i>Analyse haut contenu</i>	141
4.5.2.1 <i>Construction du modèle</i>	141
4.5.2.2 <i>Applications au criblage</i>	145
4.6 Conclusions technologiques – Perspectives biologiques	146

Chapitre 4 : Application

Étude de l'impact de gènes sur la chimiorésistance dans des modèles de glioblastomes

Les résultats concernant la mise au point de la technologie de puces à cellules en gouttes présentés dans les chapitres précédents montrent un fonctionnement bas débit (1 à une dizaine de conditions testées sur une puce). L'avantage principal de ces dispositifs réside dans la miniaturisation des volumes des réacteurs, qui conduit à une densité de réactions biologiques élevée (100/cm²). Dans ce chapitre nous présentons leur utilisation pour étudier l'implication de 50 gènes dans les phénomènes de chimiorésistance liés à des tumeurs cérébrales. Au-delà de son intérêt clinique et biologique fort, cette étude place la technologie dans des conditions d'utilisation la rapprochant de sa vocation première de criblage haut-débit. Elle permet d'intégrer les différents éléments que nous avons mis au point de manière séquentielle. Ces développements sont effectués en collaboration avec des biologistes, qui en seront les utilisateurs futurs, et ont été épaulés par l'équipe 'carte d'identité des tumeurs' de la Ligue contre le Cancer.

Au-delà des nécessaires adaptations techniques que l'intégration entraîne, ce projet a permis de mettre à jour les calibrations et les démonstrations qu'il faut conduire dans une première étape pour obtenir un processus d'expérimentation robuste avec cette technologie. Par ailleurs, la confrontation avec une application biologique a débouché sur des considérations d'analyse de données que nous n'avions pas anticipées et qui ont renforcées l'intérêt du haut-contenu et du contrôle qualité dans ce genre de procédé. La dimension « moyen débit » de ces analyses nous a permis d'avancer sans rester bloqués par des problèmes d'infrastructures et de ressources qu'un projet haut-débit n'aurait pas manqué de faire apparaître.

Dans la première partie de ce chapitre nous expliciterons les motivations et les hypothèses à la base de ce projet multipartenaire. La deuxième partie concernera le modèle biologique considéré ainsi que les techniques de génomique employées. Les calibrages et mises au point préparant les criblages seront présentés dans une troisième partie, validant les hypothèses sur le modèle. Enfin la dernière partie présentera les premiers résultats et la nécessité d'outils d'analyse haut-contenu. Il est important de mentionner que ce projet n'est pas terminé, notamment sur le plan de l'analyse de données.

4.1 Contexte :

la génomique fonctionnelle ouvre de nouvelles voies thérapeutiques pour le cancer

4.1.1 Les tumeurs cérébrales sont un enjeu clinique majeur

Les tumeurs cérébrales représentent environ 9% de la totalité des tumeurs. Elles sont la 3^{ème} cause de mortalité des 15-35 ans. Plusieurs tissus ou types cellulaires peuvent être atteints, et conduisent à des pronostiques et des développements différents. Plus particulièrement, les patients ayant un astrocytome voient leur espérance de vie ramenée à 12 mois en moyenne et seulement 10% d'entre eux répondent aux traitements chimiothérapeutiques alors que les oligodendrogliomes progressent moins vite et répondent bien à la thérapie. Leur taux de survie est de 85% à 5 ans et de 30 à 50% à 10 ans.

Le traitement le plus efficace reste la chirurgie intracrânienne, quand elle est possible, c'est à dire en dehors des zones cérébrales fonctionnellement importantes, en sachant que l'excision complète de la tumeur n'est jamais possible du fait du caractère infiltrant de ces

lésions. La chimiothérapie est une piste prometteuse, mais des résistances se développent rapidement. La compréhension des mécanismes qui sous-tendent la chimiorésistance pourrait ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques et améliorer le pronostic des malades. [168-Bulletin du Cancer]

4.1.2 Hypothèses de travail :

Les fondements biologiques de ce projet, les modèles cellulaires ainsi que les connaissances génomiques ont été apportées par l'équipe de l'unité INSERM U318, et sont reprises dans la publication [87-Schaack et al.]. Nous n'explicitons que les aspects principaux, nécessaires à la bonne compréhension des enjeux de ces criblages.

Dans le cadre d'une chimiothérapie, les résistances peuvent se mettre en place de plusieurs façons. La drogue peut être refoulée par les cellules, métabolisée, ou bien ses effets peuvent être réparés par des mécanismes de défense par exemple. Une partie des anticancéreux efficaces et employés plus particulièrement pour le traitement des cancers du système nerveux central ont une action cytotoxique par l'intermédiaire d'une fixation sur l'ADN des cellules, provoquant leur dégradation et l'entrée des cellules dans des mécanismes de mort programmée (agents alkylants par exemple). Ces mécanismes moléculaires conventionnels n'ont jamais été impliqués de façon bien convaincante dans les tumeurs cérébrales.

Par ailleurs des données génétiques (études transcriptomiques de l'unité U318, corroborées récemment par [169-Hamlat]) ont permis de détecter une délétion chromosomique (perte d'hétérozygotie) aux niveaux 1p et 19q dans les cellules des tumeurs d'oligodendrogliomes qui sont sensibles à la chimiothérapie, alors que ces chromosomes sont complets dans les tumeurs résistantes (Figure 67). Les régions 1p/19q contiennent des gènes impliqués dans le système de réparation de l'ADN (NER pour « nucleic excision repair » en anglais, « réparation d'excision nucléique » en français) par exemple.

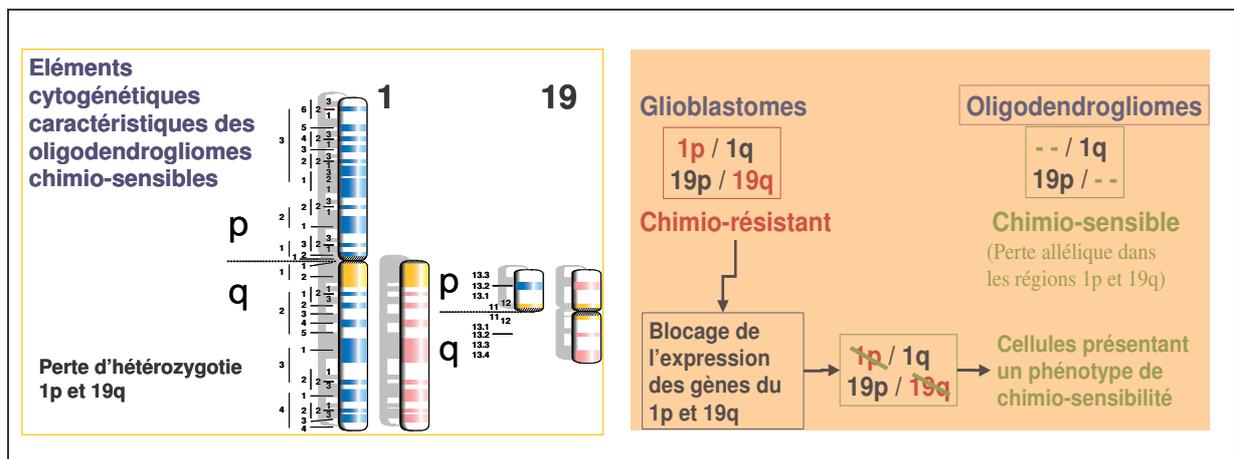


Figure 67 : Hypothèse thérapeutique de restitution de la chimiosensibilité dans les glioblastomes. A gauche, la perte d'hétérozygotie aux niveaux 1p et 19q entraîne une chimiosensibilité, qui pourrait être due à la présence de gènes impliqués dans les processus de réparation de l'ADN. A droite, une diminution de l'expression de certains gènes des régions considérées pourrait restituer une sensibilité. (Figure réalisée par François Berger – INSERM U318).

Chapitre 4 : Application

Ces deux constatations ont conduit à l'hypothèse selon laquelle la perte d'expression de certains gènes de la région considérée entraîne l'abandon des réparations des dommages causés par la chimiothérapie. Reproduire synthétiquement cette diminution d'expression pourrait permettre le retour de la sensibilité à la drogue et de l'efficacité du traitement chimiothérapeutique.

4.2 Objectifs et modèle :

En dehors des aspects technologiques de miniaturisation, ce projet de recherche s'attaque à deux objectifs principaux. Le premier, plus fondamental, cherche à reproduire dans des cultures de glioblastomes, la délétion chromosomique observée dans les astrocytomes à l'échelle de chaque gène, individuellement dans un premier temps, pour vérifier leur implication dans l'action des anticancéreux. Le second concerne les aspects cliniques, puisque tout produit renforçant l'action des drogues constitue une nouvelle voie thérapeutique digne d'intérêt. La stratégie de diminution d'expression, si elle est efficace, sera testée dans un processus clinique (modèles animaux et essais cliniques).

4.2.1 Sélection des gènes et modèles cellulaires

Les chromosomes 1p/19q rassemblent environ 1800 gènes. Pour des raisons de coût (réactifs, consommables), d'infrastructure (ressources en personnel et automatisation) et d'« humilité » pour cette première utilisation de la technologie, seuls 50 gènes sont sélectionnés. Ils proviennent des résultats d'une étude systématique à la recherche des gènes localisés sur les zones communes de perte d'hétérozygoties des oligodendrogliomes menée au CHU de Grenoble (François Berger, INSERM U318). Un set de 50 premiers gènes a été sélectionné, issus de cette étude.

Deux modèles cellulaires sont choisis. Les cellules U373 ont été dérivées d'un astrocytome humain et sont résistantes au CDDP, alors que les GHD sont une lignée obtenue par l'équipe de l'unité INSERM U318, qui est beaucoup plus représentative des conditions *in vivo* et n'est pas résistante au CDDP. D'un point de vue technique, les U373 sont des cellules de laboratoire classiques qui ne posent pas de problème en terme de culture, alors que les GHD sont plus fragiles et constituent un véritable test pour la technologie.

4.2.2 Méthode d'extinction : interférence ARN

La génomique fonctionnelle s'attache à identifier l'implication des gènes dans les fonctions du vivant, à travers les phénotypes. La diminution artificielle et spécifique de l'expression d'un gène permet de vérifier son action sur un phénotype donné. Pour réaliser ces expériences sur des cellules vivantes, plusieurs techniques sont disponibles, notamment la technologie antisens ou bien les ribozymes. Malgré de nombreux développements [par exemple 174-Kurreck et 176-Zhang], elles restent très complexes à mettre en place. Des effets non spécifiques (action sur un autre gène) sont difficiles à éviter. La stabilité des molécules effectrices et la robustesse de la délivrance ne permettent pas d'envisager sereinement des applications thérapeutiques.

Chapitre 4 : Application

En 1998, Andrew Fire et al. [177] ont identifié l'action de petites molécules d'ARN chez le nématode, qui éteignaient spécifiquement l'action de gènes. Par la suite ce mécanisme a été retrouvé chez les plantes puis chez l'homme. Il s'agit d'un phénomène endogène dans lequel une molécule d'ARN précurseur double brin est transformé par l'enzyme endonucléase « Dicer » en petits fragments de 21-23 nucléotides. Ceux-ci sont incorporés dans un complexe enzymatique RISC (pour « RNA-inducing silencing complex » en anglais, « complexe induit par des molécules d'ARN, inhibant l'expression de gènes ») auquel ils servent de guide pour cliver des molécules d'ARN homologues (ayant la même séquence) [178,179-Hannon, 180-Elbashir]. Ce mécanisme sert de protection contre la production d'ARN étranger (virus par exemple) ou bien de régulation de l'expression génétique avec les molécules « miRNA » (pour « micro-RNA » en anglais) [181- Ambros ; 182-Carrington et Victor Ambros].

L'interférence ARN peut être utilisée comme un outil en biologie, en amenant des molécules exogènes au niveau de RISC. Cela peut être réalisé de deux manières. La première consiste à y introduire directement les molécules d'intérêt de 21-23 nucléotides qui vont empêcher la formation des protéines pour lesquelles le gène ciblé code en se liant aux molécules d'ARN produites par l'expression de celui-ci dans RISC. Cette stratégie a pris le nom de « siRNA » (pour « small interfering RNA » en anglais, « petits ARN interférents » en français). La deuxième méthode passe par l'introduction de molécules dans les cellules qui vont être modifiées par la machinerie cellulaire pour donner les siRNA à l'intérieur des organismes (cellules, tissus ou animaux par exemple). Il s'agit des « shRNA » (pour « small hairpin RNA » en anglais, « petites molécules d'ARN en tête d'épingle » en français, du fait de leur appariement particulier). Nous avons choisi d'utiliser des siRNA synthétiques, du fait de leur facilité de mise en œuvre (transfection « simple » par rapport à un plasmide pour les shRNA par exemple).

Cette méthode de diminution de l'expression s'est révélée passionnante puisqu'elle est hautement spécifique, très efficace et adaptable. De nombreuses applications de génomique fonctionnelle ont utilisé l'interférence ARN [183-Berns, 184-Kumar, 185-Willingham]. Son potentiel d'universalité a entraîné la création de nombreuses banques de molécules [186-Paddison], qui sont utilisées pour cribler systématiquement et à haut débit les fonctions des gènes. Ces expériences sont maintenant conduites dans des formats de puces à cellules [36-Sabatini, 76-Wheeler]. Pour une revue très complète sur l'état des recherches sur l'interférence ARN, le lecteur intéressé pourra se tourner vers le numéro spécial de « FEBS Letters » de Février 2005 [187- Ding ou 188-Gunter Meister et Thomas Tuschl].

De plus l'interférence ARN ouvre des perspectives thérapeutiques [189-Whelan ; 190-Forte]. Les molécules effectrices pourraient être utilisées comme des médicaments ou des drogues renforçant l'action d'autres thérapies par exemple. Quelques défis restent à relever dans ce domaine puisque leur effet n'est que transitoire, et qu'elles semblent entraîner une réponse inflammatoire (interféron) dans certains cas [191-Beal, 192-Paroo et David R. Corey]. C'est dans cette optique clinique que les partenaires du projet ont choisi d'utiliser le mécanisme d'interférence pour diminuer la chimiorésistance dans les tumeurs cérébrales. Cependant, même si elles permettent une grande adaptabilité, celle-ci est entachée du fait que les critères de design des molécules siRNA ne sont pas encore clairement définis [193-Delquin Gongg et James E. Ferrell, Jr]. Par prudence, nous avons choisi de tester 5 molécules différentes (séquences) par gène.

4.2.3 Phénotype : mortalité cellulaire

Le but du projet est de montrer que la diminution de l'expression de certains gènes améliore l'action d'un anticancéreux. Le phénotype considéré est la mortalité cellulaire : plus les cellules meurent, plus l'anticancéreux est efficace. Nous avons déjà mentionné la complexité de l'étude de la mortalité (chap 3.2). Classiquement, les biologistes utilisent des marqueurs pour quantifier le nombre de cellules dans une enceinte. Une baisse du nombre de cellules signifie une mortalité plus importante. Cette mesure a l'intérêt d'être directement représentative de la configuration clinique recherchée : moins de cellules cancéreuses (voir aucune). Les partenaires du projet utilisaient un principe colorimétrique (le MTT par exemple – ATCC ref 30-1010K, qui est aussi disponible en fluorescence), qui n'est pas applicable directement à la technologie de puces à cellules.

En partenariat avec les autres équipes du projet, nous avons choisi d'utiliser le kit Live-Dead de Molecular Probes (ref L7013). Il est composé d'un réactif qui s'accumule passivement dans les cellules dont la membrane n'est plus intacte (éthidium homodimer-2, fluorescence rhodamine 535nm en excitation, 634nm en émission) et d'un autre (syto10, fluorescence fitc 484nm en excitation, 505nm en émission) qui entre activement dans les cellules vivantes. Par ailleurs les cellules sont repérées et comptées par un contremarquage des noyaux (Hoechst, fluorescence de type dapi, 350nm en excitation, 461nm en émission).

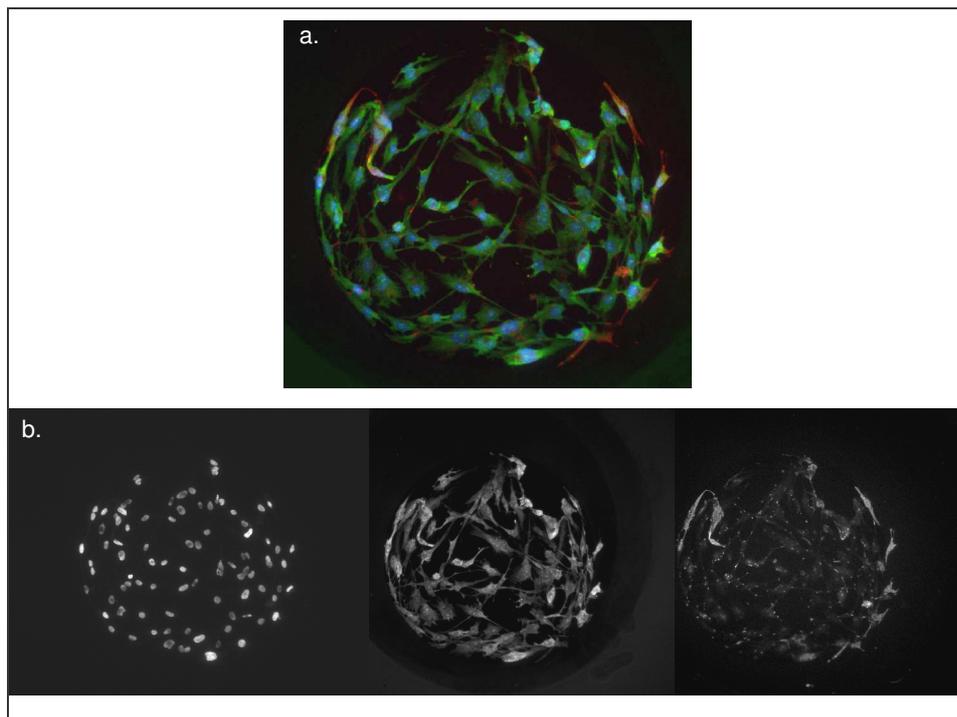


Figure 68 : 3 marqueurs pour distinguer les cellules vivantes des cellules mortes. Les cellules U373 sont cultivées en nanogouttes de 500 μ m de diamètre. Elles sont marquées avec le kit Live/Dead (Molecular Probes) avant d'être fixées au PFA 4%. Le marquage des noyaux (Hoechst) est réalisé après la fixation. Tous les marquages sont réalisés par trempage. Les images sont obtenues sur un microscope (objectif 20X) avec le logiciel PathFinder (IMSTAR). (a) image superposée des 3 couleurs. Les images en niveau de gris (b) sont colorées par le logiciel. (b) De gauche à droite, les noyaux marqués au Hoechst (fluorescence en bleu sur (a)), le cytoplasme marqué avec le syto10 (fluorescence en vert sur (a)), et le cytoplasme des cellules mortes marqué avec l'éthidium (fluorescence en rouge sur (a)). Toutes les cellules ont un marquage rouge non spécifique, mais les mortes montrent une augmentation de l'intensité spécifique.

Chapitre 4 : Application

L'utilisation de ce couple de marqueurs facilite la comparaison directe avec des résultats obtenus par d'autres équipes utilisant le même genre de mesure. Par contre, il ne permet pas de déceler les phénotypes plus précisément mis en jeu par la mesure : s'agit-il par exemple d'un arrêt de la prolifération ou d'une entrée en apoptose ? D'une part, dans la stratégie choisie, cette considération est importante pour le volet fondamental de l'étude (comprendre la génomique fonctionnelle de la chimiorésistance), mais elle peut être absente des considérations cliniques au moins dans un premier temps. Si le siRNA tue les cellules, il est digne d'intérêt pour une approche thérapeutique puisqu'il tuerait aussi les cellules au sein des tumeurs sans considération du mécanisme impliqué.

D'autre part, des tests de contrôle seront conduits dans des formats standard (microplaques par exemple) pour préciser les phénotypes concernés (apoptose ou non par exemple) mais aussi les mécanismes d'action. Ces tests permettront de valider les résultats positifs obtenus. Plus particulièrement, les résultats issus des criblages sur puces sont évalués par rapport à une manifestation phénotypique (nombre de cellules mortes), qui n'est peut-être pas la cause directe de l'action des siRNA. Par exemple la quantification des ARN messagers qui sont la cible directe des siRNA (par RT-PCR par exemple) validera le fonctionnement de la molécule.

L'étude porte sur une drogue particulière. Le CDDP (pour « CIS-DIAMINEDICHLOROPLATINUM » autrement appelé cis-platin, nom commercial Platinol®) est un agent alkylant utilisé pour le traitement des tumeurs cérébrales [194-Manish Aghi]. Au cours de l'étude d'autres drogues ont montré leur efficacité sur ce type de cancer. Suivant le même raisonnement que précédemment, les équipes partenaires valideront les résultats positifs sur cet autre modèle.

4.2.4 Objectifs des mesures et contenu d'une expérience de criblage

Un siRNA efficace est un siRNA qui augmente l'action du CDDP, c'est-à-dire que la mortalité d'une culture cellulaire ayant reçu du CDDP et le siRNA est supérieure à celle d'une culture n'ayant reçu que du CDDP. Un effet intrinsèque du siRNA peut être écarté lorsque les cultures ayant reçu la molécule (sans CDDP) ne présentent pas une mortalité supérieure aux cellules n'ayant rien reçu du tout (ni CDDP, ni siRNA). Par ailleurs pour des considérations pharmacologiques, nous considérons qu'un siRNA n'est efficace que si son action est corrélée à la dose délivrée (effet dose-réponse).

Deux approches sont toujours menées de front. D'un point de vue fondamental, un siRNA efficace agit par diminution de la quantité de protéines produite. Cette information n'est pas accessible dans le processus de criblage. Des expériences complémentaires sont nécessaires (Western blot ou RT-PCR par exemple). Pour pallier à ce manque, nous considérons qu'un gène est impliqué dans le phénotype si 3 séquences le ciblant sur les 5 testées sont efficaces.

D'un point de vue clinique, plusieurs autres options peuvent être envisagées. Tout siRNA qui entraîne une augmentation de la mortalité est digne d'intérêt d'un point de vue thérapeutique. Un effet intrinsèque (le siRNA sans CDDP induit une mortalité) en fait un candidat dans le traitement des tumeurs sans association particulière avec la chimiothérapie. Un effet indépendant de la dose (voir inversement corrélé) est pareillement intéressant. Enfin un siRNA qui augmente la résistance à la drogue est aussi à considérer puisqu'il signalerait un gène impliqué dans la chimiosensibilité (si son expression augmente, la résistance diminue), qui pourrait être utilisé comme nouvelle thérapie.

Chapitre 4 : Application

Cela conduit à un plan d'expérience où les différentes conditions sont :

- Témoins négatifs : sans siRNA, sans CDDP
- Témoins : sans siRNA, avec CDDP
- Test de l'effet intrinsèque : avec siRNA, sans CDDP
- Test de l'effet couplé : avec siRNA, avec CDDP
- 3 concentrations de chaque siRNA

Un exemple est donné dans la figure ci-dessous.

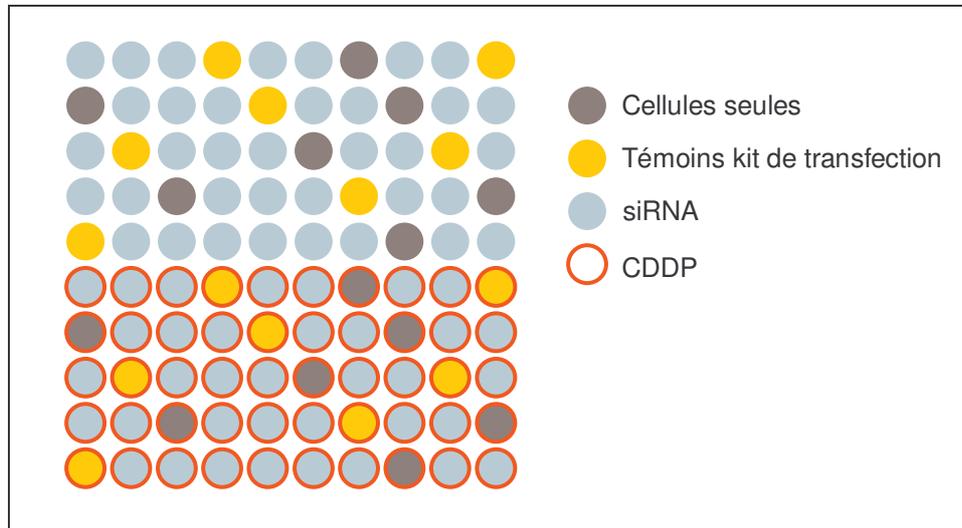


Figure 69 : Exemple de plan d'expérience d'un criblage de 12 siRNA à 3 concentrations (10, 25 et 100 nM) (soit 2 gènes complets et 2 siRNA). Les ronds dans la figure représentent les nano-gouttes disposées sur la puce. Les témoins « kit de transfections » valident l'innocuité de l'oligofectamine qui aide la transfection des siRNA. Les témoins sont répartis sur l'ensemble du bloc. Pour des considérations de praticité les siRNA sont disposés séquentiellement (1^{er} siRNA à la 1^{ère} concentration dans le 1^{er} plot, 2^{ème} siRNA à la 1^{ère} concentration dans le 2^{ème} plot, etc...). La disposition du CDDP (5 μ M) sur une moitié de bloc facilite une appréciation rapide et visuelle de la qualité de l'expérience : le nombre de cellules doit diminuer sur une moitié de la puce. Le plan d'un bloc est répété à l'identique sur les 3 autres blocs d'une puce de 400 plots. Cette disposition sans hasard ne permet pas d'identifier des biais technologiques spatiaux potentiels (évaporation, inhomogénéité de marquage par exemple). Ils devront être écartés lors de l'analyse. Les craintes de contaminations croisées sont diminuées par les expériences de mise au point effectuées précédemment (chapitre 2.2)

4.3 Implémentation et tests préliminaires :

4.3.1 Séquence d'un criblage type

La séquence d'une expérience de criblage est présentée dans la Figure 70 ci-dessous.

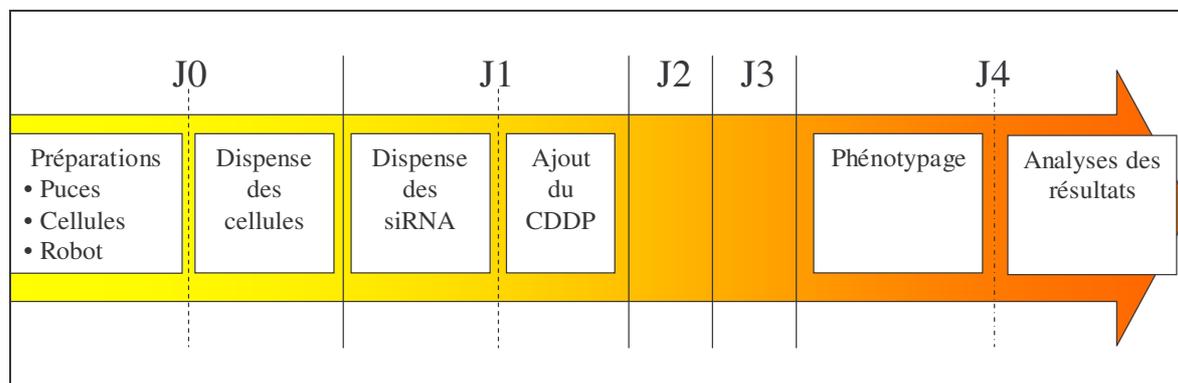


Figure 70 : Protocole de réalisation des criblages de siRNA dans l'étude de la chimiorésistance au CDDP dans des cellules U373. Les étapes d'analyse de résultats peuvent être effectuées bien après l'expérience puisqu'elles utilisent des données numériques non dégradables. Explications dans le texte.

Plusieurs hypothèses et considérations cinétiques sont à l'origine de la construction de cet enchaînement. La plupart sont fondées sur des résultats obtenus par les équipes partenaires du projet dans des microplaques (6, 24, ou 96 puits). Tout d'abord, il a été montré que l'impact du siRNA au niveau protéique (baisse de la quantité évaluée par western blot) ne se faisait sentir en moyenne qu'après au moins 48h d'incubation. En rappelant que les cellules ont besoin d'un jour de récupération après leur passage sur le robot de dispense, cela conduit à placer le dépôt des siRNA 3 jours avant le phénotypage.

Par ailleurs nous avons montré dans des expériences parallèles que la transfection de ce type de molécule dans ce type cellulaire en nanogouttes était plus efficace en utilisant un protocole direct (les cellules sont déposées avant les réactifs) qu'un protocole « inverse » (définition chapitre 1.4). Les cellules doivent être dispensées avant les siRNA. Pour des raisons pratiques, nous avons décidé de placer la dispense de cellule un jour avant la transfection, afin de leur permettre de récupérer de leur passage dans la buse d'éjection.

Enfin ces expériences doivent pouvoir être comparées facilement au même genre de protocole réalisé en microplaques. Ces études utilisent le nombre de cellules comme mesure de la mortalité. Il est évalué 3 jours après la stimulation au CDDP. De plus, pour que les cellules puissent s'attacher correctement à la surface des dispositifs, le CDDP est déposé un jour après les cellules. Le dépôt du CDDP avant ou après les siRNA a été un choix difficile à faire parce que les résultats en puits ont été contradictoires au moment de la décision. Ce choix dépend de la durée de vie des protéines mises en jeu et du temps nécessaire à l'activation des mécanismes réparateurs à la base de la chimiorésistance. Ces valeurs sont différentes pour chaque protéine considérée. En arrêtant une cinétique précise pour tous les siRNA, nous passons certainement à côté de molécules intéressantes dont la cinétique est différente (si la durée de vie de la protéine est plus longue alors l'effet du siRNA ne se fera pas sentir à temps). Ce choix est en accord avec l'approche de départ qui considère ces criblages comme des premiers tests qui n'ont pas vocation à trouver toutes les molécules d'intérêt.

4.3.2 Tests préliminaires et calibrage :

Les mises au point effectuées sur les éléments à la base de la technologie (les substrats, la dispense et le phénotypage haut contenu, chapitres précédents) ont permis de montrer la nécessité d'expériences préliminaires pour calibrer certains des paramètres des criblages. Les premiers criblages (et leurs échecs) ont démontré le besoin de points de contrôle sur d'autres paramètres. Ils visent à établir la qualité du modèle expérimental en validant certains choix techniques. Cela permet de réduire le nombre de contrôles sur les puces pour des résultats dont la reproductibilité est avérée. Une procédure complète rassemblant l'ensemble de ces expériences a été développée dans un but de standardisation de la technologie et de bonne pratique pour les nouveaux projets. Comme précédemment, la plupart de ces tests s'appuient sur des résultats obtenus par les collaborateurs du projet dans des conditions généralement macroscopiques, en microplaques ou bien sur des lames Teflon rouges. Ces tests se divisent en deux catégories. Certains correspondent à des calibrages du modèle biologique relativement indépendants de la technologie utilisée (toxicité et efficacité du kit de transfection par exemple). D'autres lui sont intimement liés. Nous ne détaillons que ces derniers.

Marquages

Les opérations pouvant influencer sur l'incorporation des marqueurs dans les cellules doivent impérativement être reproductibles si des algorithmes de traitement d'images sont employés pour les étapes de détection des cellules au sein des images. Cette étape nécessite la présence de deux marqueurs (chap 3.1.3.1), l'un servant à détecter les noyaux des cellules (le Hoechst) et l'autre à repérer les contours cellulaires. Dans un premier temps il a été envisagé de détecter les limites des cellules à l'aide de 2 marqueurs différents. En effet le syto 10 est utilisé pour marquer les cellules vivantes et l'éthidium pour les cellules mortes. Cependant, dès les premiers tests de marquage, il est apparu que pour les cellules U373, le syto 10 ne montrait aucune variation d'intensité au sein des plots, alors que l'éthidium permettait bien de différencier les cellules vivantes des cellules mortes (Figure 71). Dans un deuxième temps la stratégie de détection a été adaptée : elle utilise le syto10 seul pour la délimitation des contours cellulaires.

Plusieurs critères de réussite de l'étape de marquage peuvent être considérés par rapport aux différentes conditions testées. Tout d'abord, la détection des noyaux est une étape relativement tolérante en ce qui concerne la qualité du marquage. Il est toutefois recommandé d'obtenir un marquage homogène. Au contraire, la segmentation des cellules (délimitation des contours) est relativement contraignante puisqu'elle est fondée sur la détection de variations d'intensité fines. Enfin la qualité du marquage rouge n'influe pas sur l'étape de détection mais est cruciale lors de la quantification. L'homogénéité n'est pas un critère intéressant. Seul la démonstration de son fonctionnement, c'est-à-dire sa capacité à distinguer des cellules vivantes de cellules mortes est un pré-requis inévitable.

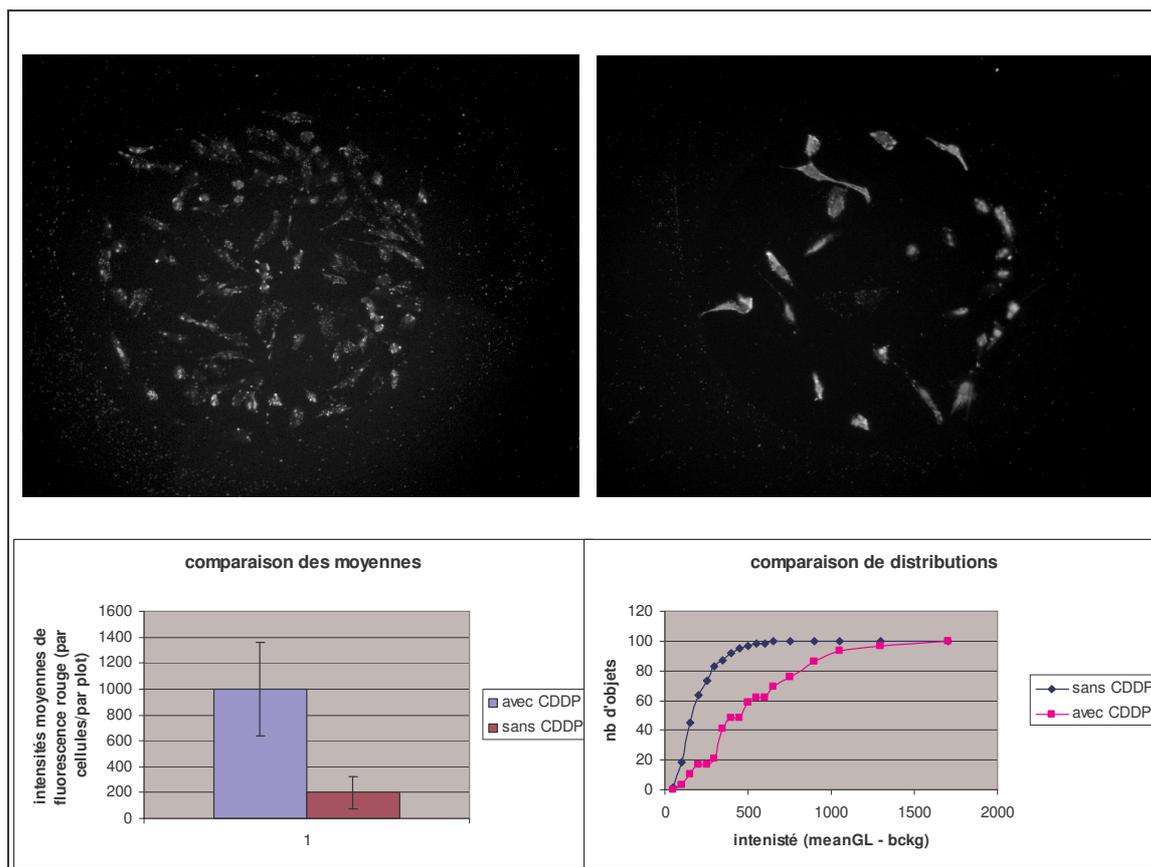


Figure 71 : Validité du fonctionnement du marqueur éthidium homodimer-2 (kit Live/Dead, Molecular Probes) sur les cellules U373. En haut sont présentées deux images en fluorescence Rhodamine de 2 plots de cellules U373 marquées au kit Live/Dead après 4 jours de culture en nanogouttes. Les cellules du plot de gauche n'ont pas été traitées, alors que les cellules du plot de droite ont reçu 5µM final de CDDP (concentration pour la diminution de 50% du nombre de cellules en moyenne). Les cellules traitées montrent une intensité de fluorescence plus élevée que les cellules non traitées. En bas, après analyse d'image et détection des objets cellulaires, l'intensité moyenne de fluorescence est quantifiée dans chaque cellule. Le graphique de droite présente l'augmentation de la moyenne par plot de l'intensité moyenne de fluorescence rouge par cellule, après traitement au CDDP attestant d'une cytotoxicité plus élevée. Les barres d'erreur sont les écarts types. Le graphique de droite représente les distributions des intensités de fluorescence moyennes par objet dans les deux plots. Il montre un chevauchement attestant de la présence de cellules mortes dans le plot n'ayant pas reçu de CDDP et de cellules vivantes dans le plot traité.

Cette étape s'est révélée délicate et n'a pas été abordée suffisamment tôt dans le processus de criblage. Une trop grande confiance a été placée dans les performances annoncées par le revendeur et les analyses visuelles non quantitatives effectuées rapidement. Il s'est avéré par la suite que la variabilité de ce marquage était trop grande pour pouvoir quantitativement différencier des cellules traitées au CDDP de cellules non traitées sans le recours à un grand nombre d'exemplaires de la même condition (« réplicats ») par exemple. Ces considérations seront explicitées dans le paragraphe 4.5. Nous pouvons rapidement mentionner que cette variabilité est directement liée à la technologie de culture en gouttes et au choix du phénotype étudié. Plus particulièrement, le milieu de culture qui constitue les gouttes est rincé pendant l'étape de marquage. Cela entraîne par exemple le décollement de certaines des cellules mortes qui sont généralement moins bien accrochées. Le nombre de cellules mortes n'est donc pas accessible directement. De plus le nombre de cellules est un paramètre très variable dans des échantillons miniaturisés. Le marqueur rouge seul perd alors de son intérêt.

Chapitre 4 : Application

Pour chaque marqueur lié à la détection des cellules, les concentrations, les temps d'incubation et les méthodologies de rinçage ont été optimisés pour obtenir les marquages les plus homogènes possibles. Nous avons par ailleurs mis en évidence une durée de vie du marquage : au-delà de 6h le marqueur rouge pénètre dans toutes les cellules et le marqueur vert se localise plus intensément dans le noyau.

Dispense de cellules

La dispense de cellules n'est pas un processus aisé. La distribution des tailles des cellules est spécifique du type cellulaire et influe sur les paramètres des piézo-électriques. Cependant ce sont surtout leurs propriétés d'adhésion entre elles et sur des substrats qui représentent le critère le plus limitant puisqu'elles influent sur le comportement fluide de la solution dispensée. Pour une dispense optimale, les cellules doivent être individualisées, des amas cellulaires ou des cellules accrochées aux parois de la pipette entraînant irrémédiablement un bouchage de celle-ci.

Bien que relativement « collantes », les cellules U373 n'ont pas posé de problème particulier pour la dispense. Les paramètres piézo-électriques utilisés sont identiques à ceux du milieu de culture (avec sérum) seul. A l'inverse, nous n'avons pas réussi à dispenser les cellules GHD de manière suffisamment reproductible pour un criblage, même en utilisant de faibles concentrations dans les plaques de prélèvement (1.10^5 cellules/ml par exemple). L'explication la plus plausible proviendrait de leur tendance à former très rapidement des amas en solution. Ce type cellulaire a été abandonné dans ce projet pour l'instant. Cela confirme que cette technologie ne s'adapte pas à tous les types cellulaires.

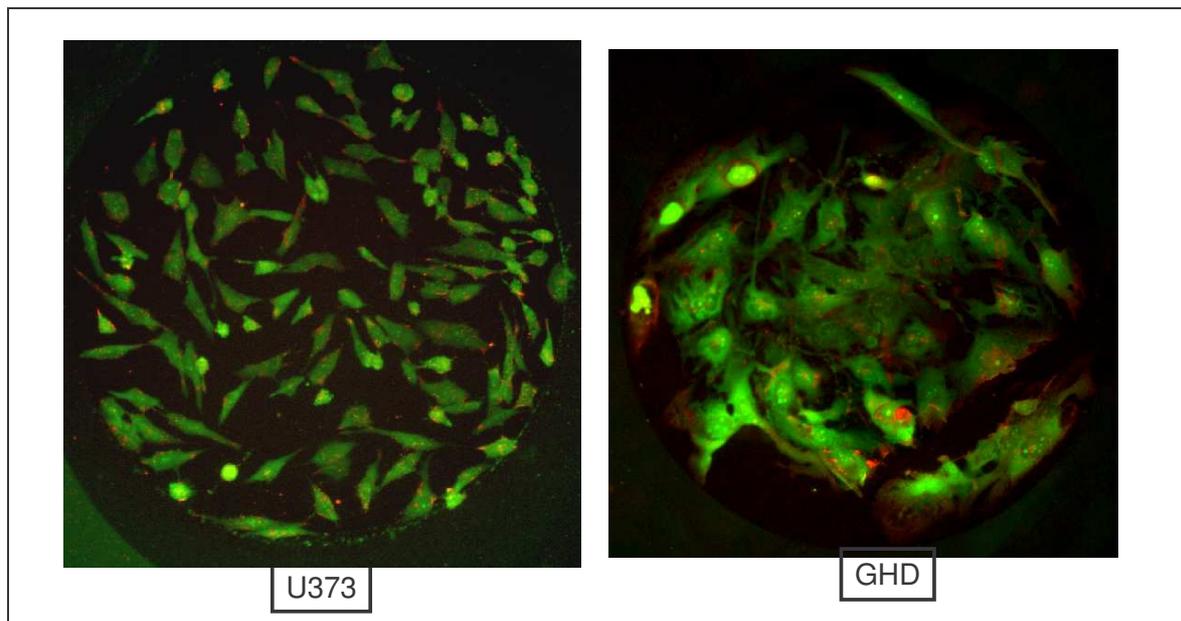


Figure 72 : Différences de formes entre les U373 et les GHD cultivées en nanogouttes pendant 4 jours sur des plots de 500 μ m. Les cellules sont marquées au Live/Dead. Les GHD (à droite) sont bien plus grosses que les U373 (à gauche).

Chapitre 4 : Application

Concentration de dépôt :

La concentration dans les microplaques de prélèvement lors de la dispense influe sur la qualité de celle-ci. Si la concentration est trop élevée, la pipette se bouche. La limite est souvent située autour de 1.10^6 cellules/ml, bien qu'aucune étude spécifique n'ait été menée pour vérifier la validité de cette hypothèse. Par ailleurs cette concentration influence la dynamique de prolifération des cellules. De la même manière que pour les cellules MCF10A (résultats présentés au chapitre 3.1), elle a été optimisée à environ $4,5.10^5$ cellules/ml.

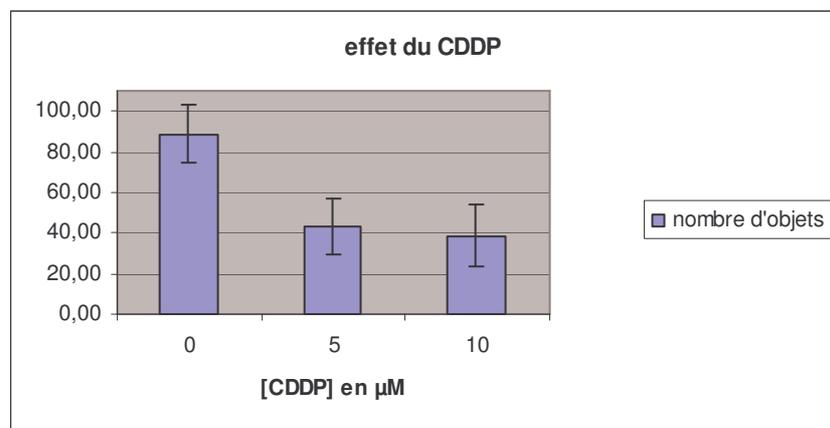
Qualité de la culture cellulaire.

Les méthodes de comptage de cellules classiquement utilisées en biologie pour déterminer les concentrations de dépôt s'appuient sur une numération visuelle dans un petit volume, le résultat étant extrapolé à l'ensemble de la solution. Leur précision a été évaluée entre 10 et 20% selon les opérateurs. Les variations de prolifération observées sont très sensibles à la concentration de départ. Une évaluation plus précise est nécessaire. Le « EasyCyte System » de « Guava technologies » (site web <http://www.guavatechnologies.com/>) est un cytomètre (ou FACS pour « Fluorescent-Activated Cell Sorter » en anglais, « trieur de cellules utilisant la fluorescence » en français) qui permet de vérifier la concentration cellulaire avec un CV inférieur à 5%.

Pour l'étude d'un phénotype tel que la mortalité, aussi sensible aux biais technologiques, la qualité des cellules est cruciale. Par exemple, le pourcentage de mortalité intrinsèque de la culture (avant la dispense) se répercute sur les résultats terminaux et doit être connu précisément. Par ailleurs il permet de vérifier la santé de la culture ; nous avons décidé de ne pas accepter de culture ayant un taux de mortalité de plus de 10%. La présence de mycoplasme ou bien la sénescence de la culture doivent aussi être évaluées. Le « EasyCyte » permet de quantifier ces paramètres en ligne directement avant l'expérience.

Réponse au CDDP

La comparaison avec les expériences conduites en microplaques par les partenaires est nécessaire pour valider l'intérêt de la technologie. Les expériences dans ce format s'appuient sur la dose 50 (IC50) qui correspond à la quantité de drogue nécessaire pour tuer 50% de la culture. Plus précisément, un siRNA est considéré comme efficace lorsque le nombre de cellules traitées avec la concentration IC50 en CDDP est inférieur à 50% du nombre de cellules dans un plot n'ayant reçu ni le siRNA ni le CDDP. Cela signifie que l'IC50 du CDDP avec le siRNA est plus faible que la IC50 du CDDP seul. Nous avons redémontré que cette dose était de $5\mu\text{M}$, identique à celle utilisée dans les puits.



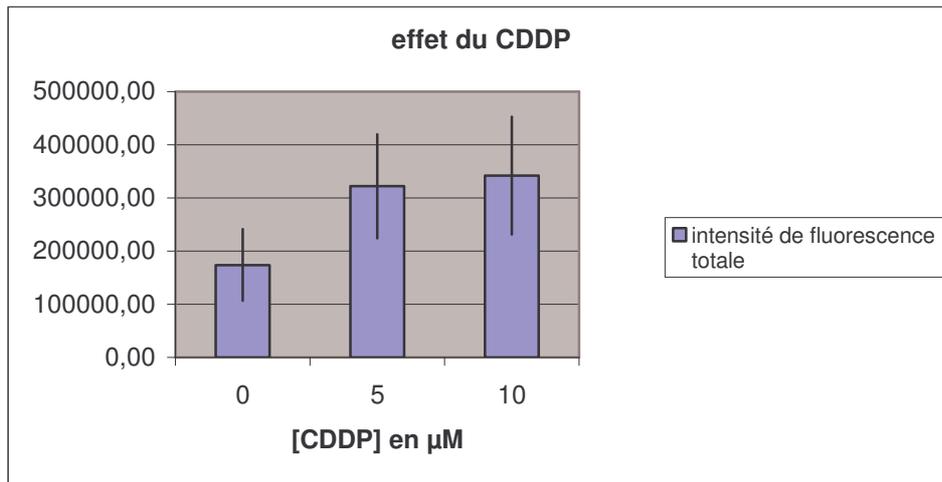


Figure 73: Effet du CDDP sur les cultures de cellules U373. Les cellules sont cultivées en nanogouttes sur les substrats Memscap pendant 4 jours. Le CDDP est ajouté 1 jour après la dispense. Les concentrations correspondent à la quantité de CDDP finale dans la goutte. En haut, le nombre de cellules est divisé par deux à la dose 5 μM , conformément au modèle employé dans les microplaques. En bas, l'intensité totale de marqueur rouge dans les cellules est multipliée par 2 environ, ce qui signifie que le marqueur rouge est un bon marqueur du phénotype. Les valeurs représentées sont les moyennes par plot et par condition. Les barres d'erreur sont les écarts types. La variabilité des signaux est grande, ce qui atteste de la présence de cellules répondant différemment à la drogue dans la culture.

4.4 Considérations technologiques

La capacité de la technologie à fonctionner dans un environnement applicatif a pu être évaluée durant les tests préliminaires et les criblages. Quelques caractéristiques qui semblent dignes d'intérêt pour valider son adéquation avec le traitement haut-débit et pour donner un cadre interprétatif à l'analyse de résultats ont été mises en évidence.

4.4.1 Limitations

Dispense et volume mort

Nous avons déjà discuté l'importance des volumes morts dans une technologie piézo-électrique (chapitre 2.2). Ceux-ci proviennent de quatre sources. Tout d'abord la fragilité des pipettes ne permet pas de descendre tout au fond des puits des microplaques de prélèvement. Ensuite, il est nécessaire de remplir la chambre de dispense avec le liquide pour obtenir un fonctionnement robuste du piézo-électrique. De plus, la solution à dispenser est en contact avec l'eau qui remplit le système fluide lié à la pompe. Malgré les forces de capillarité, une diffusion conséquente a été observée. Le volume prélevé doit en tenir compte. Enfin, les pompes péristaltiques ont un régime de fonctionnement qui devient chaotique pour des petits volumes (autour de 2-3 μl). Pour être sûr que le prélèvement a été effectif, il convient de se situer dans un régime normal.

Dans ce projet comme dans de nombreuses applications, les cultures cellulaires sont disponibles en quantité suffisante pour tolérer ces volumes morts, qui peuvent monter jusqu'à 5-10 μl pour une dispense d'un bloc de 100 plots de 150nl chacun environ si seules les limitations liées à l'aspiration sont considérées. En réalité, étant donnée l'abondance de ce réactif, nous utilisons 200 μl par puits de prélèvement pour une dispense de seulement 15 μl . Par contre les molécules actives que sont les siRNA sont très chères et constituent un facteur limitant. Cette contrainte est liée à la technologie de dispense considérée qui devrait être très vite dépassée au vu de la rapidité des progrès dans ce domaine.

Débit des expériences

La vocation de développement de cette phase de validation de la technologie ne permettait pas d'utiliser une infrastructure directement haut-débit avec des robots de transferts d'échantillon par exemple. L'intégration de la technologie dans de telles dimensions ne semble d'ailleurs pas insurmontable, même si des développements supplémentaires liés au contrôle de l'évaporation et au format lame de verre seraient à envisager.

Cependant certains aspects concernant le débit de traitement et liés au concept de la culture de cellules en goutte peuvent tout de même être considérés. La principale limitation au niveau de la dispense provient des lavages nécessaires entre chaque échantillon pour éviter les contaminations croisées et le souillage des pipettes. On peut noter qu'une dispense d'une plaque de 96 puits de siRNA prend aujourd'hui environ 40 min (20 min pour une plaque 384 avec la dernière génération des microscopes intégrés, ArrayScan de Cellomics par exemple).

En ce qui concerne le phénotypage, les limitations biologiques liées aux temps d'incubation pendant les marquages sont relativement incompressibles et dépendent du modèle considéré. L'acquisition des images dépend quant à elle de la vitesse de déplacement des platines du microscope et des filtres des sources lumineuses, ainsi que des temps d'intégration de la caméra pour obtenir des images exploitables par la suite. Il faut environ 40 min pour imager une lame de 400 plots en 3 couleurs. La durée des traitements des images lors de l'étape de détection et de quantification est assujettie à la rapidité d'exécution des algorithmes, et donc à leur complexité (dépendant du modèle cellulaire) et aux performances de la machine utilisée. Cette étape dure généralement de plusieurs heures, mais peut être réalisée automatiquement et n'importe quand une fois que les images sont disponibles. Enfin les analyses de données peuvent être relativement longues dans les phases de mise au point. Nous n'avons pas pu quantifier de durée reproductible pour l'instant, les recherches mathématiques sur les traitements des données n'étant pas achevées.

Transferts d'échantillons et stérilité.

Les puces et les réactifs (cellules, siRNA, marqueurs) sont préparés sous hotte (stérile pour les cas où cela est nécessaire). Les transports des échantillons jusqu'au robot de dispense et la plateforme d'imagerie sont manuels.

Les puces sont transportées dans leur dispositif de vapeur saturante. Elles ne sont exposées à un environnement favorable à l'évaporation que pendant leur positionnement sous le robot de dispense, entre 5 et 15 secondes selon les opérateurs (l'évaporation totale des gouttes a lieu au bout de quelques minutes dans des conditions similaires – voir chapitre 2.2.3).

Faute d'une infrastructure appropriée, le robot n'est pas placé dans un environnement stérile. De nombreuses précautions sont prises pour réduire les risques de contaminations (utilisation d'antibiotiques dans les cultures, stérilisation des systèmes fluidiques, gestion des déchets, propreté des surfaces et des échantillons par exemple). Aucune contamination n'a été déplorée durant l'ensemble de l'utilisation de la technologie.

4.4.2 Conséquences sur le modèle cellulaire et l'interprétation

Les conditions de culture des cellules au cours de ces expériences diffèrent beaucoup des conditions normales en boîte de Pétri ou en microplaques. Nous avons déjà discuté l'influence de certains aspects sur le modèle cellulaire comme la géométrie de la goutte et la technologie de dispense. Nous pouvons rajouter le fait que les longs temps de dispense des réactifs évoqués ci-dessus pervertissent davantage les conditions de culture des cellules. Cela a deux conséquences.

Premièrement, comme le modèle cellulaire ne peut pas être considéré comme « normal », toutes les présomptions sur le comportement standard des cellules doivent être redémontrées et validées pour vérifier que le modèle obtenu ne s'en éloigne pas « trop ». Cette limite supérieure est difficile à qualifier, elle dépend de l'expérience considérée. Dans notre cas, on peut toutefois considérer que la prolifération est un pré requis indispensable à toute analyse. Son étude a permis de contraindre la cinétique de l'expérience à une plage acceptable. Cela étant confirmé, la fonctionnalité plus précise du modèle doit être démontré. Nous avons ainsi retrouvé la DL50 liée à l'action du CDDP.

De plus, l'analyse haut-contenu agit comme un contrôle qualité supplémentaire par rapport à la validité du modèle. Là où, dans un test classique, seul le nombre de cellules est évalué, le haut-contenu permet de définir un ensemble de paramètres dont la modification est corrélée à l'action du CDDP uniquement. Cela permet d'écarter toute action d'un autre mécanisme. Par exemple, une cellule « tuée » par le CDDP pourrait être ronde, petite et rouge, alors qu'une cellule ronde, grande et rouge peut être sénescence ou apoptotique. L'action de la drogue est caractérisée plus finement. Cela permet de contrôler le modèle et d'écarter une variabilité qui serait liée à des biais technologiques par exemple.

Deuxièmement, les contraintes appliquées au modèle cellulaire remettent en cause sa capacité prédictive vis-à-vis des comportements *in vivo* (effet de compensation par exemple), qui est le but ultime de ces expériences. Sur ce point, nous ne disposons pas du recul suffisant pour pouvoir apporter une réponse nette. Cette limite peut par ailleurs être étendue à la plupart des modèles cellulaires utilisés aujourd'hui. Nous pouvons toutefois mentionner que l'analyse haut-contenu, dans le même ordre d'idées que celui développé ci-dessus, permet de contrôler la variabilité et donc d'évaluer plus précisément le fonctionnement d'un mécanisme.

L'approche employée pour vérifier la validité des modèles consiste à comparer les tendances observées sur les puces avec celles obtenues dans des technologies plus éprouvées comme les microplaques. L'utilisation de cellules plus « fragiles », plus proches des modèles *in vivo* représente une évaluation complémentaire, en cours au laboratoire Biopuces.

4.5 Tendances et résultats

4.5.1 Analyse globale

Dans le cas des cellules U373, les algorithmes de traitement d'images demandent des compétences pointues pour obtenir une bonne détection. La forme filaire des cellules et leur tendance à se chevaucher ont posé des problèmes aux premiers protocoles obtenus. Pendant les développements de ces algorithmes, les analyses ont porté sur des variables « moyen contenu ». Les protocoles étaient capables de détecter les noyaux de manière satisfaisante. Le nombre de cellules par puits était donc accessible, tout comme l'intensité de fluorescence totale dans le plot. Cependant aucun paramètre satisfaisant par cellule n'était disponible.

Le modèle utilisé par les biologistes partenaires consiste à mesurer la moyenne du nombre de cellules par condition sur les différents exemplaires disposés dans les microplaques (en général 3). Nous avons pu reproduire la mesure de l'action du CDDP à l'aide de ce paramètre (Figure 73 et Figure 74). Cependant aucune mesure significative ne se détachait des autres conditions. Les barres d'erreur (représentées par les écarts types ici) se chevauchent toujours. Le nombre de cellules par plot est un paramètre qui peut être considéré comme suivant une loi normale (chapitre 2.2.4.1) L'utilisation d'intervalles de confiance n'a pas conduit à de meilleurs résultats.

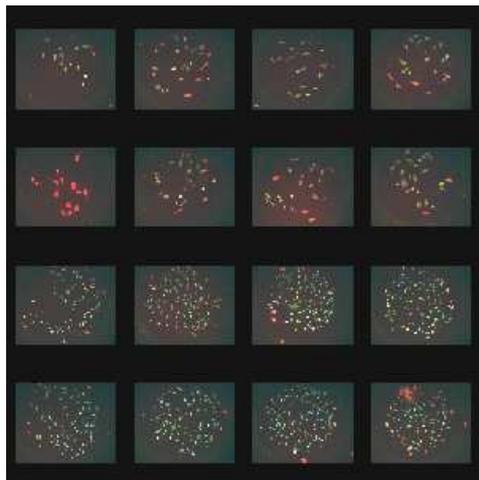


Figure 74 : Visualisation de l'effet du CDDP (5 μ M) sur les cellules U373, après 4 jours de cultures. La mosaïque d'image représente 2 lignes de 4 plots ayant reçu 5 μ M de CDDP après un jour de culture (en haut) et 2 lignes n'ayant pas reçu de drogue. La différence en nombre de cellules est flagrante et valide les résultats obtenus en puits (et plus haut - Figure 73)

Si aucun résultat positif n'apparaît dans les études, cela peut être dû au fait qu'aucun siRNA ou gène parmi ceux testés dans ces premières expériences n'a d'effet. Parallèlement à nos analyses, des expériences en microplaques étaient conduites par les équipes partenaires. Elles ont confirmé le fait que peu d'éléments avaient réellement un effet sur le phénotype.

Cependant certains siRNA ont montré une augmentation de la mortalité par rapport au CDDP utilisé seul. Les variations en question tournaient toutes autour de 5-15%. Or nous avons montré que la dispense des cellules induisait une variation du nombre de cellules par plot (un CV) d'environ 20%. Les effets des molécules positives sont masqués par cette variabilité. Comme toutes les analyses « moyen contenu » reposent sur cette mesure (division d'une intensité totale dans le plot par le nombre de noyaux dans le même plot), elles subissent la même variabilité.

Chapitre 4 : Application

Une quantification de cet effet statistique peut se représenter avec la valeur :

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

où σ représente l'écart type et μ la moyenne des contrôles positifs (p) et négatifs (n). Cette valeur traduit la séparation entre les témoins positifs et négatifs. Plus elle est proche de 1, meilleur est le test. Cette valeur est beaucoup utilisée pour qualifier les tests haut-débit dans l'industrie [196- Zhang]. Dans les tests bas contenu elle est toujours négative. Cela signifie que le test n'est pas efficace puisque les témoins positifs et négatifs ne sont pas séparés pour que des siRNA dont l'influence se situera entre les deux distributions puissent être évalués.

L'analyse haut contenu met en jeu chaque cellule. Mécaniquement le nombre d'individus que contient l'échantillon statistique pour une condition est drastiquement augmenté. Les expériences étant faites en quatre exemplaires, le nombre d'objets passe de 4 à 400 environ (ou 200, moitié moins pour les plots ayant reçu du CDDP). La variabilité statistique est affinée. Ces analyses ont dû attendre le développement d'algorithmes de traitement d'images satisfaisants.

4.5.2 Analyse haut contenu

L'implémentation d'une analyse haut contenu implique des compétences en statistiques et en gestion de données informatiques dont nous ne disposons pas d'emblée au laboratoire. Deux stages (DUT et DEA-ingénieur) ont permis de faire le lien entre les compétences technologiques de l'équipe et les desiderata biologiques des partenaires, avant le recours à des partenariats plus poussés avec des équipes ayant une expertise statistique. Dans ce paragraphe nous présentons la démarche employée et quelques résultats issus de ces travaux. Leur intégralité peut être consultée dans les différents rapports terminant les stages. Les études statistiques plus approfondies sont encore en cours.

4.5.2.1 Construction du modèle

Le haut contenu permet deux améliorations par rapport à des analyses classiques. La première consiste en l'obtention des mesures individuelles pour chaque paramètre. L'analyse de résultats ne compare plus des moyennes et des écarts types entre deux conditions, mais les distributions dans leur ensemble. Cet intérêt s'est vu renforcé par le fait qu'aucun paramètre (hormis le nombre de cellules) n'a pu être démontré comme suivant une loi statistique connue (normale ou log-normale par exemple). Les mesures paramétriques (moyennes, moments de différents ordres) sont donc impossibles.

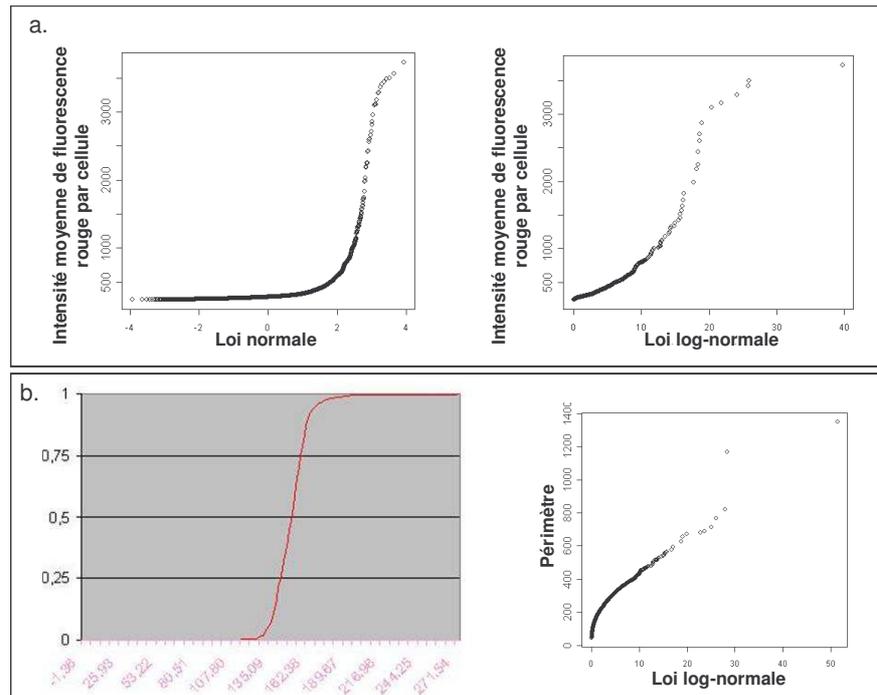


Figure 75 : Etude des distributions de paramètres cellule par cellule. (a) La distribution du paramètre « intensité moyenne de fluorescence rouge » (éthidium homodimer 2, mortalité) pour des cellules non traitées est comparé à des lois tabulées. Les résultats sont présentés ici sous forme de graphique. Les quantiles de la distribution expérimentale sont comparés aux quantiles d’une distribution normale (à gauche) et log-normale (à droite). Dans l’éventualité d’une correspondance, les courbes obtenues devraient être des droites, ce qui n’est pas le cas ici. (b) exemple de la distribution du périmètre des cellules. A droite la distribution des fréquences cumulées. A gauche, le graphique quantile à quantile pour la loi log-normale. A part les valeurs extrêmes, cette distribution se rapproche de la loi théorique.

En utilisant le seul paramètre de l’intensité moyenne de fluorescence rouge associée à la présence d’éthidium dans les cellules, nous avons pu mettre en évidence l’effet d’un siRNA dirigé contre le gène ERCC1 sur l’action du CDDP. Ce résultat est présenté dans la publication [87-Schaack]. Pour des raisons de clarté nous les reprenons dans la figure ci-dessous.

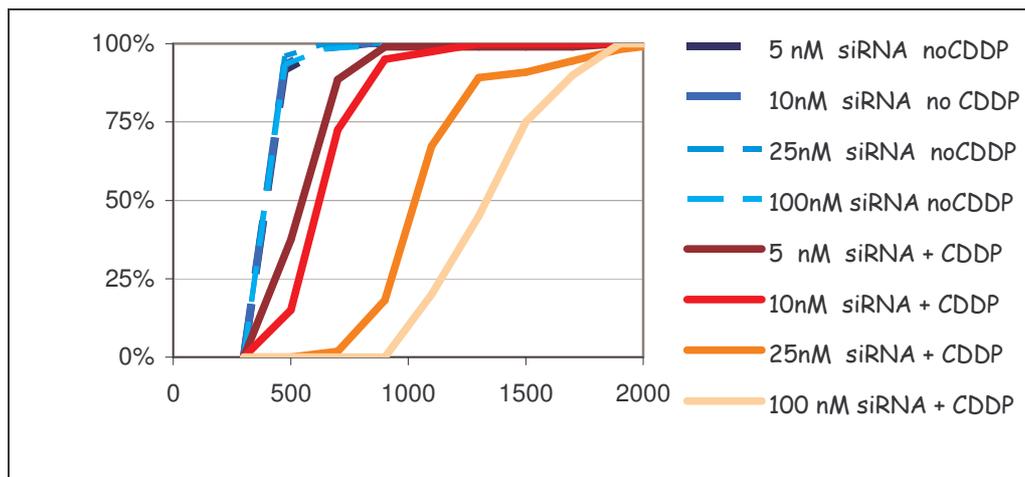


Figure 76 : Effet d'un siRNA dirigé contre le gène ERCC1 sur l'action du CDDP (issus de [87-Schaack]). Le graphique représente la distribution cumulée des intensités moyennes de fluorescence rouge (éthidium homodimer-2) par cellules par condition (3 exemplaires de chaque conditions sont agrégés). Les distributions des plots contenant des cellules n'ayant pas reçu de CDDP sont identiques quelque soit la concentration de siRNA utilisée. Les distributions des plots contenant les cellules ayant reçu du CDDP montrent un décalage vers le rouge en fonction de la concentration en siRNA, révélant la mortalité cellulaire.

Ces résultats ont été plusieurs fois reproduits en micropuits où la diminution du nombre de cellules par rapport à l'effet du CDDP seul peut aller jusqu'à 40%. Cependant les autres siRNA identifiés en microplaques et ayant des effets plus faibles n'ont pas pu être retrouvés par cette méthode.

La deuxième amélioration apportée par le haut contenu concerne l'utilisation de mesures multiparamétriques. Si les paramètres pris un à un n'ont pas montré une significativité suffisante, des combinaisons pourraient fonctionner. Dans une première étape, un modèle linéaire a été considéré. De nombreux paramètres accessibles grâce au logiciel de traitement d'images étant difficilement interprétables biologiquement, nous nous sommes intéressés aux paramètres dont la signification pouvait être expliquée.

Cette approche nécessite de redéfinir le phénotype des cellules. Nous cherchons à étudier comment les siRNA modifient l'action du CDDP. Cette action doit donc être modélisée. Pour cette étape, il est nécessaire de se fonder sur des tests préliminaires, et plus particulièrement des études de dose-réponse du CDDP. Une combinaison de paramètres efficace doit pouvoir séparer les cellules traitées avec le CDDP des cellules non traitées, tout en diminuant la variabilité de la mesure. Cette gageure peut être réalisée avec une analyse discriminante linéaire. Les algorithmes employés recherchent la combinaison linéaire des paramètres qui classent les cellules suivant leur traitement au CDDP ou non. Un classificateur a été obtenu pour les expériences de test avec une bonne performance (Figure 77).

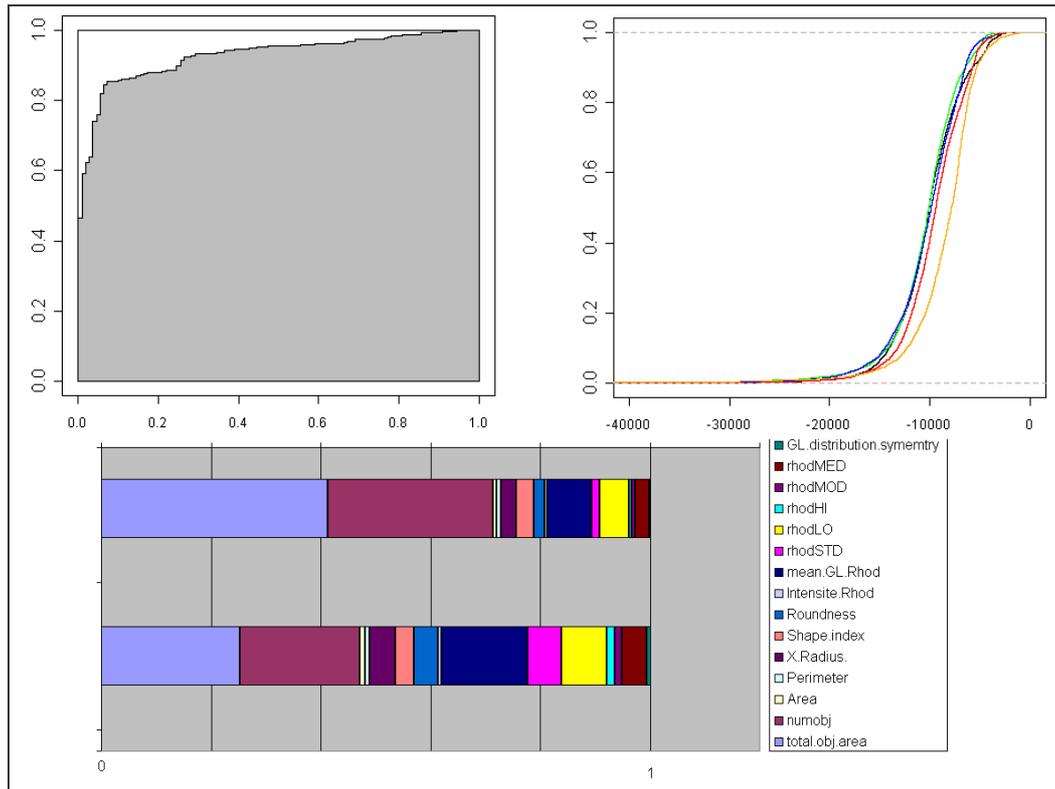


Figure 77 : Analyse multiparamétrique des résultats d'un criblage. Les paramètres sont rassemblés dans une optimisation linéaire pour séparer les cellules traitées avec 5 μ M de CDDP des cellules non traitées. (a) le graphique ROC (pour « Receiver Operating Characteristics » en anglais) représente la valeur « 1-spécificité » en abscisse en fonction de la sensibilité en ordonnée. Un bon classificateur a une spécificité et une sensibilité proche de 1, il se rapproche donc du coin en haut à droite. (b) Graphique représentant la distribution des scores issus de la mesure de la combinaison de paramètres trouvée (un score par cellule) en fonction de la concentration en CDDP. Le score augmente pour des concentrations croissantes de CDDP (0 μ M en noir, 5 μ M en rouge et 10 μ M en orange). Cela montre que le score caractérise bien l'action du CDDP. (c) interprétation des paramètres de la combinaison. La valeur représentée est la contribution (en pourcentage) de chaque paramètre au calcul du score de l'élément moyen de chaque population : traitée au CDDP (5 μ M) en haut et non traitée. On mesure l'importance d'un paramètre dans la discrimination par la variation de sa contribution entre les deux populations et par son importance dans chaque score. Par exemple le « meanGL rhod » (en bleu foncé sur la figure, représentant l'intensité moyenne de fluorescence rouge – mortalité – par cellule) varie beaucoup en proportion et contribue de manière importante au score.

Une même combinaison linéaire permet de séparer les cellules traitées avec 5 μ M de CDDP (IC50) des cellules non traitées, mais aussi des cellules traitées avec 10 μ M. Par la suite, sur les conseils de nos collaborateurs biologistes, nous avons considéré qu'un siRNA d'intérêt était un siRNA dont l'action renforçait celle du CDDP, dans la même direction. Cela se traduit par l'utilisation de la combinaison des paramètres identifiée comme mesure de l'action des siRNA. Chaque cellule peut être mesurée selon cette combinaison. On obtient alors une distribution de scores qui caractérise la population d'un plot ou d'une condition. Les mêmes outils utilisés plus haut (ERCC1) pour les comparaisons de distributions peuvent s'appliquer.

4.5.2.2 Applications au criblage

Pour des raisons technologiques, les puces ne peuvent pas être comparées entre elles (chap. 3). Un classificateur (une combinaison de paramètres discriminant les cellules traitées au CDDP des contrôles) spécifique doit être construit pour chaque puce.

A l'aide de cette méthodologie, aucun résultat positif n'a pu être identifié. La raison principale est encore une fois la variabilité des témoins. Ils sont caractérisés par une distribution de mesures multiparamétriques. L'analyse revient à une comparaison de distributions. Pour évaluer la significativité des différences observées, nous avons utilisé la distance de Kolmogorov-Smirnov en nous inspirant d'études publiées précédemment [195-Zachary E. Perlman]. Cette mesure montre que les différences entre les distributions de scores des témoins et celles des cellules avec siRNA ne sont pas significatives : les cellules ayant reçu des siRNA ne se comportent pas différemment des témoins.

Cette variabilité peut s'expliquer de trois manières différentes. Tout d'abord, elle peut signifier que la méthode de mesure employée a mis en lumière des biais technologiques que nous n'avons pas identifiés par d'autres voies. Cette interprétation est renforcée par les premiers résultats des études statistiques plus complexes menées par d'autres équipes expertes qui font ressortir des effets spatiaux ; plus particulièrement, elles signalent que chaque bloc de 100 plots se comporte différemment de ses voisins. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les cellules de chaque bloc proviennent de puits différents de la microplaque de prélèvement lors de la dispense de cellules.

Ensuite, nous pouvons aussi remettre en cause la transfection des siRNA, puisque nous nous sommes contentés des résultats positifs des expériences préliminaires pour affirmer son efficacité. Des témoins de transfection devraient sans doute être placés sur chaque puce. La qualité de la détection des cellules lors des traitements d'images est peut-être aussi à améliorer ou alors à évaluer plus finement. Finalement il se peut que le nombre de cellules par plot soit trop faible pour pouvoir faire ressortir une significativité par cette méthode. Cette dernière justification serait une remise en cause de la miniaturisation des échantillons cellulaires.

Ensuite la deuxième manière d'expliquer cet échec peut être le fait qu'aucun siRNA ayant un effet n'ait été présent sur les puces analysées. Nous pouvons en effet remarquer que les siRNA positifs connus (notamment ERCC1) ont été criblés sur des puces au début de la campagne de criblage. Ces expériences ont été menées dans des conditions d'immaturation de la technologie. Le nombre de plots de témoins satisfaisants était trop faible pour construire un classificateur multiparamétrique. De nouveaux essais incluant ces témoins positifs devraient permettre de dissiper ce doute. L'utilisation intensive des outils de la plateforme par d'autres projets, a empêché de mener ces expériences à ce jour.

Enfin l'absence de résultats positifs pourrait aussi s'expliquer par l'inadéquation de la méthodologie d'analyse. On peut par exemple envisager qu'elle soit trop fine : elle ne permet de différencier que des cellules ayant reçues du CDDP de celles sans CDDP, l'action des siRNA influençant des paramètres différents. Cela remettrait en cause l'interprétation du classificateur (Figure 77) et l'hypothèse biologique selon laquelle les siRNA agissent dans la même direction que le CDDP. Les études plus complexes des autres équipes statisticiennes pourront sans doute trancher sur le sujet.

4.6 Conclusions technologiques – Perspectives biologiques

La participation à ce projet de criblage de 250 siRNA a confronté la technologie de puces à cellules en gouttes à la réalité d'une application biologique d'intérêt. La technologie a permis l'utilisation de très peu d'échantillons (autour de la femtomole de siRNA dans chaque réacteur) dans un système multiplexé testant l'action de gènes sur la capacité de cellules de glioblastomes à résister à une drogue chimiothérapique. Au-delà de la validation de la miniaturisation, cette application « moyen débit » a conduit à la prise de conscience que des mises au point spécifiques étaient nécessaires. En termes techniques, les conditions de culture dans les nanogouttes diffèrent des supports traditionnels (boîtes de Pétri ou microplaques par exemple). Celles-ci doivent être calibrées pour obtenir un modèle qui donnera des résultats interprétables en termes biologiques (concentrations cellulaires, proliférations, marquages par exemple).

Par ailleurs, nous avons montré que l'analyse haut contenu donnait la possibilité d'affiner un phénotype en utilisant des combinaisons linéaires de paramètres indépendants. Cela conduit à une description affinée des cellules et de leur état qui réduit la variabilité des mesures effectuées et permet de différencier deux conditions de cultures à l'aide d'un nombre relativement restreint de données (sur l'effet de la drogue CDDP par exemple). Cependant l'absence de témoins positifs dans des expériences analysables ne nous autorise pas à valider cette méthodologie d'analyse.

Par la suite, pour valider les développements effectués sur ce projet de criblage de génomique fonctionnelle sur le cancer, un autre volet du projet sera consacré à des phénotypes différents. L'étude de la polarité par exemple devrait pousser à une utilisation encore plus fine de l'analyse haut-contenu puisqu'elle implique de distinguer plusieurs localisations de la fluorescence à l'intérieur des cellules. La mise au point d'un marqueur (paramètre ou combinaison de paramètres) de ce phénotype est un défi pour l'étape de traitement d'image.

Les molécules siRNA identifiées comme efficaces par ces analyses devront être validées dans des formats classiques. Pour cette première application, la technologie ne peut servir que de premier crible, dont les résultats doivent être retestés. Notamment, la vérification du mécanisme d'action par RT-PCR est indispensable et n'est pas réalisable sur la puce. Dans une perspective thérapeutique, les molécules identifiées entreront alors dans les phases standard des développements de médicaments (tests *in vivo* par exemple).

Enfin, la génomique fonctionnelle représentant des mécanismes dynamiques, de nombreuses régulations entre gènes interviennent. Pour mieux comprendre comment les gènes proposés sont impliqués dans les phénomènes de résistance et plus généralement de cancer, une approche en réseaux pourra être mise au point. Dans ce premier test, les expériences modifiaient l'expression d'un seul gène à la fois ; des combinaisons pourraient être tentées afin de rechercher la meilleure combinaison thérapeutique d'une part et de vraiment comprendre comment les différents gènes interagissent d'autre part. Cela ouvrira sûrement de nouvelles voies de traitements pour ces maladies.

Conclusions

<u>Puces à cellules en nanogouttes : résumé de nos contributions</u>	150
<i>1 Résultats et Perspectives</i>	150
<i>2 Intérêt de la goutte</i>	152
<i>3 Pertinence des modèles cellulaires</i>	153
<u>Hétérogénéité des cultures cellulaires : intégration et étude</u>	154
<i>1 Le Haut Contenu : une nouvelle approche analytique</i>	154
<i>2 Contrôle Qualité : vers le « Laboratoire-sur-Puces »</i>	154
<i>3 La réponse d'une population n'est pas la moyenne des réponses</i>	157

Conclusion

Conclusions

Contrôler et étudier l'hétérogénéité cellulaire par l'intégration technologique.

Aujourd'hui, la recherche en biologie dispose d'une masse d'information génomique considérable, qu'il faut comprendre d'un point de vue fonctionnel pour en faire émerger de nouveaux concepts, qui formeront le berceau de nouvelles thérapies. Ces études impliquent l'utilisation de systèmes miniaturisés, elles mettent en jeu des mécanismes contrôlés à l'échelle moléculaire et nécessitent le traitement d'informations à haut-débit et de manière parallèle. Les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis de mettre au point une technologie miniaturisée de culture de cellules en goutte matricées sur des substrats solides pour tester l'action des gènes sur le comportement de populations cellulaires.

La première partie de notre conclusion revient sur les développements réalisés et les perspectives à court terme dans un domaine scientifique en pleine expansion. Les premières applications de la technologie à des études biologiques d'intérêt ont fait apparaître un défi en terme d'interprétation des résultats, issu de la stratégie de miniaturisation. Les cellules vivantes forment des populations hétérogènes dont les comportements ne sont pas entièrement prédictibles et contrôlables. Dans une deuxième partie, nous détaillerons le positionnement de la technologie face à ce nouveau champ d'étude qu'est l'hétérogénéité cellulaire.

Puces à cellules en nanogouttes : résumé de nos contributions

Les biopuces sont nées de la volonté de miniaturisation de l'industrie de la recherche en biologie (pharmaceutique ou académique). Les puces à ADN ont posé les bases d'une **miniaturisation technique** à travers un format dans lequel de nombreuses conditions peuvent être traitées en parallèle sur un dispositif de petite taille. La nécessité d'interprétation fonctionnelle des résultats obtenus a apporté des modèles de plus en plus complexes sur les puces. Les cultures cellulaires permettent de valider l'action de stimuli moléculaires sur un phénotype. Nous avons soumis à leur tour ces échantillons à une réduction de taille dans des gouttes de quelques centaines de nanolitres. Nous avons montré que la **miniaturisation biologique** permet d'enrichir la description du phénotype cellulaire.

1 Résultats et Perspectives

Les premières expériences, ayant démontré la faisabilité de cultures de cellules en microgouttes dans des systèmes macroscopiques et leur application dans des expériences de transfection [chapitre 1, 87-Schaack], ont permis d'analyser les concepts et les contraintes imposées par la miniaturisation. Ceux-ci ont été pris en compte dans les développements des éléments de base de la technologie, qui représentent la majeure partie de ce travail de thèse.

Les nanogouttes sont maintenues sur un substrat plan à l'aide des forces de tensions de surface créées par une interface hydrophile-hydrophobe (chapitre 2.1). L'utilisation de la chimie de molécules auto-assemblées (SAM) s'est révélée optimale en ce qui concerne la facilité de mise en œuvre, la biocompatibilité et les propriétés de mouillage. De plus ce protocole de fabrication est compatible avec l'intégration de capacités plus avancées comme la fonctionnalisation de la surface hydrophile sur laquelle repose la goutte et les cellules. Des molécules d'ADN couplées à des agents de transfection permettraient d'adapter la méthode de « transfection inverse », des protéines ou des polymères d'adhésion pourraient servir d'accroche à des cellules non adhérentes ou bien de guide géométrique à la morphologie

Conclusion

cellulaire, pour étudier l'effet de stimulus mécaniques ou pour construire des structures bidimensionnelles complexes et contrôlées (réseaux de neurones par exemple).

Un système automatisé de dispense piézo-électrique a été adapté pour déposer les gouttes de culture et les réactifs liés aux tests (stimulus) sur les substrats, (chapitre 2.2). Cette brique technologique est la plus fragile de l'édifice et impose des contraintes au déroulement des expériences et à l'analyse de résultats. La dispense induit vraisemblablement un stress des cellules éjectées, qui ont besoin d'une journée pour se remettre de leur passage dans les pipettes ou dans une enceinte où règne des conditions atmosphériques dangereuses. Le développement d'une solution technique spécifique qui permet de se rapprocher des conditions optimales de survie des cellules est aujourd'hui nécessaire pour que la technologie puisse réaliser toutes ces promesses. La dispense par onde acoustique [chap. 2.2.2.4] semble idéalement positionnée. Par ailleurs, la variabilité du nombre de cellules dispensées par goutte à l'aide d'une pipette piézo-électrique est un point limitant (sinon bloquant dans certains cas) pour l'obtention de résultats reproductibles. Les recherches dans d'autres domaines techniques pour la manipulation de cellules individualisées (pinces optiques et di-électrophorèse par exemple) permettent d'envisager le développement de solutions contrôlant précisément le nombre de cellules dans les gouttes au début de l'expérience (projet « JetCell » de développement d'un microdispenseur de cellules en cours au laboratoire).

L'évaluation de la façon de former et de maintenir physiquement des gouttes de cellules vivantes de 500 μm de diamètre sur un support plan a nécessité le recours à des techniques d'imagerie automatisées et haute-résolution (chapitre 3), ainsi qu'à des méthodes d'analyse d'images haut-contenu. Aux échelles de population de quelques dizaines de cellules, les mesures paramétriques (moyenne et écart-type par exemple) ne permettent pas de distinguer des comportements cellulaires distincts. La prise en compte de la distribution complète des individus de la population s'impose. Le haut contenu permet en outre des caractérisations plus fines de ces individus, pour une description plus précise de la population. Les implications de cette miniaturisation biologique et technique seront discutées plus loin (paragraphe 2).

La technologie issue de ces développements a été utilisée pour des expériences de transfection. Dans un premier temps, des protéines reportrices ont permis de valider l'adéquation de la culture de cellules en nanogouttes avec des expériences de sur-expression. Puis dans un deuxième temps, dans le cadre d'une collaboration avec plusieurs partenaires biologistes, nous avons montré son application à des expériences « moyen-débit » d'intérêt en cancérologie, combinant thérapie génétique et chimique pour augmenter la réponse à un anticancéreux par extinction sélective de gènes (chapitre 4). Cette utilisation a fait ressortir le besoin de contrôle de la technologie, dans des procédures de calibrage maintenant bien établies, pour pouvoir envisager leur utilisation dans d'autres applications tout aussi cruciales comme l'étude de la toxicité (projet européen Toxdrop en cours).

2 Intérêt de la goutte

Le besoin de miniaturisation de la recherche en biologie se traduit par de nombreux développements de différentes technologies au niveau mondial. Les premières utilisations de la culture de cellules en gouttes nous ont permis d'identifier clairement des cadres d'utilisation dans lesquels son application pourrait se révéler précieuse, voire indispensable. Au sein du Laboratoire Biopuces au CEA, la volonté de confronter les recherches technologiques menées avec la réalité industrielle est présente constamment : une technologie n'a d'intérêt que si elle est utilisée. Le processus de valorisation a été mené concomitamment aux développements techniques, chacun bénéficiant des résultats de l'autre.

La miniaturisation des échantillons cellulaires et des tests associés a conduit à la mise au point du format microplaque (chapitre 1.). Il a donc paru légitime de comparer les performances des puces à cellules en gouttes à ces dispositifs. Nous avons vu que les volumes utilisés dans les nanogouttes constituaient une limite pour le format puits qui ne pouvait pas supporter des volumes aussi faibles sans faire naître de réels problèmes d'évaporation et d'inefficacité des mélanges. Par rapport à une plaque 384 puits (ou 1536), les gouttes utilisent beaucoup moins de réactifs pour une densité bien plus élevée (on peut mettre au moins 4 puces de 1200 gouttes dans l'espace d'une plaque de 1536 puits). Ces caractéristiques en faisaient un candidat de choix pour les processus de criblage automatisé sur cellules de l'industrie pharmaceutique. Cette vision a convaincu le jury du Concours National d'Aide à la Création d'Entreprises de Technologies Innovantes du Ministère de la Recherche (volet émergence, prix Thésard 2004).

Une étude de marché a permis d'affiner cette stratégie. Les concepts de « ultra haut-débit » sous-tendant les efforts de miniaturisation des expériences de criblage ont conduit les acteurs de ce domaine à des investissements colossaux dans le format standardisé des microplaques. Cela a d'emblée fermé la porte à des nouvelles technologies qui ne pourraient pas s'intégrer directement dans ces plateformes, d'autant plus que les microplaques obtiennent maintenant des densités très élevées (on parle de 3456 ou 9600 puits) pour les applications de criblages moléculaires (primaires, sans cellules), et que les performances des formats existants pour les autres types de criblage (secondaires, avec cellules) semblent aujourd'hui suffire (notamment, les enjeux d'analyse de données à ce degré de débit ne sont pas complètement résolus). L'avantage de la miniaturisation prend en revanche toute son importance dans des expériences où la quantité de réactif disponible est limitée, notamment pour des cultures cellulaires précieuses (biopsies ou cellules souches par exemple). De ce point de vue, la technologie de culture en goutte pourrait être limitée par les contraintes et les stress qu'elle impose aux cellules. D'autres validations sont en cours (projet ToxDrop, <http://toxdrop.vitamib.com/>) avec des cellules plus « fragiles » que les modèles utilisés jusqu'à présent (cellules HepaRG, Christianne Guillouzo INSERM U512 [197-GRIPON]). Elles mettent en lumière l'adéquation de la technologie avec ce genre d'applications, pour peu que les calibrages nécessaires soient réalisés (voir paragraphe 3. suivant).

Conclusion

Nous avons passé en revue les différentes techniques de puces à cellules (chap 1). Celles-ci se divisent en deux catégories. La première a été initiée par D.M. Sabatini et utilise un tapis cellulaire continu stimulé localement. Les cellules d'un plot baignent dans le même milieu de culture que les cellules des plots adjacents. Cela ne permet pas d'étudier des effets combinés de plusieurs drogues de manière différenciée sur la même puce, limitant d'autant le multiplexage et donc le débit des expériences. De plus, il est difficile de rejeter l'éventualité de contaminations croisées a priori, même si plusieurs études commencent à démontrer leur absence [36]. La deuxième correspond à une matrice de plots de cellules créée par des différences de propriétés d'adhésion cellulaire à la surface du support, c'est la solution que nous avons choisie.

D'un point de vue physique, la technologie de culture de cellules en nanogouttes représente une technique d'intérêt pour des expériences relativement « moyen-débit » utilisant très peu de réactifs pour des tests multiplexées sur cellules vivantes.

3 Pertinence des modèles cellulaires

La vocation finale d'un test fonctionnel cellulaire est d'extrapoler les résultats obtenus vers des organismes plus complexes (animaux et humains). Plusieurs critères de satisfaction permettent de sélectionner les « bons » modèles cellulaires et leurs conditions de culture. Le premier concerne les aspects fonctionnels : le type cellulaire doit reproduire les mécanismes observés *in vivo*. Généralement, les cellules utilisées proviennent du tissu concerné par cette fonction. Dans notre projet, nous avons utilisé des cellules issues de tumeurs cérébrales (chapitre 4), l'équipe du CHU de Grenoble U318 a choisi d'utiliser des GHD (provenant de cultures primaires du cerveau) et des U373 (tumeurs cérébrales immortalisées) ; les GHD sont d'ailleurs dans cette optique un meilleur modèle que les U373.

Le deuxième critère s'appuie sur les conditions de cultures, qui doivent permettre de maintenir ces aspects fonctionnels dans des milieux non natifs. Ainsi les cellules doivent proliférer, garder leur forme native, et être capable de mobiliser des mécanismes d'intérêt (dans notre cas, la chimiorésistance). Nous avons montré que la technologie de culture de cellules en nanogouttes conservait la morphologie des cellules et leur capacité fonctionnelle, puisque la réponse à la drogue est identique à celle obtenue dans des microplaques qui représentent des conditions validées. La prolifération, quant à elle, pâtit des conditions de dispense et du format de la nanogoutte, qui ne permettent pas d'obtenir des conditions optimales. Nous avons montré que la prise en compte de ces contraintes dans les enchaînements temporels des expériences permettait d'obtenir des résultats fonctionnels.

La valeur prédictive des tests *in vitro* est aujourd'hui très discutée. D'aucuns mentionnent des résultats obtenus sur des cultures cellulaires qui ne sont pas reproduits sur des modèles plus complexes. La principale raison avancée est l'absence de certains phénomènes de régulation dans des modèles simples de culture cellulaire. Une solution pour commencer à prendre en compte la complexité des modèles *in vivo* pourrait être apportée par le format de puces à cellules. Celui-ci permet de cultiver plusieurs types cellulaires sur un même format, de manière indépendante ou en combinaison au sein d'un même plot. Les résultats obtenus dans chaque condition expérimentale représenteraient alors une facette d'un comportement dans un organisme animal par exemple. Les puces à cellules en nanogouttes peuvent intégrer cette fonctionnalité à très court terme.

Pour aller plus loin, les modèles cellulaires eux-mêmes peuvent évoluer. Comme les GHD qui sont de « meilleures » cultures que les U373, des cellules cultivées en forme de tissu (plusieurs lignées ensemble pour reconstituer des architectures et des interactions, ou bien des cellules cultivées en trois dimensions – 3D) permettraient sûrement d'obtenir des résultats plus pertinents. Cela entraîne des obstacles techniques (en imagerie notamment) et informatiques (analyse de données) qui restent à franchir.

Hétérogénéité des cultures cellulaires : intégration et étude

La miniaturisation des systèmes d'étude donne accès à une information sur la population cellulaire entière, à la résolution de l'individu. Les résultats développés au chapitre 4 ont confirmé que les cellules d'une culture répondent de manière hétérogène. Cette hétérogénéité est la norme du vivant et permet de réguler des phénomènes extrêmes. Elle provient de nombreuses sources, dont le bruit génétique. Cette variabilité semble avoir bloqué les méthodes d'analyses statistiques classiques que nous avons mises au point. Loin d'être un échec, cette constatation constitue un défi qui ouvre des perspectives de développements de la technologie pour réduire ou contrôler cette variabilité, nécessitant une intégration des différents éléments. Outre les applications déjà mentionnées, ce contrôle de la variabilité technologique ouvre des possibilités de recherche sur l'hétérogénéité des cultures elle-même, la façon dont elle est influencée et celle dont sa réponse à un stimulus se fabrique.

1 Le Haut Contenu : une nouvelle approche analytique

La miniaturisation des échantillons biologiques (cultures cellulaires) a conduit à l'utilisation de méthodes d'analyse haut-contenu. Elles permettent d'obtenir une résolution plus fine du comportement des cultures cellulaires sur deux plans distincts. D'une part elle prend en compte chaque cellule de chaque plot de manière individuelle. Ainsi de nouvelles méthodologies d'analyse de données permettent de caractériser des populations cellulaires par des distributions de mesures à l'échelle de la cellule.

D'autre part, le haut contenu donne accès à de nombreux paramètres quantifiés inaccessibles jusque là, comme la morphologie ou la localisation spatiale de certaines molécules au sein de la cellule. Cela permet de mieux caractériser les cellules et apporte une pertinence supplémentaire à l'analyse. D'une certaine manière, la variabilité des réponses se trouve diminuée puisque la limite entre des cellules considérées comme positives et les autres est beaucoup plus nette qu'avec la seule mesure fluorescente.

Nous avons montré que des techniques de spectrométrie de masse pouvaient aussi être utilisées pour caractériser des cultures cellulaires (chapitre 3.2). Elles donnent accès à plusieurs centaines de protéines, qui peuvent être autant de marqueurs connus et nouveaux des fonctions cellulaires. Le développement de méthodologie d'imagerie sur ces systèmes pourrait ouvrir la voie à des analyses « ultra haut-contenu » qui permettront d'affiner la pertinence des modèles cellulaires.

2 Contrôle Qualité : vers le « Laboratoire-sur-Puces »

L'analyse de données issues de ces traitements haut-contenu a nécessité le développement d'outils statistiques spécifiques (encore en cours aujourd'hui). Ils ont permis une évaluation de la technologie avec une résolution bien supérieure aux études précédentes. Celle-ci a révélé un certain manque de reproductibilité à des échelles de visualisation aussi fines, qui ne se montraient pas lorsque des mesures moins résolues étaient employées. Pour obtenir des résultats fiables, cette variabilité due aux biais technologiques doit être réduite à son minimum. Quatre angles d'attaque ont pu être identifiés et sont l'objet de recherches plus ou moins approfondies au laboratoire Biopuces.

Conclusion

Uniformisation des cultures cellulaires avant la formation des nanogouttes

Le biais technique le plus important résultant en une variabilité plot à plot concerne la dispense des cellules. Nous avons montré que les appareils de dispense piézo-électrique utilisés conduisent à des CV de l'ordre de 20%, indépendamment des autres conditions de cultures (différences de prolifération par exemple), ils induisent des variations des paramètres qui sont mesurées en utilisant les témoins positifs. Si l'on prend comme mesure d'un « bon » test un Z' (défini au paragraphe 4.5.1) positif, une variation de 20% (correspondant au rapport entre l'écart type et la moyenne du signal) représente une variation d'un facteur 4 ! Par exemple le paramètre « nombre de cellules » devrait évoluer de 100 cellules par plot lorsqu'elles ne sont pas traitées à 25 dans les plots traités pour obtenir un test correct à ce niveau.

Pour contrôler le nombre de cellules déposé par goutte, le laboratoire Biopuces développe un microdispenseur spécifique, fondé sur une technique de micro-valve capable de sélectionner les cellules à déposer et donc d'en maîtriser le nombre. La caractérisation et la détection se font par impédancemétrie (V. Haguët et al.) au sein d'un microcanal avant l'éjection.

Dans des développements plus poussés, il peut être envisagé de caractériser plus finement les cellules, au sein du microdispenseur (optique intégrée par exemple) ou en amont de la dispense, lors de la préparation (à l'aide de cytomètres comme le système « EasyCyte » de « Guava Technologies » ou des technologies de manipulation de cellules uniques). Par exemple, seules des cellules en phase G1 du cycle cellulaire seraient dispensées. Cependant cette réduction de la variabilité semble trop extrême et pourrait vraisemblablement corrompre la réponse de la population et donc la pertinence des résultats obtenus.

Intégration : le Laboratoire-sur-Puce (« lab-on-chip » en anglais) - contrôle des conditions pendant la culture en gouttes

La reproductibilité des conditions de culture sur la puce est essentielle pour réduire la variabilité observée à la seule hétérogénéité des cultures cellulaires. Dans l'état actuel de la technologie, toutes les étapes manuelles et les transferts des puces entre les éléments de la plateforme peuvent apporter une variabilité supplémentaire (spatiale notamment). L'intégration des puces dans des systèmes « clefs-en-main » et entièrement automatisés permettrait de réduire les actions manuelles. Ces systèmes ont été appelés des « Laboratoires-sur-Puces » [199-Anderssona]. Le contrôle des conditions atmosphériques par exemple n'est pas réalisé de façon optimale. La création d'une enceinte contrôlable qui suivrait la puce tout au long de l'expérience pourrait garantir un fonctionnement à volume réellement constant par exemple.

En outre, l'apport de fonctionnalités externes autour des puces dans un système tout en un ouvre la porte à des améliorations très attrayantes. Par exemple, l'ajout d'un système fluïdique pourrait permettre de changer les milieux de culture des cellules au cours de l'expérience, ce qui est un atout indéniable pour de nombreuses expériences. D'une part, cela permettrait d'utiliser des cinétiques plus longues que celles permises par les contraintes de volumes des gouttes. D'autre part, les stimulus chimiques déposés sur les cellules pourraient être rincés, ce qui représente une possibilité intéressante pour des applications de toxicologie à long terme entre autres.

Conclusion

Contrôle qualité intégré pendant la culture en gouttes

En plus des actions de prévention de la variabilité présentées ci-dessus, nous avons vu que le fait de caractériser plus finement les cellules au sein de leur population à l'aide du haut-contenu pouvait être considéré comme un contrôle qualité des cellules. Le comportement des cultures est très précisément observé, ce qui entraîne la possibilité de localiser celles qui ne correspondent pas au modèle étudié.

Cependant ce contrôle n'a lieu qu'en fin d'expérience, lors de l'étape d'acquisition d'images. L'intégration de capteurs au sein des plots pour « surveiller » en continu les cultures cellulaires apporterait une résolution temporelle, qui permettrait non seulement de contrôler les conditions de culture dans une optique de filtrage (enlever les plots ayant subi des biais technologiques de l'analyse par exemple), mais aussi d'intégrer une dimension supplémentaire à l'analyse (études de cinétiques plus poussées par exemple). Ces capteurs peuvent être optiques (colorimétrie par exemple) ou physico-chimiques (glycémiques par exemple). Leur intégration nécessitera une interface avec l'utilisateur et les autres éléments de la technologie et donc des compétences en électronique des capteurs.

Outils statistiques de normalisation des résultats obtenus après la culture en gouttes

Une fois l'expérience terminée et dans le cas où les biais liés à la technologie sont bien identifiés, il est possible d'appliquer des stratégies de normalisation des données. Nous avons déjà montré l'intérêt de la normalisation dans les applications de spectrométrie de masse (chapitre 3.2). Celle-ci avait pour but d'effacer la variabilité due aux conditions de désorption des protéines lors de l'analyse.

Dans une approche similaire, des méthodologies exploratoires de qualification des données issues de la technologie, obtenues avec la méthode d'imagerie haut-contenu pourraient permettre d'identifier des stratégies de normalisation. Par exemple, des effets spatiaux ont pu être mis en évidence par le travail de l'équipe de Jean-Philippe Vert (Ecole des Mines). Ceux-ci sont maintenant intégrés dans des modèles statistiques plus complexes pour normaliser les données suivant leur position sur la puce. Ces études sont encore en cours.

Les développements ayant trait à la réduction de la variabilité de la technologie pour une meilleure reproductibilité des résultats sont essentiels pour obtenir des analyses fines des cultures cellulaires, qui puissent se traduire par des interprétations pertinentes en termes biologiques.

3 La réponse d'une population n'est pas la moyenne des réponses

Les développements évoqués ci-dessous pourront aboutir à une reproductibilité des conditions de culture. L'accès à la réponse individuelle multiparamétrique des individus d'une population entière soumise à des conditions de culture cellulaire contrôlées permet d'envisager l'étude de l'hétérogénéité des cultures sous deux angles. Premièrement, il serait alors possible de choisir les cellules d'intérêt au sein d'une population, pour n'étudier que leur réponse. Par exemple, dans des modèles cellulaires en différenciation, il est possible de choisir de caractériser seulement les cellules différenciées parmi l'ensemble de la population (cela est aussi envisageable dans le cas où les cellules ont besoin de cellules de soutien pour bien se développer par exemple). Cela revient à fixer un seuil sur un ou plusieurs marqueurs permettant de distinguer les cellules d'intérêt, puis à comparer entre les différentes conditions les distributions des valeurs d'autres paramètres.

La proportion de cellules d'intérêt peut aussi être une variable analysée. Ce paramètre répond à la question : comment la réponse d'une population cellulaire à un stimulus se construit-elle ? Des réponses mathématiques et statistiques issues de modélisations commencent à apparaître [200-Moxnes, pour le cancer par exemple]. Pour valider les concepts qu'elles introduisent, les technologies d'expérimentation haut contenu sur une population cellulaire miniaturisée semblent adéquates puisqu'elles permettent de suivre l'évolution des cultures en fonction de nombreux stimulus, à l'échelle de l'individu d'une population. Les apports de la spectrométrie de masse ainsi que d'autres méthodes analytiques donnant des informations cellulaires pertinentes (RT-PCR de cellule unique par exemple) se révéleront sans doute décisifs. La recherche en biologie pourra alors se diriger vers sa vocation fondamentale, la compréhension intégrée des mécanismes moléculaires au coeur du vivant.

Les développements réalisés au cours de cette thèse pour mettre en place une technologie innovante de puces à cellules sont résolument pluridisciplinaires. Ils font évidemment appel à des compétences de biologie et de technologie (physique, chimie, automatique par exemple) mais aussi aux mathématiques et aux statistiques. L'environnement bouillonnant du laboratoire Biopuces du CEA Grenoble, ainsi que les apports et les dialogues constants entre les équipes partenaires ont permis de mettre en place une technologie opérationnelle qui répond aux besoins croissants de miniaturisation de la recherche en biologie.

Conclusion

Bibliographie Générale

Bibliographie Générale

Introduction

1. International Human Genome Sequencing Consortium “Initial sequencing and analysis of the human genome” *Nature* 409 (2001) 860-921
2. International Human Genome Sequencing Consortium ”Finishing the euchromatic sequence of the human genome” *Nature* 431 (2004) 931 - 945
3. Michael Dickson et Jean-Paul Gagnon « Key Factors in the Rising Cost of New Drug Discovery and Development » *Nature Reviews Drug Discovery* 3 (2004) 417-429
4. Smith A. “Screening for drug discovery, the leading question” *Nature* 418 (2002), 453-459

Chapitre 1 : Culture de cellules en gouttes

Puces à ADN

5. Schena M. et al. “Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray”. *Science* 270 (1995), 467–470
6. Lockhart D.J. et al., “Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays”. *Nat. Biotechnol.* 14 (1996), 1675–1680.
7. Shalon D et al. “A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization”. *Genome Res* 6 (1996) 639-45
- 8. S. Schena, R.A. et al. *Trends Biotechnol.* 16 (1998), 301–306.**
9. Ekins Roger and Frederick W. Chu “Microarrays: their origins and applications” *Trends Biotechnol* 17 (1999), 217-218
10. Venkatasubbarao Srivatsa et al. “Microarrays – status and prospects” *Trends in Biotechnology* 22 (2004) 630-637
11. Vishwanath R. Iyer et al. “The Transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum “, *Science* 283 (1999), 83-87.

Puces à protéines :

12. G. MacBeath et S.L. Schreiber ‘Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination’, *Science* 289 (2000) 1760-1763.
13. Paul Bertone et Michael Snyder “Advances in functional protein microarray technology” *FEBS* 272 (2005) 5400-5411
14. N Ramachandran et al. “Self-Assembling Protein Microarrays” *Science* 305 (2004) 86-90
15. E Phizicky et al. “Protein analysis on a proteomic scale”, *Nature* 422 (2003), 208-215
16. H Zhu et al. “Global Analysis of Protein Activities Using Proteome Chips” *Science* 293 (2001) 2101 – 2105

Autres puces à molécules :

17. Finny G. Kuruvilla et al. “Dissecting glucose signalling with diversity-oriented synthesis and small-molecule microarrays”, *Nature* 416 (2002), 653-657.
18. Jean Philippe Pellois et al. “Individually addressable parallel peptide synthesis on microchips”, *Nature Biotech.* 20 (2002) 922-926

Bibliographie Générale

Modèle animal

19. Greaves P. “First dose of potential new medicines to humans: how animals help”, *Nature Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 226-236
20. Preziosi P. Science, “pharmacoeconomics and ethics in drug R&D : a sustainable future scenario ?”, *Nature Rev. Drug Discov* 3 (2004), 521 – 526
21. Alexandra Gennari et al. “Strategies to replace *in vivo* acute systemic toxicity testing”, *ATLA* 32 (2004) 437-459
22. Nirmala Bhogal “The EU REACH System: Blessing in Disguise or Wolf in Wolf's Clothing?” *ATLA*, Vol. 33, No. 2, April 2005) [http://www.frame.org.uk/atlafn/atlacontents/33\(2\).htm](http://www.frame.org.uk/atlafn/atlacontents/33(2).htm)
23. Papier Blanc (2001), Commission Européenne « Stratégie pour la future politique dans le domaine des substances chimiques » disponible sur le site
24. http://europa.eu.int/eur-lex/lex/LexUriServ/site/fr/com/2001/com2001_0088fr01.pdf
25. Albert P. Li, “Preclinical *in vitro* screening assays for drug-like properties”, *Drug Discovery Today: Technologies*, 2 (Summer 2005) 179-185
26. Janie S Merkel “Functional protein microarrays: just how functional are they?” *Current Opinion in Biotechnology* 16 (2005) 447-452
27. X, Xu et DF Stern “Establishment of a cell-free system to study the activation of Chk2” *Methods Mol Biol.* 280 (2004) 165-74.
28. V. Noireaux et A. Libchaber “A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly” *PNAS* 101 (2004) 17669-74

Plaques à puits

29. Tina K. Garyantes “1536-well assay plates: when do they make sense?” *Drug Discovery Today*, 7 (2002) 489-490
30. Feiglin M et al., SBS Proposed Microplate Specification, *J. of Biomolecular Screening*, 4 (1999) 169-174

Puces à cellules « transfection inverse »:

31. Ziauddin, J. et Sabatini, D.M. “Microarrays of cells expressing defined cDNAs”. *Nature*, 411 (2001), 107–110.
32. Sabatini, D. M. “Transfection method and uses related thereto”, brevet n° US6951757.
33. Sabatini, D. M. “Reverse transfection method”, brevet n° US6544790
34. Chalfie, M., et al. “Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression” *Science* 263 (1994) 802–805.
35. Michael D. Uhler, “Surface transfection and expression procedure” brevet n° US6897067
36. Sandrine Baghdoyan et al. « Quantitative analysis of highly parallel transfection in cell microarrays », *Nucleic Acids Research*, 32 (2004) No. 9 e77
37. Fu-Hsiung Chang et al., “Surfection: a new platform for transfected cell arrays”, *Nucleic Acids Research* 32 (2004), No. 3 e33
38. Spyro Mousses et al. “RNAi Microarray Analysis in Cultured Mammalian Cells”, *Genome Res* 13(2003) 2341-2347
39. Jose M. Silva et al., “RNA interference microarrays: High-throughput loss-of-function genetics in mammalian cells”, *PNAS* 101 (2004) 6548-6552
40. H Erfle et R Pepperkok “Arrays of transfected mammalian cells for high content screening microscopy” *Methods Enzymol.* 404 (2005) 1-8
41. S.N. Bailey et al. “Applications of transfected cell microarrays in high-throughput drug discovery”. *Drug Discov. Today*, 7 (2002) S113–S118
42. B. Blagoev et al. “Microarrays go live—new prospects for proteomics”. *Trends Biochem. Sci.*, 26 (2001) 639–641

Bibliographie Générale

43. R.Z Wu et al., "Cell-biological applications of transfected-cell microarrays". Trends Cell Biol., 12 (2002) 485–488.
44. Steve N. Bailey et al, "Microarrays of small molecules embedded in biodegradable polymers for use in mammalian cell-based screens", PNAS 101 (2004) 16144–16149
45. David Filmore "It's a GPCR world", Modern Drug Discovery (American Chemical Society), 2004, pp11.
46. Yuji M. Mishina et al "Multiplex GPCR Assay in Reverse Transfection Cell Microarrays", J. Biomol. Screen. 9 (2004) 196-207

Gouttes

47. Pierre Gilles de Gennes, "Wetting: Statics and Dynamics", Reviews of Modern Physics, 57 (1985), 827-842.
48. TK Garyantes, "VIRTUAL WELLS FOR USE IN HIGH THROUGHPUT SCREENING ASSAYS", brevet n° WO9939829
49. B Schaack et al. "METHOD AND DEVICE FOR SCREENING MOLECULES IN CELLS" brevet n° EP1525472, abandonné.
50. V. Berejnov et Thorne RE., "Enhancing drop stability in protein crystallization by chemical patterning" Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 61(2005)1563-7
51. Robert Deegan et al., "Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops", Nature 389 (1997) 827 - 829
52. S. D. Gillmor et al. "Hydrophilic/Hydrophobic Patterned Surfaces as Templates for DNA Arrays" Langmuir, 16 (18), 7223 -7228, 2000.
53. Hung et al., "Use of Poly(tetrafluoroethylene as a Sample Support for the MALDI-TOF Analysis of DNA and Proteins", Analytical Chemistry, 71 (1999) 518-521.

Autres puces à cellules:

54. Emanuele Ostuni et al. "Selective Deposition of Proteins and Cells in Arrays of Microwells" Langmuir, 17 (2001), 2828 -2834, (whitesides)
55. C. Wilson Xu et al. "High-Density Cell Microarrays for Parallel Functional Determinations", Genome Res. 12 (2002), 482-486
56. James B. Delehanty et al. "Transfected Cell Microarrays for the Expression of Membrane-Displayed Single-Chain Antibodies" Analytical Chemistry, Vol. 76 (2004) 7323-7328
57. Manuel Thery et al. "The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis" Nature Cell Biology 7 (2005) 947-953
58. Alexander Revzin et al. , "Surface Engineering with Poly(ethylene glycol) Photolithography to Create High-Density Cell Arrays on Glass" Langmuir 19 (2003) 9855-9862
59. Christopher S. Chen et al., "Geometric Control of Cell Life and Death" Science 276 (1997) 1425-1428
60. Junji Fukuda et al. "Novel hepatocyte culture system developed using microfabrication and collagen/polyethylene glycol microcontact printing", Biomaterials 27 (2006) 1061–1070
61. Kwang-Seok Yun et Euisik Yoon, "A MICRO/NANO-FLUIDIC CHIP-BASED MICROWELL ARRAY FOR HIGH-THROUGHPUT CELL ANALYSIS AND DRUG SCREENING" μ TAS (2003) 861 – 864
62. Nianzhen Li et al. "Biology on a Chip: Microfabrication for Studying the Behavior of Cultured Cells" Critical Reviews™ in Biomedical Engineering, 31(2003):423–488
63. M. Goto et al., "DEVELOPMENT OF MICROCHIP-BASED BIOASSAY SYSTEM USING CULTURED CELLS" μ TAS (2003) 786 – 788

Bibliographie Générale

Bruit et stochasticité

64. Harley H. McAdams “It’s a noisy business! Genetic regulation at the nanomolar scale” *Trends in Genetics* 15 (1999) 65-69
65. John L. Spudis et al., “Non-genetic individuality: chance in the single cell”, *Nature* 262 (1976), 467 - 471
66. Ertugrul M. Ozbudak et al., “Regulation of noise in the expression of a single gene”, *Nature Genetics* 31 (2002), 69 - 73
67. Christopher V. Rao et al., “Control, exploitation and tolerance of intracellular noise”, *Nature* 420 (2002), 231-237
68. W. J Blake et al. “Noise in eukaryotic gene expression”. *Nature*. 422 (2003) 633-637.
69. JM Levsky et al., “Gene expression and the myth of the average cell”. *Trends Cell Biol.* 13 (2003) 4-6.
70. M. S. H. Ko, “Stochastic model for gene induction”. *J. Theor. Biol.* 153 (1991) 181-194
71. Tan Chee Meng, “Modelling and simulation of biological systems with stochasticity”, In *Silico Biology* 4 (2004), 0024
72. Jonathan M. Raser et al. “Control of Stochasticity in Eukaryotic Gene Expression” *Science* 304 (2004) 1811 – 1814
73. John Comley “HIGH CONTENT SCREENING - emerging importance of novel reagents/probes and pathway analysis”, *Drug Discovery World Summer 2005*, 31-53
74. <http://jura.wi.mit.edu/cellprofiler/>
75. Anne E. Carpenter et al. “CellProfiler: image analysis for high throughput microscopy” , in preparation
76. DB Wheeler et al. “RNAi living-cell microarrays for loss-of-function screens in *Drosophila melanogaster* cells” *Nature Methods* 1 (2) 1-6
77. D. Lansing Taylor et Kenneth A. Giuliano “Multiplexed high content screening assays create a systems cell biology approach to drug discovery” *Drug Discovery Today: Technologies*, 2 (Summer 2005) 149-154
78. Alivisatos A.P et al “Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots” *Science* 271 (1996) 933-937
79. Alivisatos A.P. “The use of nanocrystals in biological detection” *Nature Biotechnology* 22 (2004) 47 - 52
80. Michalet X et al. “Quantum Dots for Live Cells, *in vivo* Imaging, and Diagnostics” *Science*. 307 (2005) 538–544.

Evaporation

81. J.K. Hardy « Evaporation of Drops of Liquid » Aeoraucal Research Council – reports and memoranda 1953
82. R. G. Picknett et R Bexon, “The evaporation of sessile or pendant drops in still air” *Journal of Colloid and Interface Science* (1977), 61(2), 336-50
83. R D Deegan et al. “Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops” *Nature* 389 (1997) 827-829
84. K. S. Birdi et al. « A Study of the Evaporation Rates of Small Water Drops Placed on a Solid Surface”, *J. Phys. Chem.* 93 (1989) 3102-3703
85. H. Y. Erbil et al. “Drop Evaporation on Solid Surfaces : Constant Contact Angle Mode », *Langmuir* 18 (2202) 2636-2641
86. S. M. Rowan et al. “Evaporation of Microdroplets and the Wetting of Solid Surfaces” *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 13268-13271

Chapitre 2 : substrats et dispense

Puces et transfections :

87. Béatrice Schaack et al., “A “DropChip” Cell Array for DNA and siRNA Transfection Combined with Drug Screening” *Nanobiotechnology*, vol. 1, issue 2 (2005), pages 183-189
88. FH Chang et al., “Surfection: a new platform for transfected cell arrays.” *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) e33.

Gouttes

89. Dongqing Li et al. “Drop size dependence of contact angles and line tensions of solid-liquid systems” *Colloids and surfaces A* 116 (1996) 1-23
90. Josselin Mouette, “Physique des surfaces et des interfaces”, d’après le cours d’Elizabeth Charlaix, (2002), 1-38, disponible sur <http://jmouette.nerim.net/surfaces/>
91. S. Vafaeia et M.Z. Podowskia “Analysis of the relationship between liquid droplet size and contact angle” *Advances in Colloid and Interface Science* 113 (2005), Pages 133-146

SAM :

92. Abraham Ulman, “Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers” *Chem. Rev.* 96 (1996) 1533-1554
93. Amit Kumar, “Patterning Self -Assembled Monolayers: Applications in Materials Science” *Langmuir* 10 (1994) 1498-1511
94. E. Ruckenstein et Z.F. Li “Surface modification and functionalization through the self-assembled monolayer and graft polymerization”, *Advances in Colloid and Interface Science* 113 (2005) 43-63
95. JD Cox et al. “Surface passivation of a microfluidic device to glial cell adhesion: a comparison of hydrophobic and hydrophilic SAM coatings” *Biomaterials* 23 (2002) 929-35.
96. M Schaeferling et al., “Application of self-assembly techniques in the design of biocompatible protein microarray surfaces” *Electrophoresis* 23 (2002) 3097-105
97. Daniel T. Chiu “Patterned deposition of cells and proteins onto surfaces by using three-dimensional microfluidic systems”, *PNAS* 97 (2000) 2408–2413
98. A. G. Richter et al. “In situ and interrupted-growth studies of the self-assembly of octadecyltrichlorosilane monolayers” *PhysRevE* 61 (2000) 607
99. M. Mayer et al. “Chemical vapor deposition of fluoroalkylsilanemonolayer films”, *J. Vac. Sci. Technol. (B)* 18 (2000) 2433-2440
100. J.D. Le Grange et J.L. Markham “Effects of Surface Hydration on the Deposition of Silane Monolayers on Silica” *Langmuir* 9 (1993) 1749-1753
101. M. E. McGovern et al. « Role of Solvent on the Silanization of Glass with Octadecyltrichlorosilane », *Langmuir* 10 (1994) 3607-3614
102. Helmuth Hoffmann et al. “Structure of Alkylsiloxane Monolayers on Silicon Surfaces Investigated by External Reflection Infrared Spectroscopy” *Langmuir* 11 (1995) 1304-1312
103. C.P. Tripp et M.L. Hair “An Infrared Study of the Reaction of Octadecyltrichlorosilane with Silica” *Langmuir* 8 (1992) 1120-1126
104. Boris Kobrin et al., “Molecular Vapor Deposition – An Improved Vapor-Phase Deposition Technique of Molecular Coatings for MEMS Devices” *SEMICON® West*

Bibliographie Générale

2004 SEMI® Technical Symposium: Innovations in Semiconductor Manufacturing (STS: ISM)

Impression par micro-contact :

105. Noo Li Jeon et al. "Structure and Stability of Patterned Self-Assembled Films of Octadecyltrichlorosilane Formed by Contact Printing" *Langmuir* 13 (1997) 3382-3391
106. Chen C.S et al. "Geometric Control of Cell Life and Death" *Science* 276 (1997) 1425-1428
107. Younan Xia et George M. Whitesides "Soft Lithography" *angew. Chem. Int Ed.* 37 (1998) 500-575
108. Ravi S. Kane "Patterning proteins and cells using soft lithography" *Biomaterials* 20 (1999) 2363-2376
109. Christopher J. Campbell et al. "Reactive Surface Micropatterning by Wet Stamping" *Langmuir* 21 (2005) 2637 -2640

Surface nanostructurée :

110. T. Onda et al., "Super-Water-Repellent Fractal Surfaces" *Langmuir* 12 (1996) 2125-2127
111. Zhong-Ze Gu "Structural Color and the Lotus Effect", *Angewandte Chemie International Edition* 42 (2003) 894-897
112. Alexander Otten et Stephan Herminghaus "How Plants Keep Dry: A Physicist's Point of View" *Langmuir* 20 (2004) 2405 -2408,.
113. Reiner Fürstner et Wilhelm Barthlott "Wetting and Self-Cleaning Properties of Artificial Superhydrophobic Surfaces" *Langmuir* 21 (2005) 956 -961,
114. H.Y Erbil. et al. "Transformation of a Simple Plastic into a Superhydrophobic Surface" *Science* 299 (2003) 1377 – 1380
115. David Quéré, "Fakir droplets" *Nature Materials* 1 (2002) 14–15
116. J. Bico "Pearl Drops" *Europhys. Lett* 47 (1999) 220-226
117. J. Kijlstra et al. "Roughness and topology of ultra-hydrophobic surfaces" *Colloids Surf. A* 206 (2002), 521.
118. Aurélie Lafuma et David Quéré "Superhydrophobic states" *Nature Materials* 2, (2003) 457–460
119. Tom N. Krupenkin et al. « From Rolling Ball to Complete Wetting: The Dynamic Tuning of Liquids on Nanostructured Surfaces" *Langmuir* 20 (2004) 3824-3827
120. Martin Schuerenberg et al. "Prestructured MALDI-MS Sample Supports" *Anal. Chem.* 72 (2000) 3436-3442
121. Abraham Marmur "The Lotus Effect: Superhydrophobicity and Metastability" *Langmuir* 20 (2004) 3517 -3519,
122. J. Kijlstra et al. "Roughness and topology of ultra-hydrophobic surfaces" *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 206 (2002) 521-529
123. DE Ingber et al. "Fibronectin Controls Capillary Endothelial Cell Growth by Modulating Cell Shape" *PNAS* 87 (1990) 3579-3583
124. S.Raghavan et C.S. Chen "Micropatterned Environments in Cell Biology" *Advanced Materials* 16 (2004) 1303-1313
125. JOHN L. TAN et al. , "Simple Approach to Micropattern Cells on Common Culture Substrates by Tuning Substrate Wettability" *TISSUE ENGINEERING* 10 (2004) 865-872

Bibliographie Générale

Différentes solutions de dispense:

126. Don Rose “Microdispensing technologies in drug discovery” *Drug Discovery Today* 4 (1999) 411-419
127. David A. Dunn et Iiya Feygin “Challenges and solutions to ultra-high-throughput screening assay miniaturization : submicroliter fluid handling” *Drug Discovery Today* (5 - suppl) 2000 S84-S91
128. Hans-Rudolf Aerni et al. “Automated Acoustic Matrix Deposition for MALDI Sample Preparation” *Anal. Chem.* 78 (2006) 827 -834
129. R.N. Ellson et al. “Acoustic ejection of fluids from a plurality of reservoirs”, brevet n° US 6666541
130. R.N. Ellson “Picoliter: enabling precise transfer of nanoliter and picoliter volumes” *Drug Discovery Today* 7 (Suppl) 2002
131. Richard Ellson “Transfer of low nanoliter volumes between microplates using focused acoustics-automation considerations” *Journal of the Association for Laboratory Automation* 8 (2003) 29-34
132. SA Elrod et al. “Nozzleless Droplet Formation with Focused Acoustic Beams”, *J. of Appl. Phys.* 65(1989) 3441-3447,
133. Hsieh et al. “Ultra-High-Throughput Microarray Generation and Liquid Dispensing Using Multiple Disposable Piezoelectric Ejectors” *Journal of Biomolecular Screening* 9 (2004) 85-94
134. Tao Xu et al. “Inkjet printing of viable mammalian cells” *Biomaterials* 26 (2005) 93-99
135. Peter Koltay “The dispensing well plate: a novel nanodispenser for the multiparallel delivery of liquids (DWP Part I)” *Sensors and Actuators A: Physical* 116 (2004) 483-491
136. Oliver Gutmann et al. “Impact of medium properties on droplet release in a highly parallel nanoliter dispenser” *Sensors and Actuators A: Physical* 116 (2004) 187-194
137. Bas de Hei et al. “A tuneable and highly-parallel picolitre-dispenser based on direct liquid displacement” *Sensors and Actuators A: Physical* 103 (2003) 88-92
138. Ui-Chong et al. “Soft printing of droplets pre-metered by electrowetting” *Sensors and Actuators A: Physical* 114 (2004) 347-354
139. J. D. Jeyaprakash et al. “Modification of Micronozzle Surfaces Using Fluorinated Polymeric Nanofilms for Enhanced Dispensing of Polar and Nonpolar Fluids” *Anal. Chem.* 77 (2005) 6469-6474,
140. Daniel P. Little et al. “MALDI on a Chip: Analysis of Arrays of Low-Femtomole to Subfemtomole Quantities of Synthetic Oligonucleotides and DNA Diagnostic Products Dispensed by a Piezoelectric Pipet” *Anal. Chem.* 69 (1997) 4540 -4546,.
141. Anne Y. Fu et al. “An Integrated Microfabricated Cell Sorter” *Anal. Chem.* 74 (2002) 2451 -2457,
142. Mingyan He et al. “Selective Encapsulation of Single Cells and Subcellular Organelles into Picoliter- and Femtoliter-Volume Droplets” *Anal. Chem.* 77 (2005) 1539 -1544
143. D. C. Neugebauer et al. “Evidence of central and peripheral gravireception in the ciliate” *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 183 (1998) 303-311

Chapitre 3 : Phénotypage

Spectrométrie de masse et protéomique

144. LA Liotta, EF Petricoin 3rd "The promise of proteomics" *Clin Adv Hematol Oncol.* 1 (2003) 460-2
145. J Reboud et al. "Procédé et méthode pour l'analyse d'un milieu réactionnel vivant", brevet n° FR2857451
146. S.J. Gaskell "Electrospray: Principles and Practices". *J. Mass Spectrom.* 32 (1997) 677-688.
147. Dieter M. Drexler "Mass spectrometry techniques for qualitative and quantitative analysis of biomarkers" *Drug Discovery Today: Technologies* 1 (2004) 17-23
148. Johanna H. M. van Adrichem et al. "Investigation of Protein Patterns in Mammalian Cells and Culture Supernatants by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry" *Anal. Chem.* 70 (1998) 923 -930
149. EF Petricoin, LA Liotta. "SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer" *Curr Opin Biotechnol.* 15 (2004) 24-30.
150. Petricoin et al. *The Lancet* 359 (2002) 572-577.
151. RM Caprioli "Bombardment mass spectrometry" *Anal Chem.* 62 (1990) 477A-485A
152. M. W. Hayman a et S. A. Przyborski "Proteomic identification of biomarkers expressed by human pluripotent stem cells" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316 (2004) 918-923
153. Aimee L Edinger et Craig B Thompson "Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy" *Current Opinion in Cell Biology* 16 (2004) 663-669
154. Mieko Shiwa et al. "Rapid discovery and identification of a tissue-specific tumor biomarker from 39 human cancer cell lines using the SELDI ProteinChip platform" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309 (2003) 18-25

Analyse de données

155. R. Keira Curtis "Pathways to the analysis of microarray data" *Trends in Biotechnology* 23 (2005) 429-435
156. Joshua LaBaer "So, You Want to Look for Biomarkers (Introduction to the Special Biomarkers Issue)" *J. Proteome Res.* 4 (2005) 1053 -1059
157. « Freely associating » - editorial *Nature Genetics* 22 (1999) 1-2
158. Michael B. Eisen et al. "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns" 95 (1998) 14863-14868

Imagerie par spectrométrie de masse

159. Stanislav S. Rubakhin "Imaging mass spectrometry: fundamentals and applications to drug discovery" *Drug Discovery Today* 10 (2005) 823-837
160. P Chaurand "Imaging mass spectrometry: principles and potentials". *Toxicol Pathol.* 33 (2005) 92-101.
161. P Chaurand et al. "Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections". *Curr Opin Chem Biol.* 6 (2002) 676-81
162. P Chaurand et RM Caprioli "Direct profiling and imaging of peptides and proteins from mammalian cells and tissue sections by mass spectrometry" *Electrophoresis.* 23 (2002) 3125-35.
163. H Nygren et al "Localization of cholesterol, phosphocholine and galactosylceramide in rat cerebellar cortex with imaging TOF-SIMS equipped with a bismuth cluster ion source." *Biochim Biophys Acta.* 1737 (2005) 102-10

Bibliographie Générale

164. D Touboul et al. "Tissue molecular ion imaging by gold cluster ion bombardment." *Anal Chem.* 76 (2004) 1550-9.
165. TP Roddy et al., "Imaging of freeze-fractured cells with in situ fluorescence and time-of-flight secondary ion mass spectrometry." *Anal Chem.* 74 (2002) 4011-9.
166. TL Colliver et al. "Atomic and molecular imaging at the single-cell level with TOF-SIMS". *Anal Chem.* 69 (1997) 2225-31.
167. A Wittig et al., "Preparation of cells cultured on silicon wafers for mass spectrometry analysis." *Microsc Res Tech.* 66 (2005) 248-58.

Chapitre 4: applications

Chimiosensibilité et génomique fonctionnelle

168. "Nouvelle place de la chimiothérapie des gliomes » *Bulletin du Cancer.* Numéro 92, volume 4, 343-54, AVRIL 2005, Dossier thématique
169. Hamlat A et al. "Oligodendroglioma: clinical study and survival analysis correlated with chromosomal anomalies". *Neurosurg Focus.* 19 (2005) E15.
170. T Kanzawa et al. "Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide." *J Neurosurg.* 99 (2003) 1047-52
171. BC Liang et al., "Effects of hypoxia on drug resistance phenotype and genotype in human glioma cell lines" *J Neurooncol.* 29 (1996) 149-55
172. H Ohgaki et P. Kleihues « Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas." *J Neuropathol Exp Neurol.* 64 (2005) 479-89
173. A Zupanska et al. "Cyclosporine a induces growth arrest or programmed cell death of human glioma cells" *Neurochem Int.* 47 (2005) 430-41

RNA interférence

174. J. Kurreck et al. « Antisense technologies: improvement through novel chemical modifications » *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 1628-1644
175. T Aboul-Fadl "Antisense oligonucleotides: the state of the art." *Curr Med Chem.* 12 (2005) 2193-214.
176. Y. Zhang et al. « Antisens inhibition : oligonucleotides, ribozymes, and siRNAs » *Methods Mol. Med.* 106 (2005) 11-24
177. Andrew Fire et al. "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*" *Nature* 391 (1998) 806-811
178. Gregory J. Hannon "RNA interference" *Nature* 418 (2002) 244-251
179. Gregory J. Hannon et John J. Rossi "Unlocking the potential of the human genome with RNA interference" *Nature* 431 (2004) 371-378
180. Elbashir SM et al. "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells" *Nature.* 411 (2001) 494-8.
181. Victor Ambros « The functions of animal microRNAs », *Nature* 431 (2005) 350-355
182. James C. Carrington et Victor Ambros « Role of MicroRNAs in Plant and Animal Development » *Science* 301 (2003) 336-338
183. K. Berns, et al. "A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway". *Nature* 428 (2004) 431-437
184. Rajeev Kumar et al. "High-Throughput Selection of Effective RNAi Probes for Gene Silencing" *Genome Research* 13 (2003) 2333-2340

Bibliographie Générale

185. AT Willingham “RNAi and HTS: exploring cancer by systematic loss-of-function.” *Oncogene*. 23 (2004) 8392-400.
186. P. J. Paddison, et al. A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature* 428 (2004) 427–431
187. Shou-Wei Ding “RNAi: Mechanisms, Biology and Applications” *FEBS Letters* 579 (2005) 5821-6008
188. Gunter Meister et Thomas Tuschl « Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA » *Nature* 431 (2004) 343-349
189. Jo Whelan “First clinical data on RNAi” *Drug Discovery Today* 10 (2005) 1014-1015
190. A Forte et al. “Small interfering RNAs and antisense oligonucleotides for treatment of neurological diseases”. *Curr Drug Targets*. 6 (2005) 21-9.
191. J Beal “Silence is golden: can RNA interference therapeutics deliver?” *Drug Discov Today*. 10 (2005) 169-72.
192. Zain Paroo et David R. Corey “Challenges for RNAi *in vivo*” *Trends in Biotechnology* Volume 22 (2004) 390-394
193. Delquin Gongga et James E. Ferrell, Jr “Picking a winner: new mechanistic insights into the design of effective siRNAs” *Trends in Biotechnology* 22 (2004) 451-454
194. Manish Aghi et al., “Effect of Chemotherapy-Induced DNA Repair on Oncolytic Herpes Simplex Viral Replication” *J Natl Cancer Inst* 98 (2006) 38-50.

Analyse de données

195. Zachary E. Perlman, et al. “Multidimensional drug profiling by automated microscopy” *Science* 306 (suppl-2004)1194-1198
196. J-H Zhang et al. “A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays”. *J Biomol Screen*. 4 (1999) 67–73.

Conclusions

197. GRIPON P. et al. “Infection of a new human hepatoma cell line by hepatitis B virus” *PNAS* 36 (2002) 673-677
198. Haguet et al. “A CELL MICRODISPENSER FOR ACCURATE POSITIONING OF SINGLE CELL”, μ TAS conference 2005 (3-13 Octobre 2005), Boston (MA), USA.
199. Helene Andersson et Albert van den Berg “Microfluidic devices for cellomics: a review” *Sensors and Actuators B: Chemical* 92 (2003) 315-325
200. JF Moxnes et al. "The dynamics of cell proliferation" *Med Hypotheses*. 62 (2004) 556-63

Bibliographie Générale

ANNEXES

A Protocole de fabrication du premier lot de puces à cellules par silanisation en phase liquide par la société Memscap.

B Béatrice Schaack et al., “A “DropChip” Cell Array for DNA and siRNA Transfection Combined with Drug Screening” *Nanobiotechnology*, vol. 1, issue 2 (2005), pages 183-189.

A Protocole de fabrication du premier lot de puces à cellules par silanisation en phase liquide par la société Memscap

1. fabrication des wafers de verre avec dépôt d'une résine photosensible négatif
2. découpe des puces
3. rinçage dans une solution d'acide nitrique 10% pendant 10 min
4. rinçage à l'eau distillée pendant 5 min
5. séchage à l'azote, puis sur une plaque chauffante à 60°C pendant 10 min
6. rinçage à l'isooctane pendant 10 min
7. séchage à température ambiante pendant au moins 1h
8. séchage sur plaque chauffante à 60°C pendant 5 min juste avant de se placer dans la boîte à gants sous azote.
9. séchage dans la boîte à gants sous azote pendant 10 min
10. préparation de la solution de FDTS 1mM dans de l'isooctane anhydre
11. contact avec la solution de FDTS pendant 12 min
12. rinçage à l'isooctane sans FDTS pendant 10 min
13. évacuation de la solution de silane
14. dissolution de la résine photosensible par des cycles de rinçages dans l'acétone sous ultrasons.
15. rinçage à l'eau distillée pendant 5 min puis répétition des étapes 3-5 avec la plaque chauffante sur 120°C
16. inspection sous microscope
17. packaging en Gel-PackTM.

Traduit de l'anglais.

**B *Béatrice Schaack et al.*, “A “DropChip” Cell Array for DNA and siRNA Transfection Combined with Drug Screening”
Nanobiotechnology, vol. 1, issue 2 (2005), pages 183-189**

C Formulaire pour calotte sphérique

Les formules ci-dessous ont été utilisées pour tous les calculs de volumes, d'angles, et de surfaces pour lesquels aucune référence ou mesure directe n'était disponible.

$$V = \frac{\pi h(4h^2 + 3D^2)}{24}$$

$$R = \frac{(h^2 + D^2/4)}{2h}$$

$$\sin \theta = \frac{D}{2R}$$

$$S = \frac{\pi}{4}(D^2 + 4h^2)$$

Où :

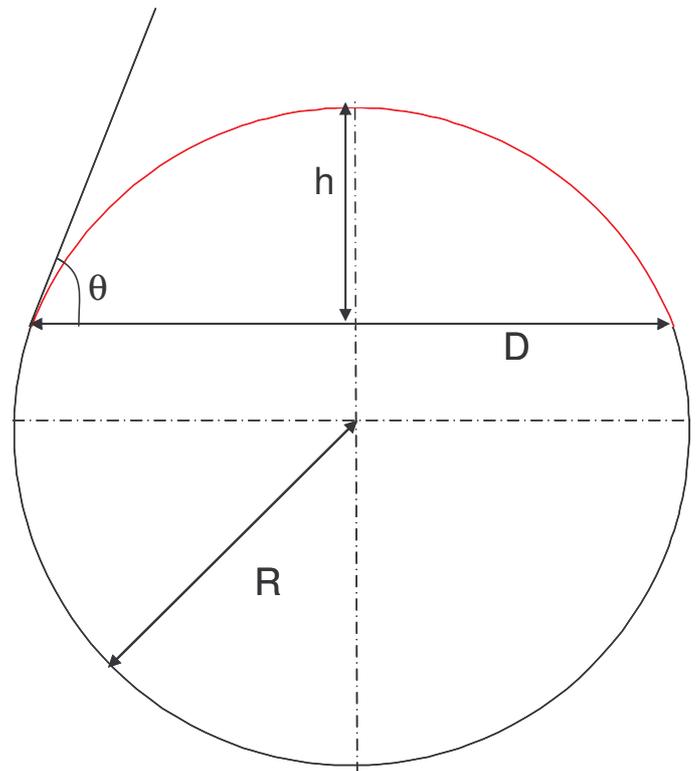
V = volume de la calotte sphérique

h = hauteur de la calotte sphérique

D = diamètre de la calotte sphérique

R = rayon de la sphère

S = surface de la calotte sphérique



Mise au point d'un format innovant de puces à cellules pour l'analyse phénotypique à haut-contenu

Aujourd'hui la recherche en biologie dispose d'une masse d'informations génomiques considérable qu'il faut comprendre fonctionnellement pour faire émerger de nouveaux concepts, qui formeront le berceau de nouvelles thérapies. Ces études mettent en jeu des mécanismes contrôlés à l'échelle moléculaire et nécessitent le traitement d'informations à haut-débit et de manière parallèle. Les travaux pluridisciplinaires présentés ont permis de mettre au point une technologie miniaturisée de culture de cellules en gouttes matricées sur supports solides, pour tester l'action des molécules sur le comportement de cellules.

Après avoir mis au point un démonstrateur macroscopique validé par des transfections de molécules nucléiques, nous avons développé un protocole de fabrication de substrats miniaturisés capable de maintenir 100 nano-gouttes par cm^2 à l'aide d'un différentiel de tension de surface. Un robot de dispense de pico-gouttes a été intégré pour réaliser les gouttes de culture cellulaire de manière automatique. Le comportement des cellules au sein des gouttes est évalué par microscopie en fluorescence à haut-contenu après fixation. Chaque cellule de chaque goutte est caractérisée par des dizaines de paramètres de manière individuelle.

Cette nouvelle approche analytique a été appliquée dans le cadre d'un projet multipartenaire de criblage de siRNA visant à étudier l'impact de gènes sur la chimiorésistance de glioblastomes. Par ailleurs nous avons montré l'utilisation de la spectrométrie de masse comme méthode de phénotypage multiparamétrique. Cette technologie de puce à cellules est particulièrement adaptée à l'étude à haut-débit des comportements fins de cultures cellulaires.

Development of a new cell-on-chip format for high-content phenotyping

Nowadays biology research is faced with a considerable amount of genomic data which has to be functionally characterised in order to bring new concepts, which will lead to new therapies. These studies approach molecular-based mechanisms, and need high-throughput and parallel data management. The multidisciplinary work presented here has allowed the development of a miniaturised technology of cell culture in liquid drops, matrixed on a plane solid substrate, to test the action of molecules or conditions on the cells behaviour.

After the macroscopic demonstration of nucleic acid molecule transfection in living cells on such a device, we have developed a fabrication protocol for a miniaturised support, able to maintain 100 nano-drops per cm^2 , based on differential surface tensions. A picoliter dispensing robot was integrated to make the cell culture drops automatically. The cells' behaviour in the drops is analysed by high-content fluorescence microscopy after fixation. Each cell of each drop is characterised by tenths of parameters individually.

This new analytical approach, which has triggered the development of new bio-statistical tools, has been applied to a multipartner project of siRNA screening, aimed at studying the impact of genes on glioblastoma cells chemoresistance. We have also shown the use of mass spectrometry as a multiparametric phenotyping method. This cell-on-chip technology seems particularly well suited for the study of the precise behaviour of cells among a population at high-throughput. It will be the base of new lab-on-chip technologies.