



HAL
open science

Etude des phénomènes d'adhésion entre des cellules B et des gouttes d'huile fonctionnalisées par des anticorps à l'aide de pièges microfluidiques

Olivier Mesdjian

► To cite this version:

Olivier Mesdjian. Etude des phénomènes d'adhésion entre des cellules B et des gouttes d'huile fonctionnalisées par des anticorps à l'aide de pièges microfluidiques. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066502 . tel-01821875

HAL Id: tel-01821875

<https://theses.hal.science/tel-01821875>

Submitted on 23 Jun 2018

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

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

Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie

École doctorale de Chimie Physique et Chimie analytique de Paris Centre

Présentée par

Olivier MESDJIAN

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Sujet de la thèse :

Étude des phénomènes d'adhésion entre des cellules B et des gouttes d'huile fonctionnalisées par des anticorps à l'aide de pièges microfluidiques

Soutenue publiquement le 21 décembre 2017 devant le jury composé de :

Mme. Claire HIVROZ

Rapporteur

M. Thomas PODGORSKI

Rapporteur

Mme. Catherine VILLARD

Présidente du jury

M. Yong CHEN

Directeur de thèse

En présence des membres invités :

M. Jacques FATTACCIOLI

Encadrant de thèse

M. Paolo PIEROBON

Membre invité

Remerciements

Je remercie Claire Hivroz et Thomas Podgorski d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, et Catherine Villard d'avoir accepté d'être Présidente du jury.

Je remercie Jacques Fattaccioli qui m'a accueilli dans son équipe et guidé dans mon travail au cours de ces trois années. Je remercie Yong Chen pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse et également pour ses conseils. Je remercie Paolo Pierobon qui a ouvert mon sujet vers des domaines de biologie et m'a aidé pour l'analyse. Je remercie également Marie-Caroline Jullien pour sa relecture de la partie sur les pièges microfluidiques de ce manuscrit.

Le travail présenté ici ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui sans l'aide de certaines personnes : Pablo Saez qui a cultivé les cellules B et m'a appris à faire attention à elles, Guillaume Schelcher qui m'a appris le fonctionnement de la Dilase et de bien d'autres machines de la salle blanche, Guillaume Laffite qui m'a beaucoup aidé en microfluidique, Lorraine Montel qui a fabriqué les gouttes que j'ai utilisées.

Je salue mes collègues, d'abord croisés à l'ENS : Diana et Sandrine qui m'ont fait découvrir la formulation des émulsions et la culture cellulaire ; les doctorants Kalthoum, Pascal, Yadong, Bin, Shaolong, Jin qui m'a appris à mouler du PDMS pour la première fois ; Thomas, Damien et Xiaoqing ; Mathieu Morel pour les conversations intéressantes que nous avons eues.

Durant les deux années passées à l'Institut Pierre-Gilles de Gennes, j'ai eu la chance de travailler en compagnie de Lorraine, Kaori, Léa et Sasha, avec qui j'ai partagé de bons moments, et notamment de très bon repas sur la terrasse de l'IPGG. Je leur souhaite une bonne continuation à l'IPGG. Je remercie au passage également Judith pour m'avoir prêté quelques cellules B.

A l'IPGG, j'ai eu l'occasion de rencontrer des personnes venant de tous les horizons et toujours très sympathiques (j'en oublie bien entendu) : au 7^{ème} étage, Aurélien ; au 6^{ème} étage, Jules, Fabrice, Hubert, Loïc, Marie, Joshua ; au 5^{ème} le duo Nawel-Olivier ; au 4^{ème}, Charles, Ismaël, Miza, Ayako, Bastien, Angelo ; au 3^{ème} Larrissa, Guillaume, Damien, Raphaëlle, Pablo V., Nicolas, Clotilde, Laetitia ; au 2^{ème} Nawal ; au rez-de-chaussée, Perrine Franquet, Manon Pommier et Mériam Marsan pour la gestion administrative et les événements IPGG, et Sylvia pour l'accueil du matin.

Je remercie mon cousin Fabien qui m'a hébergé le temps que je trouve un appartement. Je remercie enfin mes parents, ma sœur et mon frère qui m'ont encouragé pendant ces trois années passées à Paris.

Table des matières

Préambule	11
Partie 1 : Utilisation de gouttes d'huile métallisées comme traceurs en micro vélocimétrie	13
Introduction générale	15
I) Introduction à la mesure de vitesse de liquides dans des canaux microfluidiques	17
1) TECHNIQUES DE MICRO VELOCIMETRIE.....	17
2) NOTIONS DE BASE D'ANALYSE D'IMAGE POUR LA MICRO VELOCIMETRIE.....	19
3) CHOIX DES PARTICULES POUR LA MICRO VELOCIMETRIE	21
4) ECOULEMENT DANS UN CANAL DE SECTION RECTANGULAIRE	23
5) APPLICATIONS	25
II) Utilisation de gouttes métallisées comme traceurs en micro vélocimétrie	27
1) PRINCIPE DE L'EXPERIENCE	27
2) PROTOCOLES ET INSTRUMENTATION	28
2.1) Fabrication de l'émulsion.....	28
2.2) Ajout des couches de polydopamine et d'argent.....	29
2.3) Fabrication du canal microfluidique.....	30
2.4) Microscopie	30
2.5) Simulation numériques et analyse d'images.....	30
3) RESULTATS ET DISCUSSION	31
3.1) Les gouttes d'huile métallisées fluorescentes et absorbantes	31
3.2) Dispositif expérimental.....	32
3.4) Mesure de la vitesse	33
3.5) Profils de vitesse déterminés avec les billes de polystyrène et les gouttes métallisées	34
3.6) Mesure de la résistance hydrodynamique des canaux	36
4) CONCLUSION	37
Partie 2 : Étude des phénomènes d'adhésion entre des gouttes d'huile fonctionnalisées par des anticorps et des cellules B à l'aide de pièges microfluidiques	39
Introduction générale	41
Partie 2.1. Introduction au mécanisme de reconnaissance d'antigènes par les cellules B	43
I) Présentation du système immunitaire	43
1) PRESENTATION DES CELLULES DU SYSTEME IMMUNITAIRE.....	43
2) ÉTAPES DE LA REPOSE IMMUNITAIRE.....	45
3) RECEPTEURS MEMBRANAIRES DES CELLULES B	46
3.1) Structure d'un anticorps	46
3.2) Récepteurs membranaires de la cellule B.....	47
II) Présentation de la synapse immunologique chez la cellule B	48
1) OBSERVATIONS EXPERIMENTALES	48
2) PRESENTATION DE LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE CHEZ LES CELLULES B	49
3) ACCUMULATION D'ANTIGENES ET AUGMENTATION DE SURFACE.....	51
4) PARAMETRES INFLUENÇANT LA REPOSE DE LA CELLULE B.....	53
5) INTERPRETATION	55
III) Deux mécanismes proposés pour l'extraction d'antigène	56
1) MISE EN EVIDENCE D'UNE POLARISATION DU LYSOSOME.....	57
2) MISE EN EVIDENCE D' ACTIONS MECANIQUES.....	58
2.1) Utilisation de substrats de rigidités différentes.....	58
2.2) Résultats des mesures du nombre d'antigènes extraits.....	60
2.3) Observations de déformations de la surface.....	61

3)	EXPLICATION DES DEUX MECANISMES	63
3.1)	<i>Notions d'énergie de déformation de bicouches lipidiques.....</i>	63
3.2)	<i>Présentation des deux mécanismes.....</i>	64
3.3)	<i>Explication des expériences de Spillane et Tolar</i>	65
4)	ROLE DE LA MYOSINE DANS L'EXTRACTION D'ANTIGENE	67
5)	LIMITES DES SUBSTRATS UTILISES.....	68
IV)	Ideé de l'utilisation de gouttes fonctionnalisées par des anticorps comme substrat pour les cellules B	69
1)	PRESENTATION DES GOUTTES D'HUILE D'EMULSION FONCTIONNALISEES	69
1.1)	<i>Fabrication des émulsions.....</i>	69
a)	<i>Par cisaillement contrôlé</i>	69
b)	<i>Génération de gouttes en microfluidique.....</i>	72
1.2)	<i>Fonctionnalisation des gouttes d'émulsion</i>	73
2)	AVANTAGES DES GOUTTES PAR RAPPORT AUX SUBSTRATS DEJA UTILISES	74
3)	MISE EN CONTACT DE GOUTTES FONCTIONNALISEES AVEC DES CELLULES T.....	76
3.1)	<i>Mise en contact de gouttes « complémentaires ».....</i>	76
3.2)	<i>Mise en contact de gouttes fonctionnalisées par des anticorps avec des cellules T.....</i>	78
3.3)	<i>Réponse biochimique de la cellule T.....</i>	79
3.4)	<i>Influence de l'actine et de la nature des récepteurs sur la cinétique.....</i>	80
3.5)	<i>Dynamique des ligands et récepteurs à l'interface</i>	82
3.6)	<i>Conclusions.....</i>	83
3.7)	<i>Remarques sur le dispositif expérimental.....</i>	84
	Partie 2.2. Fabrication et caractérisation des pièges microfluidiques	85
I)	Introduction.....	85
1)	PRESENTATION	85
2)	LES PIEGES MICROFLUIDIQUES « EN SERPENTIN »	86
3)	RESEAUX DE PIEGES EN U.....	87
4)	METHODE DE L'INVERSION DE FLUX	89
5)	CARACTERISATION DU REMPLISSAGE.....	90
6)	SIMULATIONS NUMERIQUES.....	91
II)	Fabrication et instrumentation.....	92
1)	CHOIX DES PIEGES.....	92
2)	CARACTERISTIQUES GEOMETRIQUES DE NOS PIEGES ET DES CHAMBRES.....	92
2)	FABRICATION DE NOS PIEGES	94
2.1)	<i>Etapas de dessin.....</i>	94
2.2)	<i>Fabrication du moule.....</i>	96
2.3)	<i>Fabrication de la puce en PDMS.....</i>	97
3)	PREPARATION DES BILLES DE POLYSTYRENE ET DES GOUTTES D'HUILE FLUORESCENTES.....	97
3.1)	<i>Préparation des billes de polystyrène</i>	97
3.2)	<i>Préparation des gouttes d'huile (Couette et microfluidique)</i>	97
4)	MICROSCOPIE	98
5)	REGULATEUR DE PRESSION.....	98
6)	ANALYSE D'IMAGE	98
III)	Résultats et caractérisation.....	98
1)	RESULTATS DE LA MICRO-FABRICATION	99
2)	RESULTATS POUR LES GOUTTES FLUORESCENTES	100
3)	DISPOSITIF EXPERIMENTAL POUR LA CARACTERISATION.....	101
4)	METHODE EXPERIMENTALE	103
5)	UTILISATION D'UNE CHAMBRE RECTANGULAIRE POUR COMMENCER	103
5.1)	<i>Premières observations.....</i>	103
5.2)	<i>Influence de la concentration sur la cinétique.....</i>	105

6)	PREMIERES OBSERVATIONS AVEC LA CHAMBRE DROITE ET DECALEE.....	106
6.1)	Remplissage simple pour les billes de 5 μm	106
6.2)	Remplissage simple pour les gouttes de 14,4 μm	108
6.3)	Inversion du flux.....	110
7)	ÉTUDE QUANTITATIVE.....	111
7.1)	Méthode d'analyse d'images.....	111
7.2)	Cinétiques de remplissage.....	113
7.3)	Répartition spatiale.....	115
7.4)	Statistique de remplissage.....	117
8)	SIMULATIONS NUMERIQUES.....	118
8.1)	Hypothèses et méthodes.....	118
8.2)	Profils de vitesse et lignes de champ.....	119
8.3)	Comparaison des lignes de champ avec l'expérience.....	120
9)	OBSERVATIONS A LA CAMERA RAPIDE.....	122
9.1)	Présentation.....	122
9.2)	Protocole expérimental.....	122
9.3)	Résultats.....	122
IV)	Interprétation.....	124
1)	PRESENTATION ET HYPOTHESES.....	124
1.1)	Bases théoriques.....	124
1.2)	Applications numériques.....	125
2)	OBSERVATION DES LIGNES DE CHAMP DU LIQUIDE.....	125
3)	ZONE DE CAPTURE ET ZONE DE PASSAGE.....	127
3.1)	Définitions.....	127
3.2)	Déviations des zones.....	129
3.3)	Remarque sur la valeur de α	129
4)	DIFFICULTES DU REMPLISSAGE DU MILIEU DE LA CHAMBRE DROITE.....	130
Partie 2.3. Etude du contact entre des gouttes fonctionnalisées par des anticorps et des cellules B		131
I)	Présentation de la fonctionnalisation.....	131
1)	PHOSPHOLIPIDES BIOTINYLES.....	131
2)	LIEN ENTRE LA GOUTTE D'HUILE ET LA CELLULE B.....	132
3)	AFFINITE DES DIFFERENTS LIENS.....	134
II)	Protocoles et instrumentation.....	134
1)	FONCTIONNALISATION DES GOUTTES D'EMULSION.....	134
1.1)	Fabrication des gouttes d'émulsion à partir d'huile contenant des phospholipides.....	135
1.2)	Fonctionnalisation par des anticorps $F(ab')_2$	135
1.3)	Fonctionnalisation par de la BSA.....	137
1.4)	Ajout d'anticorps secondaires fluorescents.....	137
2)	CELLULES B.....	137
2.1)	Culture.....	137
2.2)	Transfection avec un plasmide d'ADN.....	138
a)	Principe d'une transfection transitoire et application à notre expérience.....	138
b)	Principe de l'électroporation des cellules.....	139
c)	Protocole pour la visualisation des lysosomes en fluorescence.....	140
2.3)	Transfection pour l'interférence par ARN.....	140
a)	Principe de l'interférence par ARN.....	141
b)	Protocole pour l'interférence par ARN.....	142
2.4)	Préparation des cellules B avant l'expérience.....	142
3)	PIEGES MICROFLUIDIQUES.....	142
4)	REGULATEUR DE PRESSION.....	143
5)	MICROSCOPIE.....	143

6)	ANALYSE D'IMAGE	143
7)	DISPOSITIF EXPERIMENTAL	143
8)	METHODE EXPERIMENTALE	145
III)	Résultats	147
1)	RESULTATS DE LA FONCTIONNALISATION DES GOUTTES.....	147
1.1)	<i>Fonctionnalisation par la streptavidine</i>	<i>147</i>
1.2)	<i>Fonctionnalisation par les $F(ab')_2$</i>	<i>148</i>
2)	PREMIERES OBSERVATIONS	149
2.1)	<i>Avec le spinning disk</i>	<i>149</i>
2.2)	<i>Avec le microscope optique.....</i>	<i>150</i>
3)	METHODES D'ANALYSE.....	151
3.1)	<i>Méthode dite « des pics »</i>	<i>151</i>
3.2)	<i>Méthode dite « droite-gauche ».....</i>	<i>153</i>
3.3)	<i>Comparaison des deux méthodes et des instruments de mesure.....</i>	<i>155</i>
4)	RESULTATS DES ANALYSES « DES PICS »	156
4.1)	<i>Cas du microscope optique.....</i>	<i>156</i>
4.2)	<i>Cas du spinning disk.....</i>	<i>158</i>
5)	RESULTAT DES ANALYSES « DROITE-GAUCHE »	159
6)	PARAMETRES D'INTERET	160
6.1)	<i>Dépendances des paramètres des courbes de la méthode des pics (microscope optique).....</i>	<i>160</i>
6.2)	<i>Influence de la fluorescence de départ de la goutte sur $(I_{max}-I_{min})$ (microscope optique)</i>	<i>161</i>
6.3)	<i>Influence de la fluorescence de départ de la goutte sur (I_d-I_g) (spinning disk)</i>	<i>162</i>
7)	CINETIQUES DE $(I_{MAX}-I_{MIN})$ ET DE (I_D-I_G) NORMEES (MICROSCOPE OPTIQUE - SPINNING DISK)	163
8)	DISTRIBUTION DES TEMPS CARACTERISTIQUES DE $(I_{MAX}-I_{MIN})$ (MICROSCOPE OPTIQUE) ET DE (I_D-I_G) (SPINNING)	165
9)	MESURES DE LA TAILLE DU PATCH FLUORESCENT.....	166
9.1)	<i>Mesure directe.....</i>	<i>166</i>
9.2)	<i>Méthode de calcul de la longueur du patch.....</i>	<i>168</i>
9.3)	<i>Comparaison du calcul de la taille du patch avec la mesure à mi-hauteur</i>	<i>169</i>
9.4)	<i>Exemples de calculs de longueur de patch.....</i>	<i>170</i>
9.5)	<i>Moyennes de tailles de patch calculées.....</i>	<i>171</i>
10)	OBSERVATIONS DU NOYAU	172
11)	POLARISATION DU LYSOSOME.....	173
12)	INFLUENCE DE LA MYOSINE 1E ET 1C DANS LE RECRUTEMENT	175
12.1)	<i>Observations en fluorescence</i>	<i>175</i>
12.2)	<i>Etude par extinction de gènes.....</i>	<i>177</i>
IV)	Discussion	180
1)	APPARITION D'UN PATCH SUITE A UNE RECONNAISSANCE SPECIFIQUE PAR LES CELLULES B.....	180
2)	EVOLUTION DES CINETIQUES DE (I_D-I_G) ET $(I_{MAX}-I_{MIN})$ NORMEES ET LIEN AVEC LE TYPE DE MESURE.....	182
3)	DIMINUTION DU PATCH ET LIEN AVEC LES CINETIQUES DE (I_D-I_G) ET $(I_{MAX}-I_{MIN})$	183
4)	(I_D-I_G) POUR LE SPINNING ET $(I_{MAX}-I_{MIN})$ POUR LE MICROSCOPE OPTIQUE SONT CONSTANTS EN FONCTION DE I_{MIN} 184	
5)	PROCESSUS IMPLIQUANT UNE POLARISATION DU LYSOSOME	185
6)	INFLUENCE DE LA MYOSINE DANS LE RECRUTEMENT D'ANTICORPS.....	187
	Conclusion	189
	Perspectives.....	191
1)	L'EFFICACITE DES PIEGES POUR OBTENIR DES DOUBLETES GOUTTE/CELLULE PEUT ETRE AMELIOREE	191
2)	POSSIBILITE DE VISUALISER LES RECEPTEURS DES CELLULES B EN FLUORESCENCE	192
3)	NOS GOUTTES MIMENT-ELLES BIEN LES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENE ?.....	192
4)	À PROPOS DES GOUTTES : MEILLEURE CARACTERISATION DE LA QUANTITE D'ANTICORPS EN SURFACE ET GOUTTES MOINS RIGIDES.....	193

5) QUANTIFICATION DE LA POLARISATION DES LYSOSOMES ET CONFIRMATION DU CARACTERE ACTIF DE L'ACCUMULATION DES ANTICORPS.....	194
6) APPLICATIONS POSSIBLES : ETAT PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES ET TESTS DE VACCINS.....	194
RÉFÉRENCES	197
ANNEXES	201
Partie 1 : fabrication des gouttes métallisées et du canal microfluidique.....	201
1) FABRICATION DES GOUTTES D'EMULSION	201
2) AJOUT DES COUCHES DE POLYDOPAMINE ET D'ARGENT.....	201
3) FABRICATION DU CANAL MICROFLUIDIQUE.....	202
Partie 2 : fabrication des gouttes fonctionnalisées par des anticorps F(ab')₂ et des pièges microfluidiques	202
1) FABRICATION DES GOUTTES D'EMULSION AVEC DE L'HUILE CONTENANT DES PHOSPHOLIPIDES.....	202
2) FONCTIONNALISATION PAR DES F(AB') ₂ ET DE LA BSA	203
3) AJOUT D'ANTICORPS SECONDAIRES FLUORESCENTS.....	204
4) FABRICATION DES PIEGES MICROFLUIDIQUES	204
4.1) <i>Etapas de dessin</i>	204
4.2) <i>Préparation du wafer avec la résine photo-sensible</i>	205
4.3) <i>Ecriture directe avec la Dilase</i>	205
4.4) <i>Développement</i>	205
4.5) <i>Fabrication de la puce en PDMS</i>	206
5) GENERATION DE GOUTTES DE 14,4 µM DE DIAMETRE EN MICROFLUIDIQUE.....	206
Résumé	208

Préambule

Le manuscrit est composé de deux parties indépendantes. La première partie concerne l'utilisation de gouttes d'huile métallisées comme traceurs en micro vélocimétrie. La seconde traite de l'étude des phénomènes d'adhésion entre des gouttes fonctionnalisées par des anticorps et des cellules B.

Le travail concernant la première partie a été mené à l'ENS Chimie, durant les sept premiers mois de la thèse. Le travail concernant la seconde partie a été mené à l'Institut Pierre-Gilles de Gennes (IPGG) durant le reste du temps de la thèse.

Partie 1 : Utilisation de gouttes d'huile métallisées comme traceurs en micro vélocimétrie

Introduction générale

La mesure de vitesses de liquides dans des systèmes micrométriques a fait l'objet de nombreux travaux ces dernières années. Ces mesures présentent un outil pour mieux comprendre la physique des écoulements à petite échelle (vitesses de glissement, vitesses aux interfaces liquide/liquide), mais trouvent leur place également dans toutes les applications à la microfluidique comme la biologie et les méthodes de diagnostic en médecine.

La micro vélocimétrie est une méthode précise de mesure des vitesses dans des puces microfluidiques, consistant à mesurer la vitesse de particules fluorescentes dispersées dans le fluide en mouvement. Ces particules suivent les mouvements du fluide, et leur vitesse donne localement la vitesse du fluide.

Les particules utilisées en général en micro vélocimétrie sont des billes de polystyrène rendues fluorescentes par absorption de fluorophores. Elles présentent l'avantage d'avoir une densité proche de celle de l'eau. De plus, les suspensions vendues dans le commerce ont une distribution en taille quasi monodisperse. Néanmoins, les mesures de vitesses en lumière blanche avec ces billes sont difficiles car ces billes sont difficilement localisables en lumière blanche.

Nous proposons l'utilisation de gouttes métallisées pour la micro vélocimétrie. Ces gouttes sont à la fois absorbantes en lumière blanche, et possèdent une certaine fluorescence. Nous montrons que des mesures de vitesses sont réalisables à la fois en lumière blanches et en fluorescence. Pour cela, le profil de vitesse parabolique dans un canal de section rectangulaire est mesuré à la fois en lumière blanche et à la fois en fluorescence.

Nous présentons dans un premier temps le principe et les applications de la micro vélocimétrie. Nous comparons les différentes particules déjà utilisées pour la mesure de vitesse en microfluidique. Puis, nous décrivons le procédé de fabrication des gouttes métallisées et des canaux microfluidiques utilisés pour l'étude. Enfin, nous expliquons le principe des mesures que nous avons effectué et les résultats obtenus, en accord avec les prédictions théoriques.

I) Introduction à la mesure de vitesse de liquides dans des canaux microfluidiques

Le champ de vitesse dans une puce microfluidique peut être déterminé analytiquement ou par simulation numérique puisque les lois gouvernant le mouvement des fluides à cette échelle sont connues. Néanmoins, il existe des méthodes expérimentales largement répandues dans la communauté de la physique des liquides à l'échelle du micromètre. Elles sont utiles dans les cas où les lois des écoulements ne sont pas connues (souvent aux interfaces fluide-solide ou liquide-liquide) ou encore pour caractériser le champ de vitesse dans des puces microfluidiques aux géométries parfois complexes.

1) Techniques de micro vélocimétrie

En microfluidique, il existe des méthodes expérimentales donnant accès aux lignes de courant des vitesses et ainsi une idée de la direction des vitesses dans la puce. Ces méthodes reposent sur l'introduction de colorants solubles dans le milieu et présents de manière hétérogène. Le colorant va alors suivre l'écoulement, et sa forme finale, pour un écoulement stationnaire, représentera une ligne de courant. Cette méthode est utilisée par exemple par Stroock *et al.* [1] pour visualiser le mélange de deux liquides miscibles dans un canal microfluidique micro-structuré (voir Figure 1). Ici, nous présentons une méthode optique quantitative qui donne accès aux directions des vitesses dans l'espace mais aussi à leurs normes.

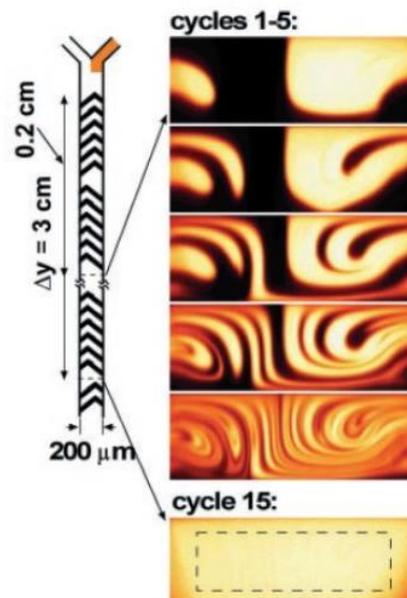


Figure 1. A gauche, schéma d'un canal microfluidique à deux entrées, développé par Stroock *et al.* [1] permettant le mélange de deux liquides miscibles. De l'eau est introduite dans le canal de gauche, et de l'eau contenant un colorant dans le canal de droite. Le canal principal, de section rectangulaire, possède une face avec une microstructure induisant une rotation des lignes de champ dans le plan de la section du canal. A droite, images en fluorescence dans le plan de la section du canal, montrant l'eau (en noir) et la solution contenant le colorant (en jaune). On constate bien une rotation des lignes de champ, favorisant le mélange de ces deux liquides miscibles. Schéma et images issues de Stroock *et al.* [1]

Cette mesure de vitesse de liquide à petite échelle s'inspire des techniques développées aux grandes échelles. En effet, le principe reste le même : suivre le mouvement de particules dispersées dans le fluide et, en supposant qu'elles sont transportées à la même vitesse que celui-ci, en déduire sa vitesse au niveau local. Aux grandes échelles, on parle de PIV pour Particle Image Velocimetry [2]. A petite échelle, il a été développée une méthode appelée PTV (pour Particle Tracking Velocimetry) qui consiste à suivre les particules individuellement et à déterminer leurs vitesses déduites de leurs positions en fonction du temps. Introduite en 1998 par Santiago *et al.* [3], la technique « micro PIV » permet de déterminer un champ de vitesse instantanée de plusieurs particules confinées dans un certain volume, en utilisant une corrélation d'image. Cette technique a pris un essor considérable depuis les 20 dernières années, en physique des fluides comme en biologie. Dans la suite, nous utiliserons le terme général de « micro vélocimétrie » qui regroupe à la fois micro PIV et PTV.

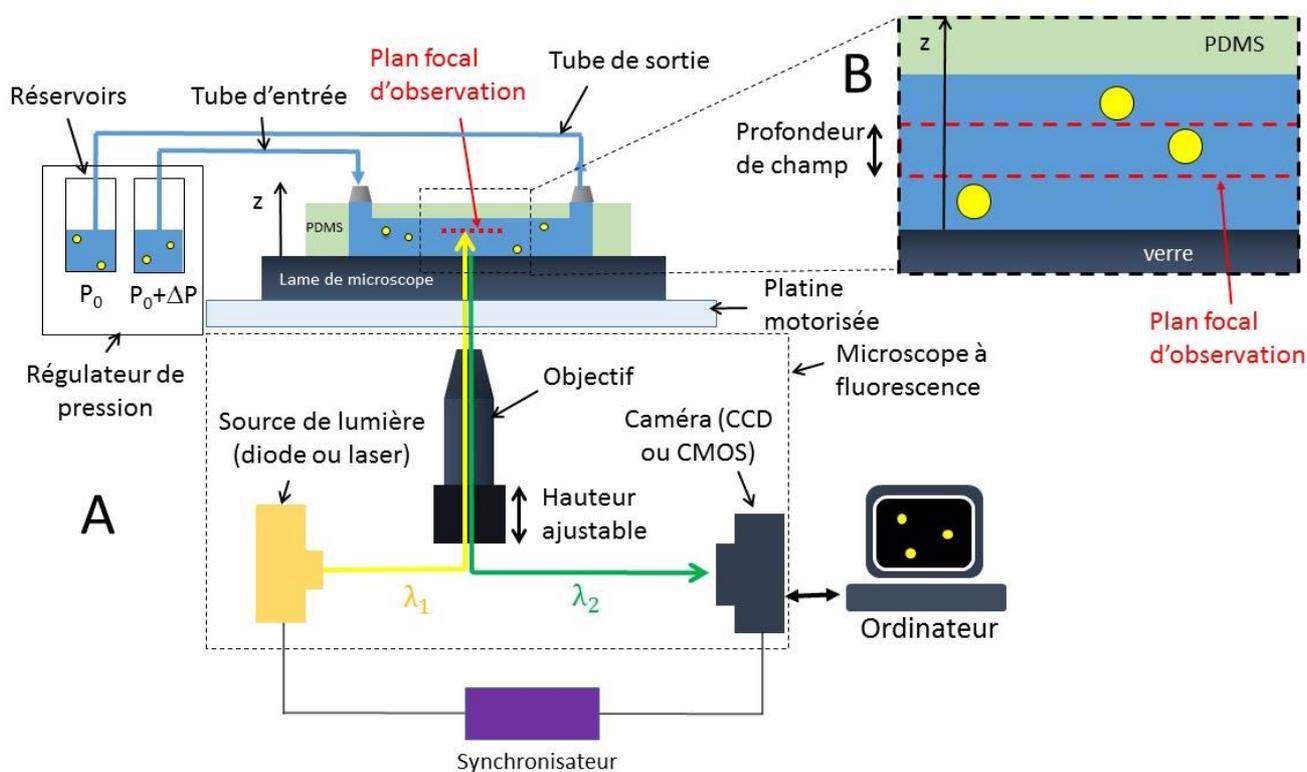


Figure 2. (A) Schéma représentant le dispositif expérimental d'une expérience de micro PIV [4]. La puce microfluidique est constituée d'un canal en PDMS collée sur une lame de verre. Le flux est imposé via un régulateur de pression avec une différence de pression entre l'entrée et la sortie du canal de ΔP . Le liquide contient des particules de polystyrène fluorescentes, typiquement de 500nm de diamètre, qui sont imagées avec un microscope à fluorescence. Selon l'application, une diode ou un laser peuvent être utilisés comme source de lumière. Les particules reçoivent une lumière de longueur d'onde λ_1 et émettent une lumière à une longueur d'onde plus élevée λ_2 qui est détectée par une caméra CCD ou CMOS. L'image est enregistrée par un ordinateur. La hauteur du plan focal peut être ajustée en variant la hauteur de l'objectif manuellement ou avec un piezo. Dans certaines expériences, un synchronisateur est utilisé pour que le laser et la caméra se déclenchent au même moment. Schéma reproduit d'après Lindken

et al. [4]. (B) Zoom du canal contenant le liquide avec les particules et montrant que le plan focal a une certaine épaisseur, la profondeur de champ.

Un dispositif expérimental typique de micro vélocimétrie est schématisé sur la Figure 2A [4]. L'objectif de l'expérience est d'établir une carte de vitesse dans un plan horizontal d'une puce microfluidique. La puce microfluidique est placée sur un microscope à fluorescence. Elle est constituée d'un canal en PDMS collé sur une lame de verre permettant ainsi l'observation par microscope. L'entrée et la sortie du canal sont connectées à un régulateur de pression qui impose une différence de pression ΔP , générant ainsi un flux constant à l'intérieur de la puce. Des particules fluorescentes ont été dispersées dans le liquide et sont visibles dans le plan focal du microscope. Elles reçoivent une lumière de longueur d'onde λ_1 et émettent une lumière de longueur d'onde λ_2 sélectionnée par un filtre et reçue par la caméra CCD ou CMOS. Ce procédé, propre au microscope à fluorescence, permet de visualiser seulement les particules et pas le canal, ce qui facilite l'analyse par la suite. L'image des particules dans le plan focal est finalement enregistrée par un ordinateur. Selon la vitesse du liquide, la source de lumière utilisée peut être une diode ou un laser pulsé, et dans le cas du laser celui peut se déclencher en même temps que la caméra à l'aide d'un synchronisateur.

Il faut noter ici que le plan focal a une certaine épaisseur, la profondeur de champ notée d , qui varie principalement selon l'ouverture numérique et le grossissement de l'objectif du microscope (Figure 2B). Plus l'ouverture numérique est grande, plus la profondeur de champ sera petite. En optique, la profondeur de champ est définie comme la distance suivant l'axe optique entre le plan objet le plus proche apparaissant net dans le plan image et le plan objet le plus éloigné apparaissant net dans le plan image. La formule de la profondeur de champ, pour un grossissement G et une ouverture numérique ON , s'écrit :

$$d = \frac{\lambda \cdot n}{ON^2} + \frac{n}{G \cdot ON} e$$

Avec λ la longueur d'onde, n l'indice optique du milieu et e la plus petite distance qui peut être résolue par un détecteur placé dans le plan image du microscope. Typiquement, pour un grossissement 100X et une ouverture numérique de 0,95, la profondeur de champ est de 0,2 μm .

Pour un profil de vitesse variant beaucoup selon la direction z (comme c'est souvent le cas en microfluidique), une profondeur de champ la plus petite possible est conseillée pour gagner en résolution. Ainsi on privilégie des ouvertures numériques supérieures ou de l'ordre de 1,0 pour une profondeur de champ inférieure au micron.

2) Notions de base d'analyse d'image pour la micro vélocimétrie

Pour déterminer une vitesse, il faut deux images des mêmes particules séparées par un intervalle de temps connu.

La taille typique L du champ d'une caméra va de 50 μm à 1 mm suivant le grossissement de l'objectif. Si l'on cherche à avoir la répartition spatiale des vitesses dans le plan focal, une manière de procéder consiste à découper l'image globale en sous-images comme indiqué sur la Figure 3A, formant ainsi un quadrillage ou un réseau de « fenêtres ». La taille de ces fenêtres doit

être assez grande pour contenir un nombre assez grand de particules et assez petite pour avoir une résolution spatiale élevée. Si le nombre de particules par fenêtre est trop petit, voire nul, on peut additionner des images globales séparées d'un temps assez long, dans le cas d'un écoulement stationnaire, ce qui augmente artificiellement le nombre de particules par fenêtre.

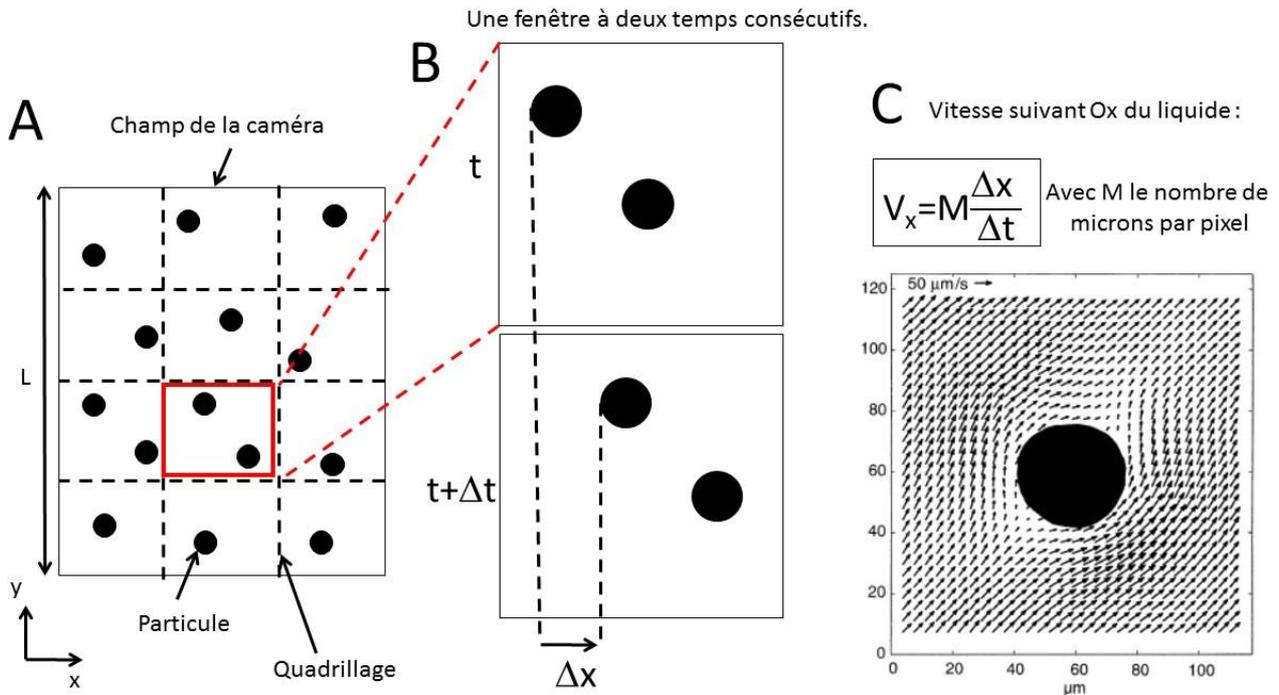


Figure 3. (A) Schéma d'une image prise par la caméra des particules fluorescentes présentes dans le plan focal. Suivant l'objectif utilisé, la taille d'une image peut aller de $50\mu\text{m}$ à 1mm . La taille typique des particules est de 500nm à $5\mu\text{m}$. Lors de l'analyse numérique, l'image est d'abord découpée en un quadrillage de sous-images appelées fenêtres. Schéma reproduit d'après Lindken *et al.* [4]. (B) Zoom d'une fenêtre aux temps t et $t + \Delta t$. Durant ce laps de temps, les deux particules présentes dans la fenêtre se sont déplacées de Δx . (C) La vitesse locale suivant Ox du fluide situé dans cette fenêtre vaut alors $V_x = M \frac{\Delta x}{\Delta t}$ où M est le nombre de microns par pixel. On peut généraliser le raisonnement à la direction Oy et obtenir un vecteur vitesse pour chaque fenêtre, construisant ainsi une carte de vitesse, comme ici pour l'écoulement d'un liquide autour d'un cylindre, d'après Santiago *et al.* [3].

Mais comme indiqué plus haut, une seule image ne suffit pas pour construire un vecteur vitesse, il faut prendre deux images séparées par un intervalle de temps Δt connu, assez petit pour retrouver les mêmes particules dans la fenêtre (Figure 3B). Selon la vitesse des particules dans le canal et la taille des fenêtres, cet intervalle de temps Δt peut varier de quelques microsecondes pour des vitesses de 10mm/s à quelques dizaines de millisecondes pour des vitesses de $100\mu\text{m/s}$. Dans le cas d'intervalle de temps très courts de l'ordre de quelques microsecondes, des lasers pulsés sont utilisés. Outre leur rapidité, ils émettent une lumière plus intense que les diodes ou lampes UV et permettent une visualisation plus facile des particules fluorescentes en mouvement. Ils sont en général déclenchés en même temps que la caméra à l'aide d'un synchronisateur ce qui permet une connaissance précise de Δt .

Lors de cet intervalle Δt , les particules présentes dans la fenêtre se sont déplacées d'une distance Δx suivant la direction Ox et Δy selon la direction Oy (Figure 2B). Leur vecteur vitesse locale peut alors s'écrire :

$$V = M \frac{OM}{\Delta t}$$

avec $OM = \Delta x \mathbf{U}_x + \Delta y \mathbf{U}_y$ vecteur déplacement des particules et M le nombre de micromètres par pixel. Le déplacement des particules est déterminé par corrélation des deux images successives. Un vecteur vitesse est alors attribué à chaque fenêtre du champ global, formant ainsi une carte de vecteurs vitesses dans le plan focal. Un exemple d'une telle carte est montré Figure 3C dans le cas d'un écoulement à deux dimensions d'un liquide autour d'un cylindre [3].

3) Choix des particules pour la micro vélocimétrie

Le choix des particules pour la micro vélocimétrie est important car la mesure porte sur leur déplacement dans le liquide étudié. La première condition est que les particules suivent le liquide dans son mouvement. Pour cela, les particules doivent avoir une densité proche du liquide ou doivent être assez petites pour que leur mouvement brownien l'emporte sur l'action de la pesanteur. Les particules doivent avoir toutes la même taille pour capter le même nombre de ligne de champ.

Les particules doivent également former une dispersion stable dans le liquide étudié (pas de formation d'agrégats). Cette condition dépend du matériau constituant les particules et de l'état de surface de celles-ci. Le Tableau 1 regroupe la plupart des particules utilisées en tant que traceurs.

Pour les applications à la micro vélocimétrie, les particules (ou « billes ») de polystyrène sont couramment utilisées. Elles ont l'avantage d'avoir une densité proche de celle de l'eau ($1,05 \text{ g.cm}^{-3}$) et leur taille peut varier de 100 nm à quelques micromètres avec une monodispersité inférieure à 3 % pour un diamètre de 1 μm (source : Fluorescebrite). Elles sont fabriquées par polymérisation du styrène dans des conditions qui favorisent la formation spontanée de particules (source : Sigma-Aldrich). A l'issue de la réaction de polymérisation, les particules portent à leur surface des groupements sulfates assurant une certaine stabilité de la dispersion. Des groupements carboxylate ou amine peuvent également être greffés. L'ajout de surfactants dans la solution permet de favoriser la stabilité de la dispersion.

Il est à noter que les particules de polystyrène dispersées dans une solution aqueuse ne sont pas constituées majoritairement de polymère (30 %) mais plutôt d'eau (>69%). Les indices de réfraction assez proches du polystyrène et de l'eau (respectivement 1,59 et 1,33 à 589 nm) font que ces particules sont difficilement détectables en microscopie en lumière blanche. Néanmoins, elles peuvent être rendues fluorescentes par imprégnation en volume d'un fluorophore (source : Fluorescebrite) (il existe un large choix de couleur sur le marché), ce qui facilite grandement leur détection en microscopie à fluorescence (elles apparaissent blanches sur fond noir).

Matériau	Taille typique (µm)	Variation standard pour la taille (µm)	Densité (g.cm ⁻³)	Indice de réfraction à 589 nm
Polystyrène	0,1 à 5	<0,05	1,05	1,59
Carbure de silicium	1,5	1,4	3,2	2,65
Dioxyde de titane	3 à 5	-	4,2	2,6
Coating métallique	9	4 à 12	2,6	0,2+2,6i
Nylon	4	1,5	1,14	1,53
Verre	8 à 12	-	1,05 à 1,15	1,5

Tableau 1. Caractéristiques des matériaux utilisés pour fabriquer des traceurs. Pour chaque matériau, la taille typique (avec la variation standard) des particules est donnée, leur densité et leur indice de réfraction. [Source : <http://www.tsi.com/ProductView.aspx?id=22683>].

Le carbure de silicium, le dioxyde de titane et les particules métallisées semblent être de bons candidats pour des traceurs en solution aqueuse puisqu'ils possèdent un indice de réfraction plus grand que celui de l'eau (respectivement 2,65 , 2,6 et > 2,6) mais ils sont trop denses (densité respective de 3,2 , 4,2 , >2,5) et les particules fabriquées trop polydisperses en taille. A l'inverse, le nylon et le verre ont des indices de réfraction proches de celui de l'eau (respectivement 1,53 , 1,5) et des densités proches de celle de l'eau (1,14 , 1,05 à 1,15). Ici encore, la monodispersité en taille n'est pas très bonne (40 % pour les particules de nylon).

La taille des particules est un critère important. Pour avoir une bonne résolution spatiale, les particules doivent être suffisamment petites devant la taille caractéristique de l'écoulement (taille du canal,...). La taille minimale est limitée par le mouvement brownien qui intervient dès que les particules font moins de 1µm. Pour évaluer l'influence du mouvement brownien sur la trajectoire d'une particule, on peut comparer la longueur caractéristique des fluctuations thermiques $\langle s^2 \rangle^{1/2}$ au déplacement Δx convectif des particules, comme l'a fait Santiago *et al.* [3] :

$$\varepsilon = \frac{\langle s^2 \rangle^{1/2}}{\Delta x} \sim \frac{1}{V} \sqrt{\frac{D}{\Delta t}}$$

avec D le coefficient de diffusion de la particule dans le liquide. Pour des particules de 1µm dans l'eau, le coefficient de diffusion vaut typiquement $D \sim 10^{-12}$ m²/s. Si on prend par exemple $V \sim 1$ mm/s et $\Delta t \sim 10$ ms ($\Delta x = 10$ µm), on obtient $\varepsilon \sim 10^{-2}$. Dans ce cas-là, le mouvement brownien est négligeable devant le mouvement convectif des particules.

Les particules utilisées sont fluorescentes pour une meilleure visualisation. Elles apparaissent à l'écran comme des points blancs sur fond noir, ce qui facilite l'analyse par la suite.

Pour les particules dont la taille est de l'ordre de la longueur d'onde de la source de lumière, il est à noter que l'intensité lumineuse captée par la caméra est la combinaison de l'image géométrique de la particule et de la tache de diffraction, ce qui élargit légèrement l'image captée.

4) Ecoulement dans un canal de section rectangulaire

L'objet de notre travail consiste à valider l'utilisation de gouttes métallisées en surface comme traceurs pour la micro vélocimétrie. Pour cela, nous allons montrer qu'il est possible de mesurer le profil de vitesse d'un liquide dans un canal microfluidique de section rectangulaire. On donne dans ce paragraphe l'expression mathématique de la vitesse attendue d'un liquide dans un canal rectangulaire pour un écoulement laminaire (nombre de Reynolds très inférieur à 1).

Le canal de longueur L , hauteur h et largeur w , est représenté Figure 4A. Il est rempli d'un liquide newtonien (comme l'eau par exemple). Un flux stationnaire est généré par une différence de pression constante ΔP entre l'entrée et la sortie du canal. La vitesse du fluide est supposée dirigée selon l'axe Ox (parallèle à l'axe du canal). Sans faire d'hypothèses sur les dimensions h et w , la vitesse V s'écrit en termes de série de Fourier (source : « Introduction to Fluid Dynamics for Microfluidic Flows », H. Stone, 2007) :

$$V_{3D}(y, z) = \frac{\Delta P}{2\mu L} \left\{ \left[\left(\frac{h}{2} \right)^2 - z^2 \right] - \sum_{n=0}^{\infty} a_n \cos \left(\frac{(2n+1)\pi}{2} \cdot \frac{2z}{h} \right) \cosh \left(\frac{(2n+1)\pi}{2} \cdot \frac{2y}{h} \right) \right\}$$

avec μ la viscosité dynamique du liquide. Dans la condition de non-glissement aux parois solides, les coefficients a_n s'écrivent :

$$a_n = \frac{(-1)^n h^2}{\left[\frac{(2n+1)\pi}{2} \right]^3 \cosh \left(\frac{(2n+1)\pi}{2} \cdot \frac{w}{h} \right)}$$

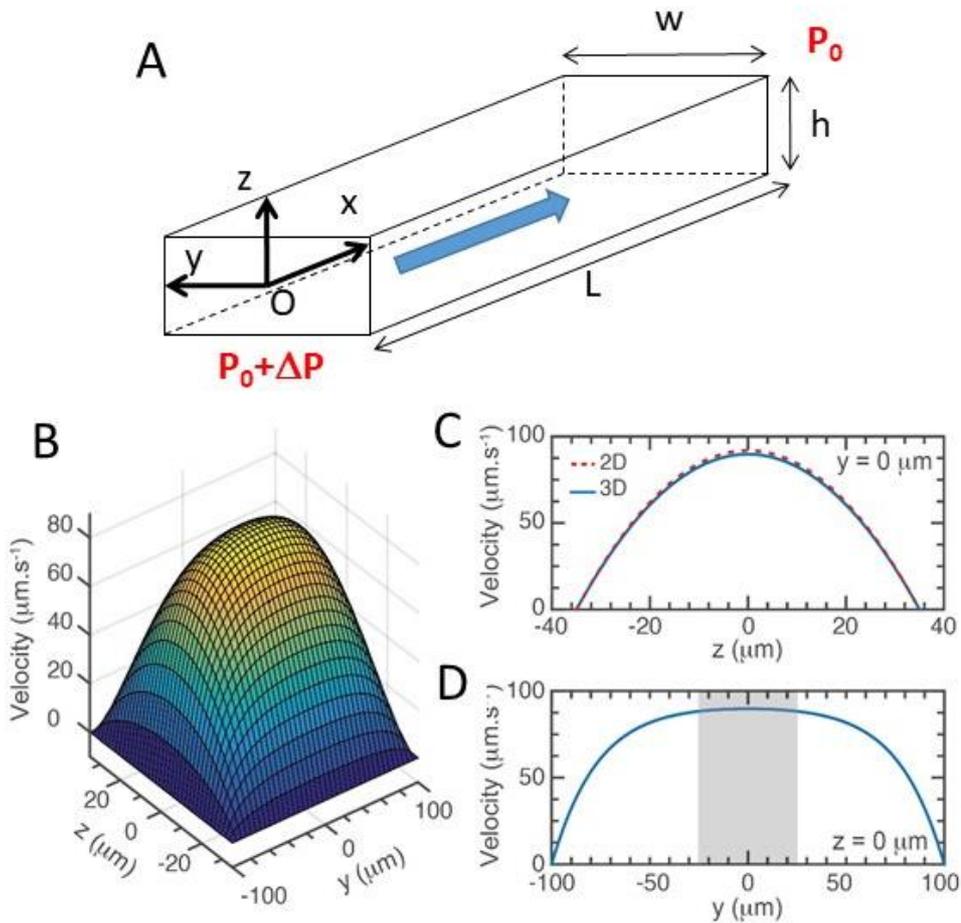


Figure 4. (A) Schéma du canal de section rectangulaire de longueur (L) = 2 cm, de hauteur (h) = 70 μm et de largeur (w) = 200 μm . Une différence de pression ΔP est appliquée entre l'entrée et la sortie, générant ainsi un flux laminaire et stationnaire. (B) Profil de vitesse à trois dimensions dans le canal de notre expérience (mêmes dimensions géométriques) suivant les équations (3) et (4) avec $n = 5$. La différence de pression est de 3 Pa. (C) Courbe représentant en bleu la vitesse évaluée dans le plan ($y = 0$) du profil de vitesse 3D de (B). La courbe en pointillée et en rouge représente le profile parabolique de vitesse dans le cas où la largeur du canal est très grande devant sa hauteur ($w > 10 \times h$). (D) Profil de vitesse évalué selon le plan ($z = 0$) d'après le profil de vitesse 3D en (C). La zone foncée représente la largeur f_y du champ d'observation. Sur cette longueur, la variation de vitesse est de 2 % selon Oy .

Pour simplifier l'analyse et écrire la vitesse V en fonction de z seulement, on suppose que la hauteur h est négligeable devant la largeur w , et donc que le système est équivalent à une chambre de Hele-Shaw. Dans ces conditions, la vitesse V dans le canal est gouvernée par l'équation de Stokes qui s'écrit :

$$\frac{\partial P}{\partial x} = \mu \frac{\partial^2 V}{\partial z^2}$$

L'intégration de cette équation, avec la condition de non glissement aux parois ($V = 0$ pour $z = 0$ et $z = h$), donne une relation pour $V(z)$ qui s'écrit :

$$V(z) = \frac{\Delta P}{2\mu L} z(h - z)$$

On en déduit l'expression de la vitesse maximale V_{max} du liquide dans le canal :

$$V_{max} = \frac{h^2}{8\mu L} \Delta P = \frac{3}{2whR} \Delta P$$

où

$$R = \frac{12\mu L}{wh^3}$$

correspond à la résistance hydrodynamique du canal. Avec les dimensions de notre canal, nous trouvons $R = 0,63 \text{ mbar} \cdot \text{min} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

La Figure 4B montre le profil 3D de $V_{3D}(y, z)$ en prenant les dimensions de notre canal et une différence de pression $\Delta P = 3 \text{ Pa}$. A partir de cette courbe 3D, nous traçons le profil de vitesse dans le plan défini par $y = 0$ (Figure 4C, ligne continue), qui est comparée au profil de vitesse parabolique $V(z)$ (ligne pointillée). La différence de vitesse maximale est d'environ 2 % ce qui justifie l'approximation du profil parabolique.

5) Applications

La micro vélocimétrie est un outil utilisé en physique fondamentale mais aussi dans de nombreuses applications en microfluidique comme la caractérisation et l'optimisation du mélange, des écoulements électro cinétiques, des écoulements bi-phasiques ou encore des écoulements biologiques.

En physique fondamentale, la mesure de vitesse à petite échelle a servi à sonder les interactions fluide-structure proches des surfaces solides. Joseph et Tabeling [5] par exemple ont étudié l'hypothèse de non glissement pour du verre avec une méthode de micro vélocimétrie résolue suivant l'axe Oz. En supposant une vitesse nulle du fluide à la surface solide d'un canal microfluidique, Silva *et al.* [6] ont déduit la position de la surface avec une précision de quelques nanomètres près. Rossi *et al.* [7] ont étendu cette technique à une couche de cellules endothéliales cultivées dans une puce microfluidique. Les auteurs ont mesuré le champ de vitesse au niveau de la couche de cellules (Figure 5B (i)) et en ont déduit la topographie de cette couche de cellules endothéliales de manière non invasive (Figure 5B (ii)).

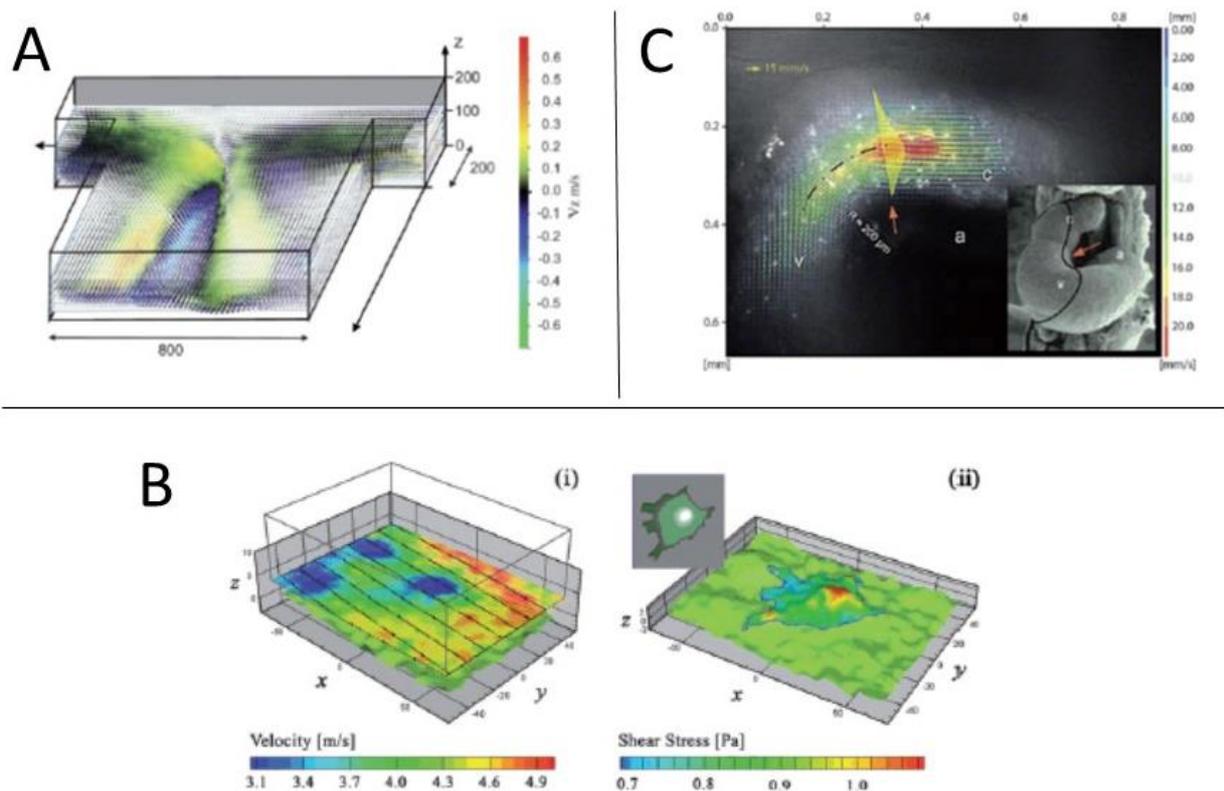


Figure 5. (A) Reconstruction 3D du champ de vitesse dans une jonction T pour un écoulement laminaire et stationnaire. Les vitesses contenues dans le plan horizontal sont indiquées par des vecteurs et celles dirigées selon l'axe z suivent un code couleur (image issue de [8]). (B) Application à la micro PIV à des cellules endothéliales cultivées dans un canal microfluidique. (i) Champ de vitesse 2D au niveau des cellules déterminé par micro PIV. (ii) Le champs de vitesse est utilisé pour reconstruire la topographie de surface de la couche de cellules et la distribution du cisaillement sur une cellule individuelle (encadré gris) (images issues de [7]). (C) Distribution de vitesse du sang dans le ventricule d'un embryon de poulet après trois jours d'incubation (images issues de [9]).

En microfluidique, le mélange de deux liquides miscibles est difficile à cause du fait que les écoulements sont laminaires. Le mélange par convection n'est donc pas possible, seule diffusion permet le mélange. Pour cela il a été développé des systèmes qui augmentent la surface de contact entre les deux liquides : jonctions en T ou encore des canaux à la surface texturée [1] qui fait tourner les deux liquides dans le canal et forme des couches qui se juxtaposent et s'amincissent jusqu'à ce que la diffusion ait un effet sur le mélange. De tels écoulements peuvent être étudiés par simulation ou expérimentalement par micro vélocimétrie, comme l'a fait Lindken *et al.* [8] dans le cas d'une jonction en T (Figure 5A) en mesurant le champ de vitesse en trois dimensions à l'intersection où arrivent les deux liquides.

Il est à noter que les écoulement électrocinétiques en microfluidique peuvent être caractérisés par micro vélocimétrie, en mesurant la vitesse des particules initialement dans le système [10].

Des informations intéressantes peuvent être déduites de mesures de vitesses dans des milieux biologiques. Par exemple, de nombreuses expériences *in vitro* sont menées pour comprendre l'action mécanique du cisaillement du fluide sur des cellules adhérentes. Rossi *et al.*

[7] ont déterminé, à partir de mesures de vitesses par micro PIV, la distribution du cisaillement exercé sur une cellule endothéliale individuelle dans un canal microfluidique (Figure 5B (ii)). Des méthodes pour étudier la rhéologie du sang ont été développées [11] basées sur la mesure de vitesses des globules rouges et du plasma sanguin.

In vivo, la micro vélocimétrie présente l'intérêt d'être faiblement invasive car basée sur une méthode optique. Des mesures de vitesses ont été faites *in vivo* comme par exemple dans les artérioles mésentériques de rat [12] ou dans un ventricule d'un embryon de poulet [9] (Figure 5C).

II) Utilisation de gouttes métallisées comme traceurs en micro vélocimétrie

1) Principe de l'expérience

Dans la partie I), nous avons vu que les particules de polystyrène fluorescentes présentent de nombreux avantages comme traceurs en micro vélocimétrie. En effet, elles possèdent une densité proche de celle de l'eau ($1,04 \text{ g.cm}^{-3}$), elles sont facilement détectables par microscopie de fluorescence, et sont facilement trouvables sur le marché avec des tailles variant de 100nm à quelques micromètres avec une bonne monodispersité (<15%). Ces particules présentent par contre l'inconvénient d'être utilisables qu'en fluorescence car elles restent peu visibles en lumière blanche pour des applications à la micro vélocimétrie.

Dans notre laboratoire, Nocera *et al.* [13] ont développé en 2014 une méthode de fabrication de gouttes d'huile recouvertes d'une fine couche d'argent. Les gouttes d'huiles de 5 - 6 μm sont d'abord recouvertes d'une couche d'un polymère (polydopamine) puis sur cette couche solide est formée une couche d'argent de 50 nm d'épaisseur environ par un processus de réduction. Il se trouve que ces particules présentent une certaine fluorescence. De plus, elles absorbent la lumière blanche grâce à leurs coquilles métalliques ce qui les rend bien visibles en lumière blanche. Leur densité peut être ajustée en ajustant l'épaisseur de la couche d'argent de manière à ce que le poids de l'huile et de l'argent se compensent.

Le travail des sept premiers mois de thèse a consisté à montrer que ces particules pouvaient être utilisées comme traceurs pour des expériences de micro vélocimétrie. Dans la partie II) nous présentons la manière dont ces particules sont fabriquées puis nous validons leur utilisation comme traceurs en mesurant le profil de vitesse de l'eau dans un canal rectangulaire, comparable à celui obtenu avec des particules de polystyrène.

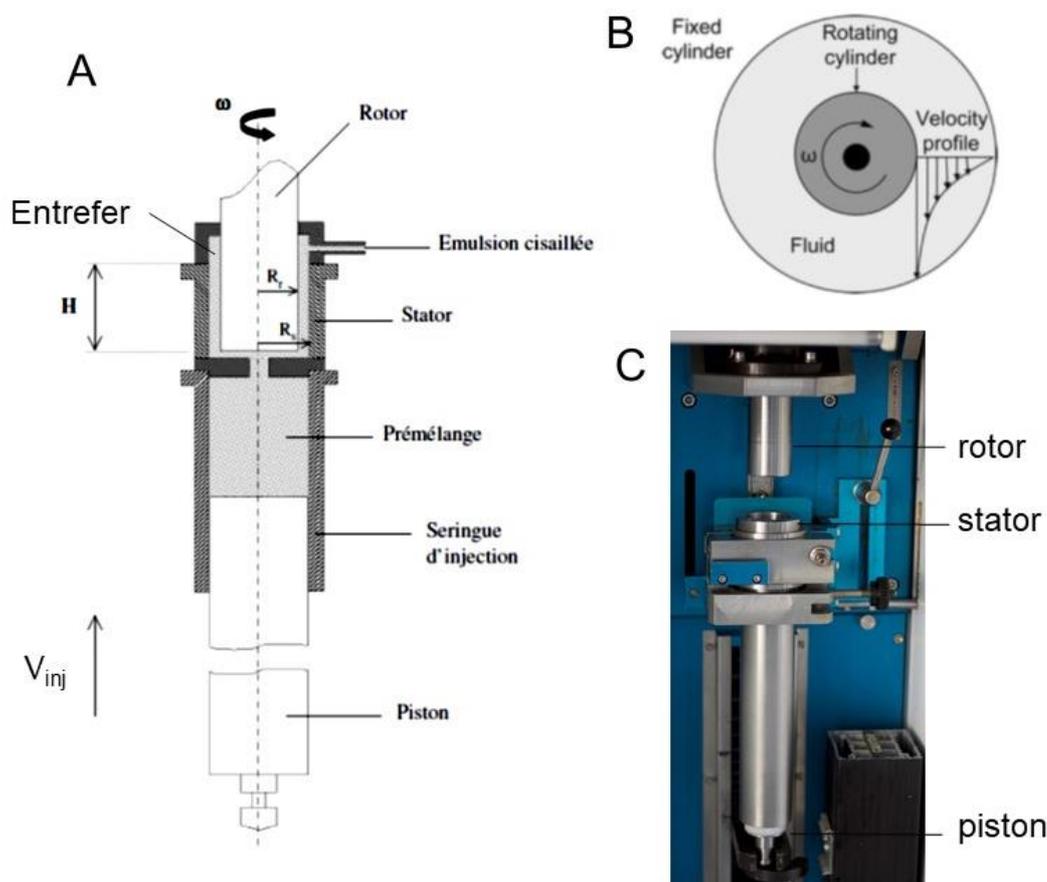
Nous détaillons dans le paragraphe suivant le protocole mis en œuvre pour la fabrication des gouttes recouvertes d'argent et celui utilisé pour fabriquer les canaux microfluidiques.

2) Protocoles et instrumentation

Le surfactant Poloxamer F-68 provient de Croda France SAS. L'alginate de sodium a été acheté chez Sigma-Aldrich. De l'eau ultra-pure (Millipore, 18,2 M Ω /cm) a été utilisée pour toutes les expériences. Tous les produits chimiques utilisés pour la préparation de l'émulsion métallisée ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Les particules de polystyrène (DragonGreen, diamètre de 0,51 μ m) ont été achetées chez Polyscience.

2.1) Fabrication de l'émulsion

Les gouttes d'huile sont issues d'une émulsion d'huile de soja dans l'eau. Pour fabriquer l'émulsion, nous mélangeons manuellement 15 g d'huile de soja avec une solution aqueuse contenant 2,5 g de surfactant (Poloxamer F-68 en proportion initiale de 30 % w/w) et 2,5 g d'un agent épaississant (alginate de sodium, proportion initiale de 4 % w/w).



Cette première émulsion polydisperse est ensuite cisailée et rendue quasi-monodisperse dans une cellule de Couette sous un taux de cisaillement contrôlé (5000 s^{-1}), suivant la méthode développée par Mason *et al.* [14]. La Figure 6A montre un schéma de la cellule de Couette, constituée d'un rotor tournant à la vitesse angulaire ω et d'un stator fixe. L'écartement entre rotor et stator, appelé entrefer, est de $100 \mu\text{m}$. Le pré-mélange subit dans cet entrefer un cisaillement constant. La Figure 6B montre un schéma du rotor et du stator vus de haut, ainsi que le profil de vitesse dans l'entrefer, correspondant à un cisaillement constant. La Figure 6C montre une photo de la cellule de Couette du laboratoire.

Avant décantation, l'émulsion est diluée de manière à avoir une proportion de 1 % w/w de Poloxamer F-68 et 5 % w/w d'huile. Après plusieurs étapes de décantation et rinçage avec une solution de Poloxamer F-68 pour enlever les très petites gouttes, l'émulsion est stockée dans une chambre à température régulée à $12 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2) Ajout des couches de polydopamine et d'argent

Pour l'ajout des couches de polydopamine et d'argent, nous avons suivi le protocole de Nocera *et al.* [13] en ajustant empiriquement la quantité d'argent de manière à obtenir des particules de même densité que l'eau. Les principales étapes du protocole sont résumées sur la Figure 7.

La crème de l'émulsion est rincée deux fois avec une solution tampon Tris (pH = 8,5, 20 mM) contenant un surfactant (Tween 20, proportion initiale de 0,2 % w/w dans la solution tampon Tris). Pour faire ce rinçage, $70 \mu\text{L}$ de l'émulsion est mélangée à $200 \mu\text{L}$ de solution tampon de Tris-Tween, le mélange est centrifugé à 4000rpm pendant 30 sec et la phase aqueuse est retirée avec une micro pipette ($200 \mu\text{L}$). Pour la couche de polydopamine, $70 \mu\text{L}$ de l'émulsion rincée est dispersée dans $100 \mu\text{L}$ d'une solution de dopamine (concentration initiale de 5 mg/mL dans la solution de Tris-Tween) et $85 \mu\text{L}$ de Tris-Tween solution est ajoutée. Ensuite, $5 \mu\text{L}$ de solution de permanganate de potassium est ajoutée (KMnO_4 , concentration initiale de 40 mg/mL dans de l'eau) pour permettre la transformation de la dopamine en polydopamine à la surface des gouttes. La solution est homogénéisée avec un rotor (60 rpm) pendant deux heures à température ambiante et isolée de la lumière. Pour enlever les molécules qui n'ont pas réagi, l'échantillon est rincé deux fois comme décrit plus haut, en utilisant $180 \mu\text{L}$ de la solution de Tris-Tween.

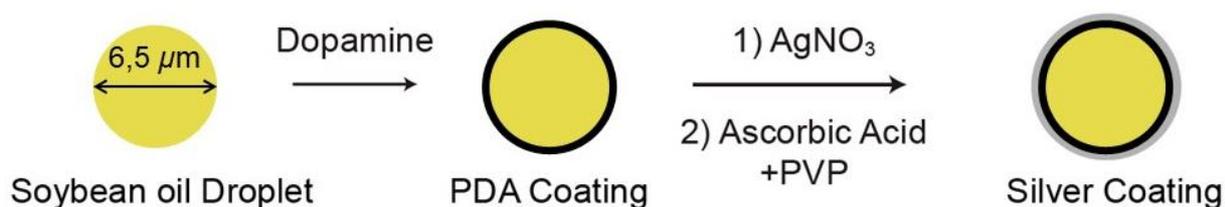


Figure 7. Schématisation des étapes de fabrication des émulsions métallisées. Les gouttes d'huile de $6,5 \mu\text{m}$ de diamètre sont dispersées dans une solution aqueuse de dopamine. La dopamine polymérise à la surface des gouttes formant ainsi une couche de polymère solide (polydopamine). L'introduction du nitrate d'argent conduit à l'adsorption des ions argent sur la couche de polydopamine. L'addition d'acide ascorbique, un agent réducteur,

et de PVP, un polymère dont le rôle est de stabiliser la dispersion, donne finalement des gouttes recouvertes d'une couche d'argent solide. Schéma reproduit d'après Nocera *et al.* [13].

Puis les gouttes sont recouvertes d'une couche d'argent par un processus d'oxydo-réduction. Pour cela, les gouttes sont dispersées dans 50 μ L d'une solution de nitrate d'argent (AgNO_3 , concentration initiale de 18 mg/mL dans la solution de Tris-Tween). La solution obtenue est homogénéisée avec un rotor (60rpm) pendant 90 min à température ambiante et isolée de la lumière. Dans cette dispersion de 50 μ L, 150 μ L d'une solution d'acide ascorbique sont ajoutés. La solution d'acide ascorbique a une concentration initiale de 15,5 mg/mL dans la solution de Tris-Tween contenant en plus un surfactant (polyvinylpyrrolidone, proportion initiale de 0,02 % w/w dans la solution de Tris-Tween).

2.3) Fabrication du canal microfluidique

Les puces sont faites en PDMS (polydiméthylsiloxane) en utilisant les techniques standard de lithographie [15]. Nous fabriquons des moules de résine SU-8 (SU-8 3050, Microchem) sur des supports de silicium, puis nous moulons le PDMS dessus et chauffons à 80°C pendant deux heures. Nous utilisons le PDMS RTV 615 avec un ratio 1 : 10 d'agent réticulant (RTV 615, Momentive Performance Materials). Nous traitons la surface de PDMS et la lamelle de verre (VWR, 50 \times 24mm) avec un plasma à air (300 mTorr, 40 s) avant de coller les deux parties de la puce. Le canal microfluidique est ensuite connecté avec des tubes à deux petits béchers utilisés pour imposer une pression hydrostatique. Les dimensions du canal sont : largeur (w) = 200 μ m, hauteur (h) = 65 – 70 μ m et longueur (L) = 2 cm.

2.4) Microscopie

Les images en lumière blanche et fluorescence sont acquises par un microscope Zeiss Axio Observer Z1 (Oberkochen, Allemagne) connecté à une caméra sCMOS Flash 2.8 (Hamamatsu Photonic, Japon). L'épi-fluorescence a été faite avec une lampe aux halogénures métalliques (HXP 120 L) et un filtre GFP (longueur d'onde d'excitation : 470 nm, longueur d'onde d'émission : 525 nm). Toutes les images ont été prises avec un objectif 100X à huile (ouverture numérique : 1.25). Les temps d'exposition ont été respectivement pris à 50 ms et 80 ms en lumière blanche et en fluorescence.

2.5) Simulation numériques et analyse d'images

Les analyses numériques ont toutes été faites avec le logiciel Mathworks Matlab.

3) Résultats et discussion

3.1) Les gouttes d'huile métallisées fluorescentes et absorbantes

Les gouttes issues d'une émulsion d'huile dans l'eau sont premièrement recouvertes d'une couche de polydopamine puis d'une couche d'argent selon le protocole de fabrication récemment développé par Nocera *et al.* [13], adapté dans le cadre de l'étude. Les gouttes monodisperses d'huile de soja sont premièrement dispersées dans une solution aqueuse oxydante et alcaline de dopamine. La dopamine polymérise à la surface des gouttes [16]. Après l'addition de nitrate d'argent, les ions argent sont adsorbés à la surface de la couche de polydopamine. L'addition d'acide ascorbique, un agent réducteur, et de PVP, un polymère stabilisateur, mène à des gouttes recouvertes d'une couche d'argent. A la différence de Nocera *et al.*, nous avons ajusté la concentration en nitrate d'argent pour obtenir des particules métallisées avec une densité proche de celle de la phase aqueuse, cela nous étant indiqué par le fait que les particules ne remontaient pas à la surface ni ne sédimentaient après quelques heures dans la solution dans laquelle elles étaient suspendues.

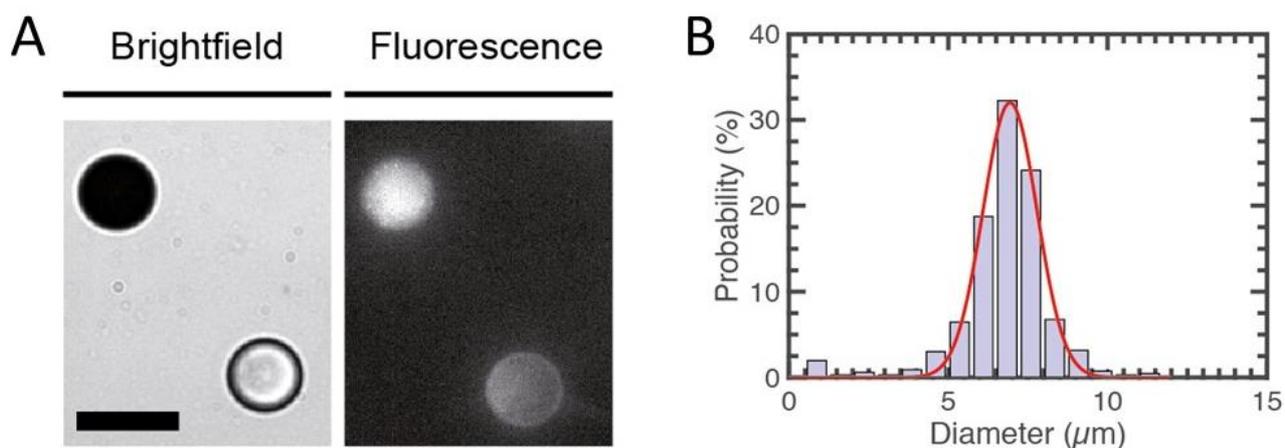


Figure 8. (A) Images au microscope de gouttes en lumière blanche (image de gauche) et en fluorescence (image de droite). (B) Distribution du diamètre des gouttes métallisées à l'issue de leur fabrication. La forme de la distribution a été ajustée par une gaussienne dont le pic est centré à 6,5 µm avec un écart type de 1,5 µm. Images et distribution issues de Nocera *et al.* [13].

Les déplacements des gouttes recouvertes d'argent ont été enregistrés en utilisant un microscope en lumière blanche (Figure 8A sur la gauche) et en épi fluorescence (Figure 8A sur la droite). Sur les images en lumière blanche, les particules apparaissent noires sur fond blanc, alors qu'en fluorescence, elles apparaissent blanches sur fond noir comme Nocera *et al.* ont montré que les gouttes recouvertes d'argent ont des propriétés de luminescence. Dans chacun des cas, elles sont facilement localisables par microscopie.

La population de gouttes recouvertes d'argent a un diamètre, mesuré par microscopie, de $6,5 \pm 1,5$ µm (voire la distribution des diamètres sur la Figure 8B). Après fabrication, la suspension finale a une concentration volumique en gouttes de 10 %, une viscosité similaire à

celle de l'eau (coule de la même manière) et est utilisée pour des expériences de micro PIV sans étape supplémentaire de rinçage.

3.2) Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est illustré Figure 9A. Pour les expériences de micro vélocimétrie, nous avons fabriqué une puce en PDMS collée sur une lamelle de verre (voir une photo sur la Figure 9C) en utilisant les techniques de lithographie douce (voir le paragraphe Protocoles et instrumentation). Une photo de notre puce placée sur le microscope est montrée Figure 5B. Les tubes et le canal sont remplis avec la solution contenant les particules. Le débit est contrôlé en fixant une différence de pression hydrostatique entre l'entrée et la sortie du canal, la résistance hydrodynamique des tubes étant négligeable devant celle du canal. La chute de pression ΔP entre les deux réservoirs est fixée par la différence de hauteur Δh contrôlée par une platine de translation de précision (0,02 mm de précision). L'échelle de pression typique est $\Delta P = \rho g \Delta h = 1 - 10$ Pa (avec ρ la densité de l'eau et g la gravité) obtenue avec $\Delta h = 0,1 - 1$ mm et correspondant à une vitesse maximale de l'ordre de $100 \mu\text{m/s}$. L'évaporation du liquide dans les réservoirs est négligeable. La diminution du débit due à l'évolution des niveaux de liquides dans les béchers pendant l'expérience est négligeable. La puce est placée sur la platine d'un microscope inversé, les séries d'image en lumière blanche et épi fluorescence étant enregistrées avec une caméra sCMOS.

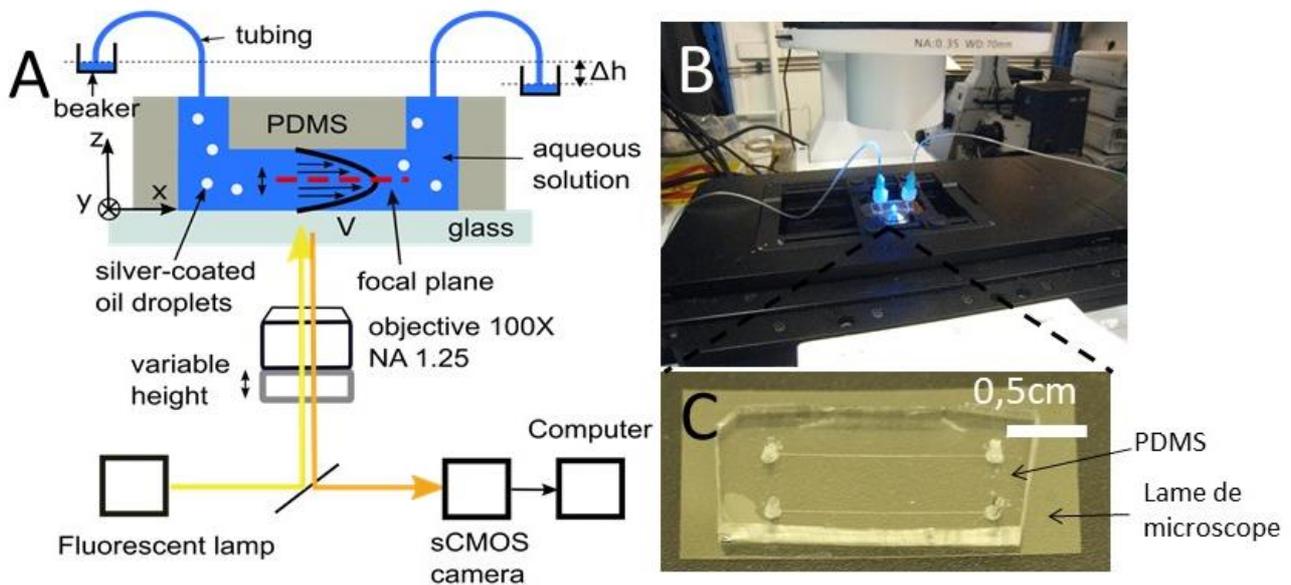


Figure 9. Schéma de notre expérience de micro PIV avec nos gouttes recouvertes d'argent. Le canal à section rectangulaire décrit plus haut et contenant la dispersion de particules est placé sur un microscope à fluorescence. L'entrée et la sortie du canal sont reliées par des tubes à deux petits béchers. Leur différence de hauteur Δh (de l'ordre de 0,3 mm) permet de fixer une pression hydrostatique (de l'ordre de 3 Pa) qui génèrent un flux constant (de l'ordre de $4 \mu\text{L/hr}$). Les particules sont observées dans le plan focal en lumière blanche et en fluorescence. La hauteur du plan focal peut balayer tout le canal grâce à la hauteur variable de l'objectif (variation manuelle avec une précision de $0,1 \mu\text{m}$). L'objectif utilisé possède

un grossissement 100X et une ouverture numérique (NA) de 1,25. Nous avons utilisé comme source de lumière une diode et une caméra sCMOS. Les couples d'images sont enregistrés par un ordinateur puis analysés. (B) Photo d'une de nos puces microfluidiques connectée aux tubes d'entrée et de sortie et reposant sur la platine d'un microscope. (C) Photo d'une puce microfluidique utilisée pour l'expérience. La partie haute du canal est en PDMS (trois murs du haut) et la partie basse en verre (lame de microscope) permettant ainsi l'observation par microscopie.

Notons que nous sommes limités pour la vitesse maximale du fluide dans le canal par le temps d'acquisition de la caméra (50 ms en lumière blanche et 80 ms en fluorescence), et par la largeur du champ de la caméra pour l'objectif 100X (de l'ordre de 50 μm). L'emploi de l'objectif 100X d'ouverture numérique 1,25 est nécessaire ici de manière à avoir une profondeur de champ assez faible pour observer les gouttes sur une tranche optique très fine (de l'ordre de 0,2 μm , se reporter au calcul plus haut).

3.4) Mesure de la vitesse

Les dimensions de la fenêtre d'observation du microscope ($f_x \times f_y = 50 \mu\text{m}^2 \times 70 \mu\text{m}^2$) sont fixées par le grossissement de l'objectif et la taille du détecteur CMOS de la caméra. Comme indiqué sur la Figure 10A, nous avons choisi de placer la fenêtre d'observation au centre du canal étant donné que la vitesse du liquide ne varie pas beaucoup dans cette zone. La Figure 4D montre en effet que dans la partie centrale du profil qui correspond à la largeur de la fenêtre f_y , la variation de la vitesse est de 2 % comparée à sa valeur maximale. Nous pouvons donc considérer que toutes les particules présentes dans cette fenêtre d'observation ont la même vitesse.

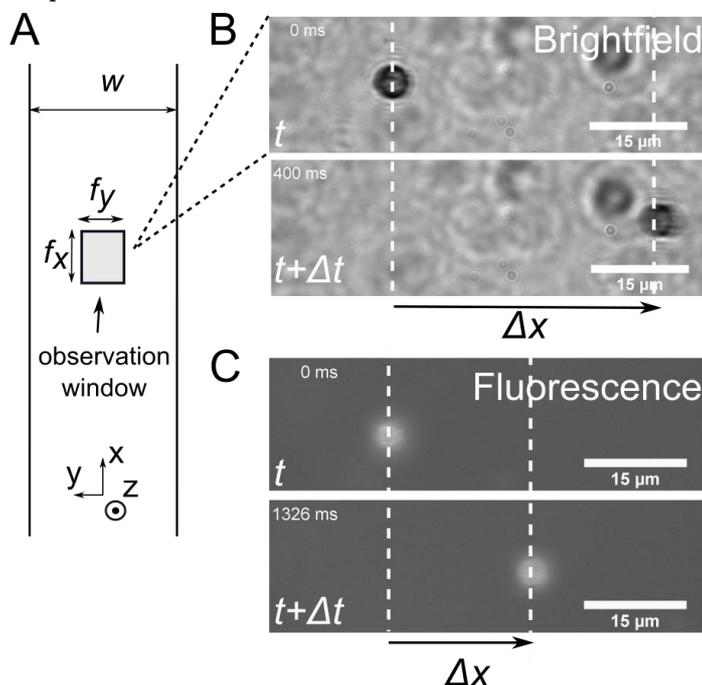


Figure 10. Méthode de mesure de la vitesse des particules dans le canal. (A) Schéma du canal vu de haut avec la zone du plan focal visualisée par la caméra (fenêtre d'observation). Cette zone rectangulaire a pour longueur suivant Oy $f_y = 50 \mu\text{m}$ et selon Ox $f_x = 70 \mu\text{m}$. Cette zone est centrée au milieu de la largeur du canal ($w = 200 \mu\text{m}$). (B) Deux images en lumière blanche de la même particule. Les deux images sont

séparées d'un intervalle de temps Δt pendant lequel la particule s'est déplacée de Δx . (C) Une autre particule à deux instant différents et observée en fluorescence.

Selon les lois de la réfraction, la position z du plan focal dans le canal rempli d'eau est proportionnelle à la hauteur de l'objectif, celle-ci étant directement mesurée sur le microscope. La hauteur du plan focal peut s'écrire :

$$z_{FP} = z_{Obj} \cdot \frac{n_{water}}{n_{oil}}$$

Où z_{FP} est la position verticale du plan focal, z_{Obj} la position verticale de l'objectif, n_{water} et n_{oil} les indices de réfraction respectifs de l'eau et de l'huile ($n_{oil} = 1,5$ et $n_{water} = 1,33$).

L'objectif est déplacé sur des intervalles de $\Delta z_{Obj} = 5 \mu\text{m}$ (correspondant à $\Delta z_{FP} = 4,4 \mu\text{m}$ pour le plan focal) de bas en haut du canal de manière à obtenir l'ensemble des variations de la vitesse. Nous localisons le bas du canal en visualisant les impuretés adsorbées sur la lame de verre. Pour chaque hauteur, une séquence d'images assez longue pour observer le déplacement de plusieurs particules dans le champ d'observation est enregistrée avec la caméra. Pour chaque film, la vitesse $V(z)$ des particules est déterminée en mesurant le déplacement Δx de chaque particule pendant le temps Δt .

La Figure 10 montre les deux images choisies en lumière blanche (B) et en fluorescence (C) pour mesurer le déplacement Δx correspondant à Δt . Pour chaque hauteur z , nous mesurons les vitesses de plusieurs ($N = 4$) particules desquelles nous déduisons la moyenne et la variation standard de $V(z)$.

3.5) Profils de vitesse déterminés avec les billes de polystyrène et les gouttes métallisées

Nous validons notre méthode expérimentale avec des billes de polystyrène (diamètre : $0,5 \mu\text{m}$, concentration : $0,1 \%$ w/w) communément utilisées en micro vélocimétrie. Puis nous avons mesuré les profils de vitesse avec les gouttes recouvertes d'argent en lumière blanche et en fluorescence.

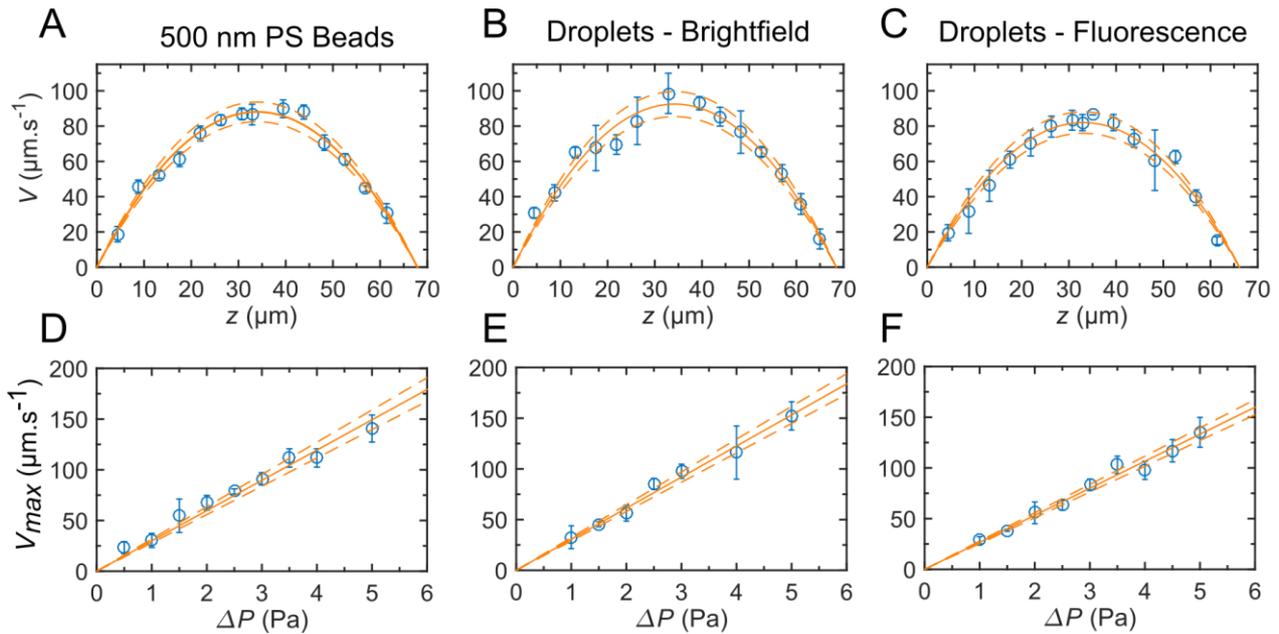


Figure 11. (A - C) Profils de vitesse $V(z)$ obtenus en utilisant des billes de polystyrène fluorescentes (A) et des gouttes recouvertes d'argent en lumière blanche (B) et en fluorescence (C). Les données expérimentales (cercles bleus) sont ajustées par un profil parabolique avec comme seul paramètre ajustable la différence de pression ΔP . Expérimentalement, la différence de pression est de 3 Pa. (D - F) Vitesse maximale V_{max} mesurée au milieu du canal en $z = h/2$ pour différentes différences de pression. Les mesures expérimentales suivent une relation linéaire. Les lignes pointillées correspondent aux maximales et minimales valeurs extraites des paramètres de l'ajustement. Les points expérimentaux sont des moyennes sur $N = 4$ gouttes et les barres d'erreur correspondent à la déviation standard.

Les profils de vitesse obtenus avec ces deux types de particules sont montrés Figure 11A, B et C avec $\Delta P = 3$ Pa et ils sont ajustés par la fonction parabolique de l'équation (4) avec comme unique paramètre ajustable la chute de pression ΔP , h étant constante et égale à la hauteur du canal. Les paramètres de l'ajustement (voir Tableau 2) sont en accord avec les valeurs expérimentales de la différence de pression et de la hauteur du canal. Nous avons pris en compte ici le fait que le canal utilisé pour les mesures en épi-fluorescence avait une hauteur plus petite que ceux utilisés pour les billes de polystyrène et les gouttes métallisées en lumière blanche ($h = 66 \mu\text{m}$ au lieu de $h = 68 \mu\text{m}$ comme indiqué dans le Tableau 2).

	ΔP (Pa)	Hauteur de canal h (μm)
Valeurs expérimentales	$2,9 \pm 0,1$	68 ± 2
Billes de polystyrène	$3,0 \pm 0,2$	68 ± 2
Gouttes métallisées - Lumière blanche	$3,1 \pm 0,2$	68 ± 2
Gouttes métallisées - épi fluorescence	$3,0 \pm 0,2$	66 ± 2

Tableau 2. Paramètres expérimentaux et d'ajustement tirés des mesures et profils paraboliques de la Figure 8. Tous les paramètres ont été déterminés en utilisant des billes de polystyrène de $0,5 \mu\text{m}$ de diamètre et des gouttes métallisées en lumière blanche et en fluorescence. La différence de pression ΔP

et la hauteur du canal h sont extraites des ajustements des profils de vitesse et sont comparées à la différence de pression expérimentale et la hauteur du canal mesurée par microscopie.

3.6) Mesure de la résistance hydrodynamique des canaux

La vitesse maximale V_{\max} dépend de manière linéaire de la différence de pression ΔP , la pente étant inversement proportionnelle à la résistance hydrodynamique R . Nous avons mesuré la vitesse V_{\max} en fonction de la différence de pression. Pour mesurer V_{\max} , nous avons fixé le plan focal à la hauteur $z = h/2$ (milieu du canal). Nous avons fait varier la pression de 1 à 10 Pa. La Figure 11D, E et F montre la vitesse maximale V_{\max} en fonction de ΔP pour des billes de polystyrène de $0,5\mu\text{m}$ de diamètre (D), pour les gouttes métallisées en lumière blanche (E) et en fluorescence (F). Comme attendu, la relation est linéaire dans les trois cas.

Nous déduisons la résistance hydrodynamique de la pente des ajustements linéaires en utilisant l'expression de V_{\max} en fonction de la résistance R (voir plus haut). La largeur du canal w et sa hauteur h sont mesurées. Cette résistance est comparée à la résistance attendue ($R = 0,63 \text{ mbar}\cdot\text{min}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), en prenant h , w et L les dimensions du canal mesurées par microscopie, et en calculant la valeur de R associée. Les valeurs de résistances reportées dans le Tableau 3 sont en accord en considérant les barres d'erreur. R étant proportionnelle à $1/h^3$, sa valeur est très sensible aux variations d'épaisseur du canal, ce qui explique pourquoi la résistance hydrodynamique trouvée avec les gouttes métallisées en épi fluorescence est plus grande que celle pour les billes de polystyrène et les gouttes métallisées en condition de lumière blanche ($0,66 \text{ mbar}\cdot\text{min}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ comparé à $0,60 \text{ mbar}\cdot\text{min}\cdot\mu\text{L}^{-1}$).

	R (mbar.min. μL^{-1})
Valeurs attendues	$0,63 \pm 0,03$
Billes de polystyrène	$0,60 \pm 0,03$
Gouttes métallisées – Lumière blanche	$0,58 \pm 0,03$
Gouttes métallisées – Epi fluorescence	$0,66 \pm 0,03$

Tableau 3. Résistances hydrodynamiques R attendues et calculées à partir des mesures montrées sur la Figure 8. Tous les paramètres ont été déterminés pour des billes de polystyrène fluorescentes et des gouttes métallisées en lumière blanche et en fluorescence. La résistance hydrodynamique R est déduite de la pente de l'ajustement de V_{\max} en fonction de ΔP en prenant les dimensions de canal mesurées par microscopie.

4) Conclusion

Les gouttes recouvertes d'argent présentées ici ont l'avantage d'être à la fois absorbantes et luminescentes, les rendant observables en microscopie à la fois en lumière blanche et en fluorescence. Le diamètre moyen de ces particules est $6,5 \pm 1,5 \mu\text{m}$. En ajoutant la couche d'argent sur les gouttes d'huile, nous avons obtenu des particules de densité proche de celle de l'eau. En mesurant la vitesse de ces particules à plusieurs hauteurs dans un micro-canal de section rectangulaire, nous avons déterminé de manière précise le profil de vitesse pour un écoulement généré par une différence de pression. Comme attendu, nous avons trouvé une distribution parabolique des vitesses du liquide et une relation linéaire entre la vitesse maximale et la différence de pression, confirmant les prédictions de l'équation de Stokes pour notre système. Les gouttes recouvertes d'une couche d'argent peuvent donc être utilisées comme traceurs en micro vélocimétrie pour de l'eau ou des solutions aqueuses, dans de nombreuses expériences de microfluidiques, dans lesquelles les profils de vitesse ne sont pas connus *a priori*.

Partie 2 : Étude des phénomènes d'adhésion entre des gouttes d'huile fonctionnalisées par des anticorps et des cellules B à l'aide de pièges microfluidiques

Introduction générale

Le corps est continuellement exposé à des agents infectieux extérieurs. Le système immunitaire a pour rôle d'éliminer les pathogènes ayant traversé les premières barrières physiques (peau, ...). En tant que cellules sécrétrices d'anticorps, les lymphocytes B occupent une place importante au sein du système immunitaire adaptatif.

L'activation d'une cellule B nécessite la reconnaissance spécifique par les récepteurs membranaires des cellules B (RCB) des antigènes portés par d'autres cellules (macrophages, cellules dendritiques, ...), appelées cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Cette reconnaissance se traduit par une accumulation de protéines adhésives constituant une structure moléculaire appelée synapse immunologique. C'est à partir de cette structure que l'extraction d'antigènes se fait. Les antigènes sont alors internalisés par endocytose, puis digérés sous forme de peptides et liés aux complexes majeurs d'histocompatibilité de classe II (CMH II). Ces fragments d'antigènes sont présentés aux cellules T qui sont alors activées.

Les mécanismes biologiques impliqués dans l'extraction d'antigènes par les cellules B sont encore mal connus. L'activation des cellules B sur des bicouches lipidiques couvertes d'antigènes a montré un étalement de la membrane cellulaire puis une contraction, accompagnés d'une accumulation en antigènes dans la zone de contact [17]. D'autres études ont montré que la rigidité du substrat présentant les antigènes influait sur la quantité d'antigènes extraits [18].

Dans notre étude, nous proposons d'utiliser des gouttes d'huile fonctionnalisées par des anticorps comme substrat pour les cellules B. Ces gouttes présentent l'intérêt de posséder une interface liquide donc permettant la diffusion des anticorps en surface. De plus, ces gouttes sont potentiellement déformables donc pourraient se comporter comme des sondes de force cellulaire. Enfin, les gouttes possédant des tailles comparables aux cellules, ces gouttes « miment » l'action des cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

Dans une première partie (partie 2.1), nous présentons le processus de formation de la synapse immunologique et la présentation des antigènes aux cellules T. Les deux mécanismes d'extraction des antigènes suivant la rigidité du substrat sont exposés. Nous présentons également les caractéristiques principales des gouttes fonctionnalisées par des anticorps et les précédentes études d'adhésion entre ces gouttes et des cellules T.

Dans la partie 2.2, nous présentons les pièges microfluidiques permettant la mise en contact des gouttes fonctionnalisées et des cellules B. L'influence de la géométrie de la chambre microfluidique sur le remplissage des pièges est étudiée expérimentalement à l'aide de billes de polystyrène fluorescentes, et donne lieu à une analyse basée sur des simulations de flux.

Enfin, dans la partie 2.3, nous présentons les méthodes expérimentales menant à la mise en contact entre les gouttes fonctionnalisées et les cellules B à l'aide des pièges microfluidiques. Nous présentons les résultats obtenus, et nous en donnons nos interprétations.

Partie 2.1. Introduction au mécanisme de reconnaissance d'antigènes par les cellules B

I) Présentation du système immunitaire

Le corps est continuellement exposé à des microorganismes extérieurs pouvant causer des maladies. Le système immunitaire est l'ensemble des cellules et des molécules assurant la protection du corps contre l'action de ces agents infectieux. Nous présentons dans cette partie les cellules prenant part au système immunitaire, puis les phases d'action du système immunitaire. Enfin, nous développons les mécanismes conduisant à l'activation des cellules B.

1) Présentation des cellules du système immunitaire

Les agents infectieux, ou encore pathogènes, sont nombreux : virus, bactéries. Une fois traversées les premières barrières du corps (peau, ...), leurs actions peuvent être néfastes pour le corps. Les cellules du système immunitaire, présentées sur la Figure 12, vont alors jouer un rôle important dans la neutralisation et l'élimination des éléments extérieurs [19].

Les cellules du système immunitaire, appelées globules blancs ou encore leucocytes, sont issues de la moelle osseuse où elles se développent et mûrissent. Une fois mûres, elles rejoignent le système lymphatique. Le système lymphatique échange du milieu extracellulaire et des cellules immunitaires en permanence.

Toutes les cellules constituant le sang, c'est-à-dire à la fois les mégacaryocytes producteurs des plaquettes sanguines, et à la fois les globules blancs du système immunitaire dérivent de cellules souches situées dans la moelle osseuse (Figure 12). Ces cellules souches donnent d'abord deux catégories de cellules : les cellules progénitrices des lymphocytes, et les cellules progénitrices de myéloïdes. Les cellules progénitrices de lymphocytes donnent naissance aux cellules du système immunitaire adaptatif, les cellules B et T qui rejoignent les ganglions lymphatiques. Les cellules progénitrices de myéloïdes donnent naissance aux cellules myéloïdes c'est-à-dire la plupart des cellules du système immunitaire inné (les macrophages, granulocytes, neutrophiles, cellules dendritiques, ...). Ces dernières cellules, résidentes dans les tissus, sont capables de phagocytose des microorganismes extérieurs.

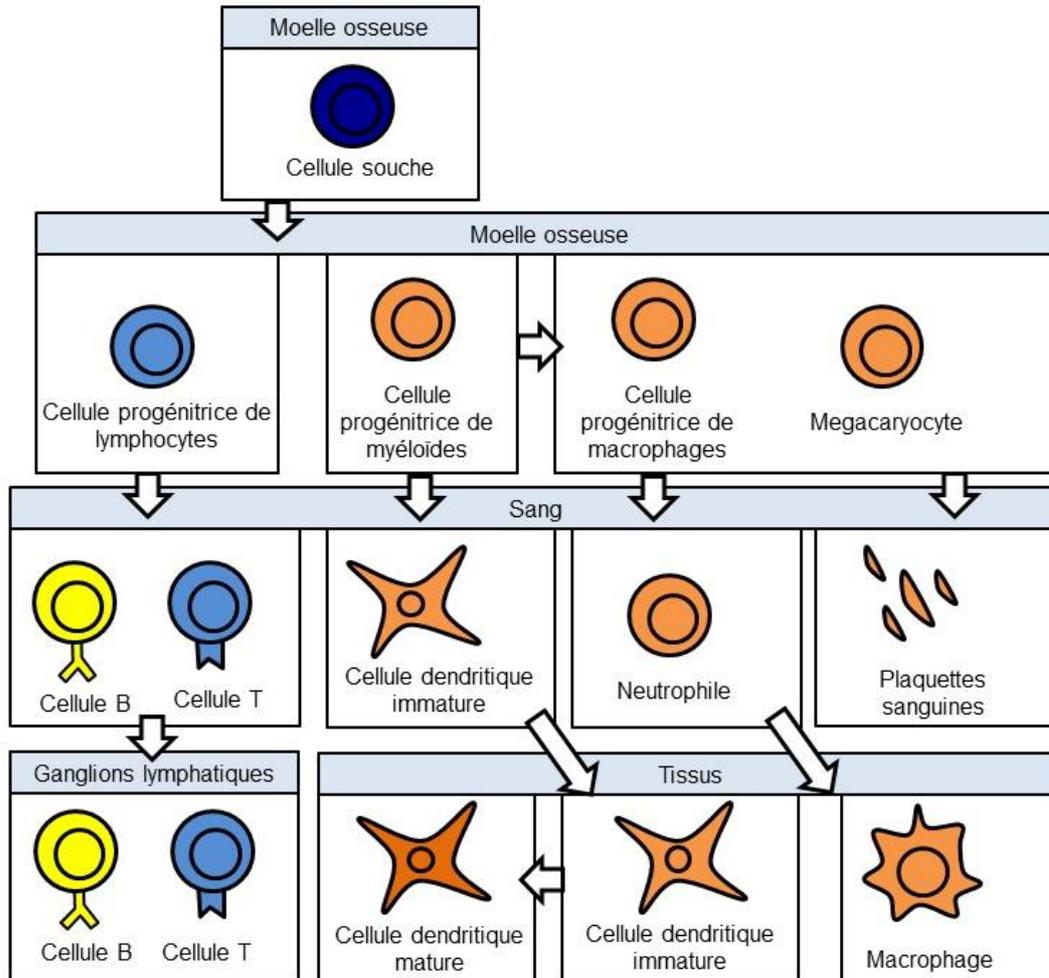


Figure 12. Schéma montrant l'origine des cellules du système immunitaire. Les cellules souches produites dans la moelle osseuse donnent naissance à deux lignées : les cellules progénitrices de lymphocytes (fond bleu) et les cellules progénitrices de myéloïdes (fond orange). Les cellules progénitrices de lymphocytes donnent naissance aux cellules B (fond jaune) et T (fond bleu). Après circulation dans le sang, celles-ci rejoignent les ganglions lymphatiques. Les cellules progénitrices de myéloïdes donnent naissance aux cellules progénitrices de macrophage, aux mégacaryocytes dans la moelle osseuse, et aux cellules dendritiques immatures qui circulent dans le sang. Les cellules dendritiques terminent leur maturation dans les tissus. Les macrophages présents dans les tissus dérivent des neutrophiles circulant dans le sang. Enfin, les mégacaryocytes produisent des plaquettes sanguines circulant dans le sang. Schéma reproduit d'après [19].

Un antigène est un motif moléculaire ou macromoléculaire présent à la surface de pathogènes ou de cellules. Les cellules du système adaptatif sont activées suite à la reconnaissance spécifique des antigènes par leurs récepteurs membranaires. Les cellules B produisent alors des anticorps, molécules qui neutralisent les antigènes. Les cellules T sont capables de tuer les cellules infectées.

2) Etapes de la réponse immunitaire

Alors que le système immunitaire inné intervient rapidement après l'entrée du pathogène dans l'organisme, le système immunitaire adaptatif se déclenche plus lentement mais présente la particularité d'être plus spécifique à tel ou tel pathogène. A long terme, le système immunitaire adaptatif s'avère plus efficace que le système immunitaire inné [19].

Les premières cellules à être recrutées dans la lutte contre le pathogène entrant dans l'organisme sont les cellules du système immunitaire inné, telles que les macrophages, les granulocytes ou encore les cellules dendritiques. Celles-ci ingèrent les microbes par phagocytose et produisent des molécules permettant la communication entre cellules, telles que les cytokines, de manière à provoquer une réponse inflammatoire. Cette action de la part du système immunitaire inné est rapide et peu spécifique (Tableau 4).

Réponse		Temps avant le déclenchement d'une réponse	Durée de la réponse
Réponse du système immunitaire inné	Inflammation, phagocytose, destruction de pathogènes.	Quelques minutes	Plusieurs jours
Réponse du système immunitaire adaptatif	Interactions entre les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules T et B.	Quelques heures	Plusieurs jours
	Activation des cellules B.	Quelques heures	Plusieurs jours
	Production d'anticorps.	Plusieurs jours	Plusieurs semaines
	Migration des lymphocytes activés vers les organes lymphoïdes.	Quelques jours	Plusieurs semaines
	Elimination des pathogènes par les cellules T et les anticorps.	Quelques jours	Plusieurs semaines
Mémoire immunitaire	Maintenance des cellules B et T mémoires. Protection contre les réinfections.	Quelques jours à quelques semaines.	Peut durer toute une vie

Tableau 4. Tableau résumant les différentes phases de la réponse du système immunitaire face à un pathogène. Une réponse rapide est faite par le système immunitaire inné par l'intermédiaire des macrophages. Le déclenchement du système immunitaire adaptatif prend plus de temps car il nécessite l'activation des cellules T et B. Tableau reproduit d'après [19].

Le système immunitaire adaptatif réagit notamment grâce à l'action du système immunitaire inné. En effet, les cellules du système immunitaire inné, après avoir ingéré les antigènes, les présentent à leur surface aux cellules B et T, induisant ainsi leur activation. Les cellules B et T prolifèrent alors et se différencient au bout de quelques jours. Les cellules B produisent des anticorps qui neutralisent les antigènes reconnus. Les cellules T tuent les cellules infectieuses. Des cellules B et T dites mémoires sont gardées dans le corps de manière à assurer la défense de l'organisme dans le temps.

3) Récepteurs membranaires des cellules B

Nous avons présenté les cellules B et T comme ayant la particularité de posséder des récepteurs membranaires pouvant se lier spécifiquement aux antigènes. Nous détaillons dans ce paragraphe la structure des récepteurs membranaires des cellules B qui font l'objet de notre étude.

3.1) Structure d'un anticorps

Nous rappelons ici la structure générale d'un anticorps, molécule constitutive du récepteur membranaire des cellules B [19]. Une représentation d'un anticorps est donnée sur la Figure 13A.

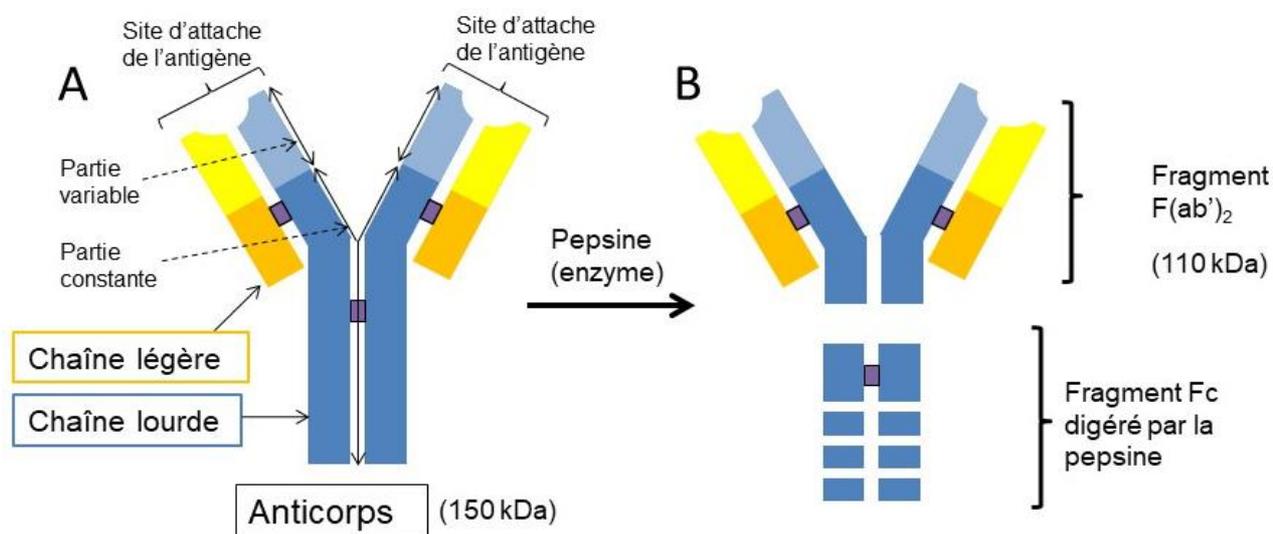


Figure 13. (A) Schéma de la structure d'un anticorps. Il s'agit d'une protéine composée de 4 chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes (de 50 kDa chacune) et deux chaînes légères (de 25 kDa chacune) reliées entre elles par des ponts disulfure (en violet). La structure a une forme en Y. Les chaînes légères et lourdes possèdent une partie dite « constante » dont la séquence en acides aminés varie peu au sein de l'espèce, et une partie dite « variable » dont la séquence en acides aminés change au sein de l'espèce. (B) Représentation de l'action de la pepsine sur l'anticorps. La partie Fc de l'anticorps (partie basse des deux chaînes lourdes) est digérée. Il reste alors la partie F(ab')₂ constituée de la partie haute des deux chaînes lourdes et des deux chaînes légères. Schéma reproduit d'après [19].

Un anticorps est une protéine constituée de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes (représentées en bleu) et deux chaînes légères (représentées en jaune). Ces chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulfures (en violet). L'ensemble de la structure possède une forme en Y. La partie haute des chaînes lourdes et légères est dite « variable » car la séquence polypeptidique de cette partie possède une grande variabilité au sein d'une même espèce. La partie basse des chaînes lourdes est dite « constante » car la séquence polypeptidique de cette partie varie peu au sein d'une même espèce. Les extrémités hautes des chaînes lourdes et légères forment deux sites de liaisons spécifiques à l'antigène.

Une opération de clivage de la partie constante de l'anticorps peut être faite à l'aide d'une enzyme appelée pepsine (Figure 13B). La partie basse de l'anticorps, appelée partie Fc, est alors digérée par la pepsine, et il ne reste que la partie haute de l'anticorps, appelée partie F(ab')₂. Cette partie F(ab')₂, anticorps également, conserve la même spécificité vis-à-vis de l'antigène que l'anticorps de départ.

3.2) Récepteurs membranaires de la cellule B

Les récepteurs membranaires des cellules B sont des protéines qui assurent la reconnaissance des antigènes par ces cellules. Nous présentons ici leur structure [19].

Un de ces récepteurs est représenté sur la Figure 14. Il est constitué d'un anticorps, assurant la reconnaissance de l'antigène, et de deux protéines associées appelées Igα et Igβ, assurant la signalisation avec le reste de la cellule B. La chaîne lourde de l'anticorps est liée à la membrane plasmique via une autre structure protéique. Il s'agit du même anticorps que celui qui est sécrété par la cellule B. L'antigène s'attache spécifiquement aux sites de liaison de l'anticorps. Puis des signaux sont émis par les protéines Igα et Igβ, induisant ainsi l'activation de la cellule.

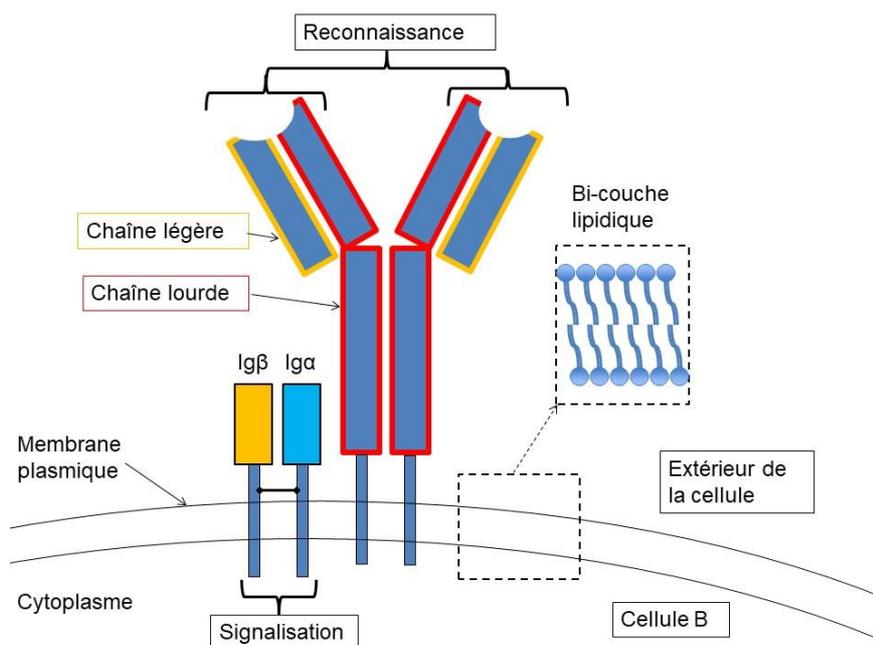


Figure 14. Schématisation d'un récepteur membranaire de cellule B. Il s'agit d'un ensemble de deux structures protéiques : (i) une immunoglobuline (ou anticorps) transmembranaire qui se lie avec

l'antigène, composée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère. Cet anticorps a la même spécificité vis-à-vis de l'antigène que ceux sécrétés par la cellule B après activation ; (ii) une chaîne $Ig\alpha$ et une chaîne $Ig\beta$ liées entre elles et qui assurent la signalisation dans la cellule après reconnaissance d'un antigène par l'immunoglobuline. Schéma reproduit d'après [19].

II) Présentation de la synapse immunologique chez la cellule B

Nous allons nous focaliser ici sur un phénomène important du système immunitaire adaptatif : l'activation des cellules B par des cellules présentatrices d'antigène. Cette activation se manifeste par une reconnaissance spécifique des antigènes par les récepteurs membranaires de la cellule B et de la formation d'une synapse immunologique au niveau de la cellule B, permettant l'extraction des antigènes présentés. Ces phénomènes s'accompagnent d'une augmentation de la surface de contact entre la cellule B et la cellule présentatrice d'antigène, puis d'une contraction.

1) Observations expérimentales

Ce sont des observations expérimentales qui ont mis en évidence la formation d'une synapse immunologique entre cellules B et CPA. Batista *et al.* [20] ont mis en contact des cellules B avec des cellules myéloïdes et des cellules L (cellules endocriniennes) dont les récepteurs membranaires sont liés à des antigènes. La Figure 15A montre les images obtenues pour les cellules myéloïdes (en haut) et les cellules L (en bas), après fixation. Les antigènes présentés par les cellules myéloïdes et les cellules L sont marqués en vert (IC) et les RCB sont marqués en rouge (IgM). On constate une concentration en antigènes et en RCB au contact entre la cellule B et la CPA.

La Figure 15B montre d'autres images en fluorescence de cellules B en contact avec des cellules myéloïdes présentant des antigènes. Les RCB apparaissent en rouge (IgM) et les antigènes en vert (IC). Là encore, on constate une accumulation en antigènes et en RCB au contact cellule B - CPA.

Cette accumulation correspond à la formation d'une synapse immunologique que nous décrivons dans la suite.

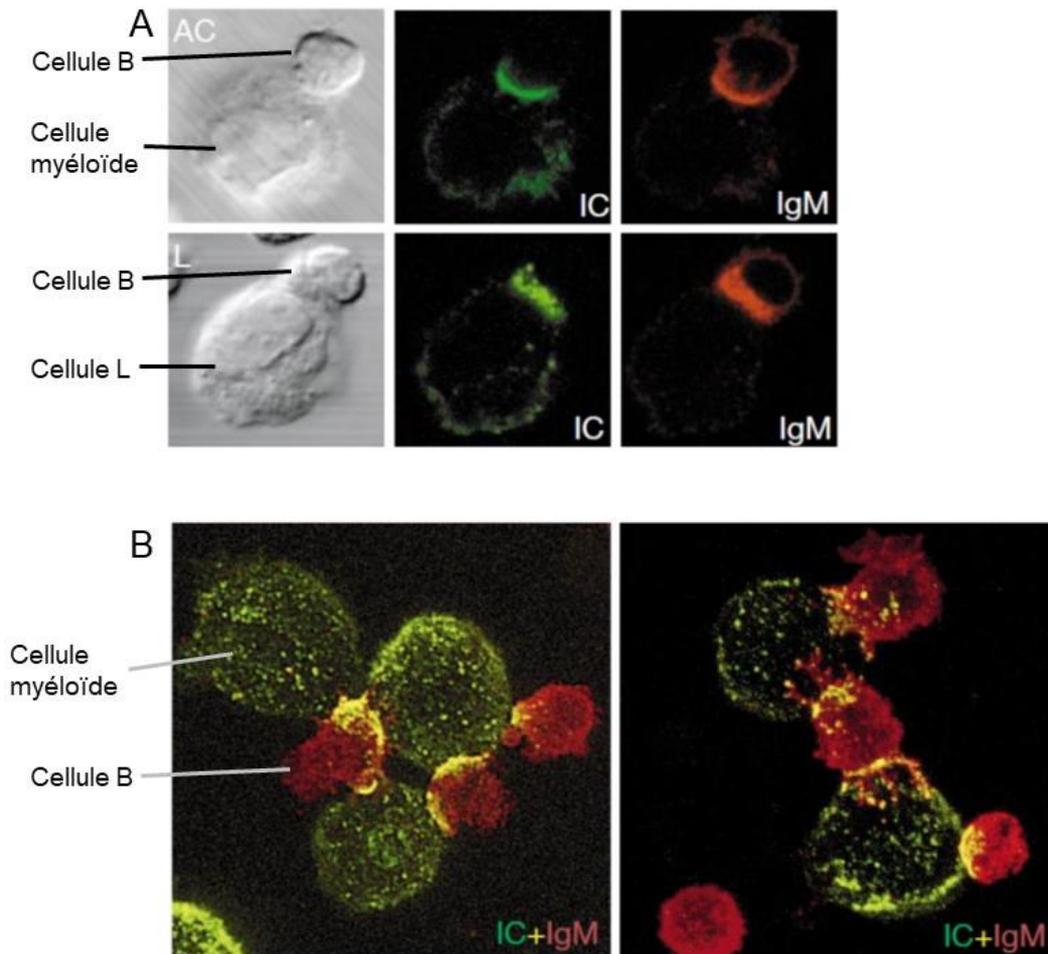


Figure 15. Formation de la synapse immunologique pour des cellules B en contact avec des CPA. Images issues de Batista *et al.* [20]. (A) Images d'une cellule B en contact avec une cellule myéloïde (AC) et une cellule L (L). La cellule B porte des RCB en surface marqués en rouge (IgM), tandis que la cellule myéloïde et la cellule L portant des antigènes en surface marqués en vert (IC). Les cellules ont été fixées. (B) Images en fluorescence de cellules B et de cellules myéloïdes en contact. Les antigènes de la cellule myéloïde sont marqués en vert et les RCB de la cellule B en rouge.

2) Présentation de la synapse immunologique chez les cellules B

Dans cette partie nous présentons la synapse immunologique et les étapes d'internalisation de l'antigène couplées à l'activité intracellulaire, décrites notamment par Yuseff *et al.* [21] et Batista *et al.* [22]. Ces étapes sont résumées sur le schéma de la Figure 16.

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules B sont formées dans la moelle osseuse où elles mûrissent, puis rejoignent les ganglions lymphatiques. Elles rencontrent alors des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme par exemple des macrophages ou des cellules dendritiques, qui portent à leur surface des antigènes (étape 1). La reconnaissance spécifique des antigènes par les récepteurs de la cellule B (RCB) donne lieu à la formation d'une synapse immunologique [20], formée de RCB et de molécules adhésives (principalement des intégrines [22]) formant un anneau. Cette accumulation, appelée « cluster » ou encore « patch » dans la

suite, est à l'origine de signaux d'activation de la cellule. À l'intérieur de la synapse, les RCB forment des microclusters, favorisant la transduction de signaux d'activation [22]. Notons que cette structure a été observée également entre les cellules T et les CPA, et qu'elle est donc commune aux deux types de lymphocytes [23].

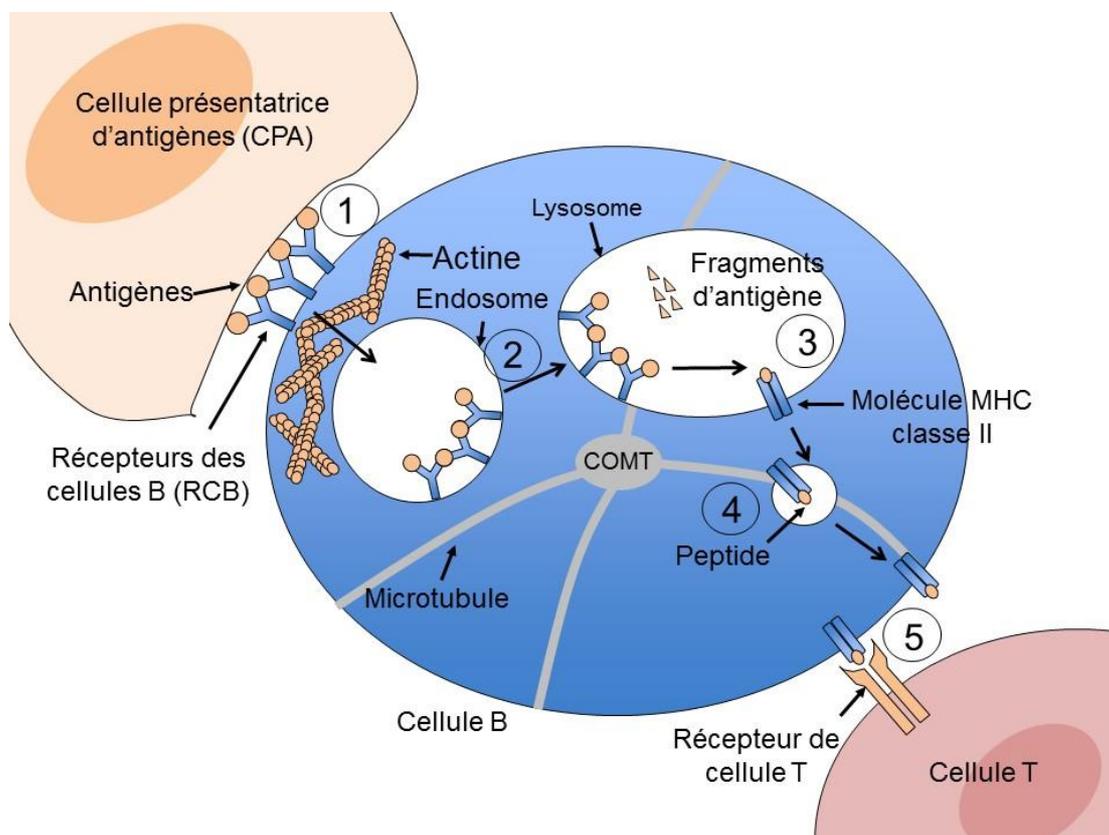


Figure 16. Schématisation du procédé d'internalisation des antigènes dans la cellule B lié au trafic intracellulaire. Schéma reproduit d'après [24]. (1) Les récepteurs membranaires de la cellule B (RCB) reconnaissent les antigènes présents à la surface de la cellule présentatrice d'antigènes (CPA). L'attachement des RCB entre eux et un réarrangement du cytosquelette d'actine induisent l'internalisation de l'antigène dans la cellule B. (2) Les RCB liés aux antigènes sont à l'intérieur de l'endosome, puis sont transférés dans le lysosome. (3) L'antigène est digéré dans le lysosome et l'un de ses peptides se lie au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) provenant de l'appareil de Golgi. (4) Le complexe CMH-peptide est exporté vers la surface de la cellule via le réseau de microtubules. (5) Le complexe peptide-CMH interagit avec un récepteur d'une cellule T.

Suite à l'activation de la cellule B, le cytosquelette d'actine se réorganise alors localement, permettant une expansion de la membrane cellulaire. Le centre d'organisation des microtubules (COMT) se délocalise vers le site de rencontre des antigènes. Aidés par les microtubules, les lysosomes sont dirigés vers la synapse immunologique où ils libèrent des molécules de signalisation dans le milieu extracellulaire par exocytose. Le lysosome est un organelle dont le rôle est la digestion intracellulaire (son pH est compris entre 4,6 et 5,0). Ces phénomènes d'exocytose s'accompagnent de l'internalisation par endocytose et de la digestion des antigènes dans les lysosomes (étape 2). Le peptide antigénique se lie au complexe majeur

d'histocompatibilité (CMH) dans le lysosome (étape 3). Les complexes peptide-CMH migrent à la surface de la cellule B grâce à l'aide du réseau de microtubules (étape 4). Une fois à la surface, le complexe peptide-CMH est reconnu par les récepteurs des cellules T (RCT). La cellule B reçoit alors les stimuli nécessaires à son activation complète (prolifération, production d'anticorps). Elle active également la cellule T (étape 5). On parle alors de coopération entre cellules B et cellules T [25]. Cette coopération joue un rôle important dans le système immunitaire adaptatif.

3) Accumulation d'antigènes et augmentation de surface

L'étude de cette synapse immunologique peut être faite à l'aide de systèmes modèles et ne nécessite pas forcément la présence d'une cellule présentatrice d'antigène. C'est cette particularité que Fleire *et al.* [17] ont exploité en remplaçant la cellule présentatrice d'antigènes par une membrane couverte d'antigènes.

La Figure 17A montre une séquence d'image d'une cellule B posée sur une membrane recouverte d'antigènes [17]. Les récepteurs membranaires de la cellule B sont spécifiques à l'antigène présent. Sur les images du haut prises avec un microscope à balayage électronique, on voit la membrane de la cellule qui s'étend à $t = 3$ min, puis qui se contracte ensuite. Ce phénomène a aussi été observé dans le cas d'une cellule B posée sur une bicouche lipidique couverte d'antigènes. Les images du bas sont des images prises au microscope à fluorescence pour lesquelles la membrane cellulaire de la cellule B est marquée en rouge et les antigènes de la membrane en vert. On voit que l'augmentation de surface de la membrane cellulaire de la cellule B s'accompagne d'une accumulation d'antigènes. On constate également que la fluorescence au niveau du contact n'est pas homogène spatialement, indiquant la formation de micro clusters d'antigènes.

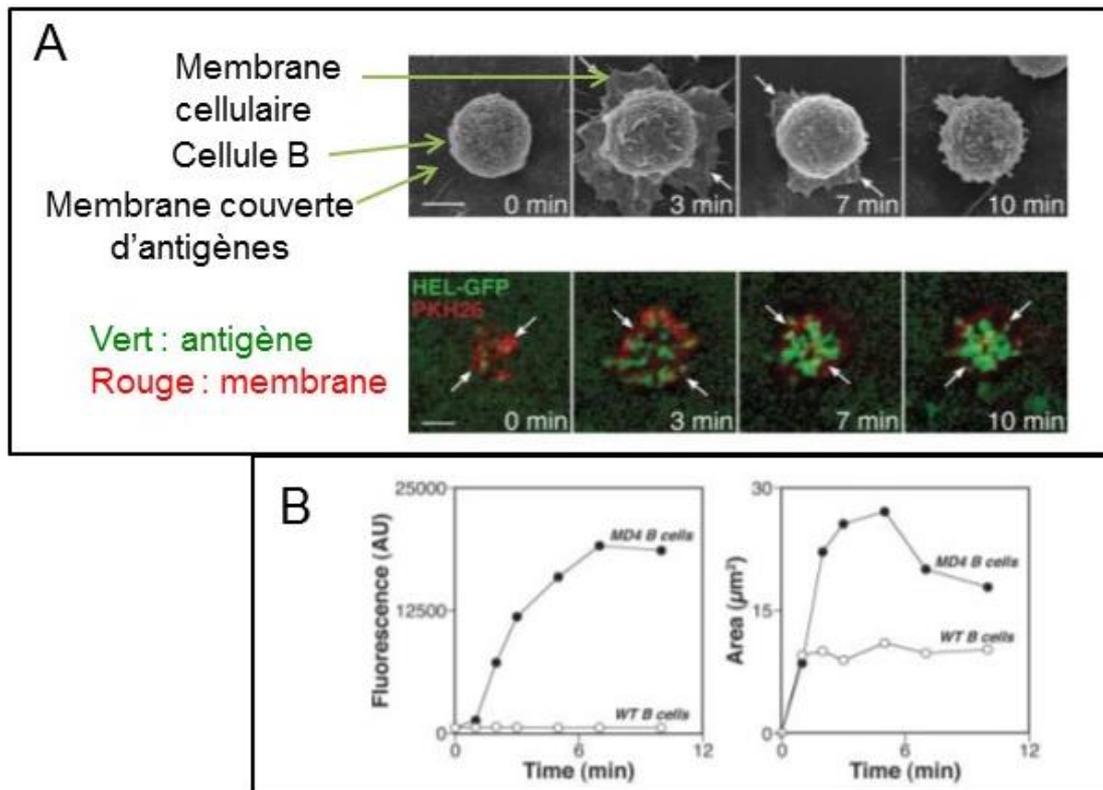


Figure 17. (A) Séquences d'images d'une cellule B en contact avec une membrane couverte d'antigènes (images issues de Fleire *et al.* [17]). Sur les images du haut prises avec un microscope à balayage électronique, on voit la membrane de la cellule qui s'étend à $t = 3$ min, puis qui se contracte ensuite. Les images du bas sont des images prises au microscope à fluorescence pour lesquelles la membrane cellulaire de la cellule B est marquée en rouge et les antigènes de la membrane en vert. On voit que l'augmentation de surface de la membrane cellulaire s'accompagne de la formation d'un cluster d'antigène. On constate également la formation de micro clusters d'antigènes. (B) La courbe de gauche montre la fluorescence moyenne en fonction du temps des antigènes accumulés pour des cellules B ayant des récepteurs spécifiques à l'antigène présenté (cercles remplis) et pour d'autres possédant des récepteurs non spécifiques à l'antigène présenté (cercles vides) (courbes issues de Fleire *et al.* [17]) La courbe de droite montre la surface de contact en fonction du temps entre les deux cellules pour des cellules B ayant des récepteurs spécifiques à l'antigène présenté (cercles remplis) et pour d'autres possédant des récepteurs non spécifiques à l'antigène présenté (cercles vides). On voit que la concentration en antigène à la surface de contact s'accompagne d'une augmentation de surface puis d'une contraction de la zone de contact [17].

La fluorescence totale au niveau de la surface de contact est mesurée en fonction du temps sur la Figure 17B (courbe de gauche) pour des cellules B ayant des récepteurs spécifiques à l'antigène présenté (cercles remplis) et pour d'autres possédant des récepteurs non spécifiques à l'antigène présenté (cercles vides). On constate une augmentation de fluorescence seulement dans le cas où les RCB sont spécifiques aux antigènes présentés. L'aire de contact de la membrane de la cellule B a aussi été mesurée en fonction du temps. Dans le cas où les RCB sont spécifiques aux antigènes présentés (cercles remplis), on constate une augmentation jusqu'à $t = 6$ min puis une diminution jusqu'à atteindre une valeur constante. Dans le cas où le RCB n'est pas spécifique aux antigènes présentés, la surface de contact reste constante en fonction du temps (cercles

vides). La réponse de la cellule dépend donc de la reconnaissance spécifique de l'antigène présenté.

L'accumulation d'antigène au niveau du contact entre cellule B et substrat recouvert d'antigène s'accompagne donc d'une augmentation de surface de la zone de contact puis d'une contraction de la membrane cellulaire. Fleire *et al.* [17] ont montré que ce phénomène dynamique de la membrane est crucial dans l'activation de la cellule B car il a un impact sur la quantité d'antigènes accumulés.

4) Paramètres influençant la réponse de la cellule B

Les facteurs ayant une influence sur l'extension de la membrane cellulaire et la concentration en antigènes accumulés sont ici intéressants à noter. Fleire *et al.* identifient deux paramètres déterminants dans la réponse de la cellule : la concentration initiale en antigènes sur la membrane et l'affinité des RCB pour l'antigène présenté. La Figure 18 montre la surface du contact (A) et nombre d'antigènes accumulés (B) entre la cellule B et la bicouche lipidique présentant les antigènes en fonction du temps, pour différentes concentrations en antigènes et des cellules B possédant des RCB avec des affinités différentes pour les antigènes.

Des cellules mutantes avec des RCB ayant des affinités différentes pour l'antigène ont été utilisées. Les affinités varient suivant les différentes courbes d'un même graphe : cercles remplis, HEL^{WT} ($K_a = 2,1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$) ; diamants, HEL^{RDGN} ($K_a = 5,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) ; cercles vides, HEL^K ($K_a = 8,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) ; carrés, HEL^{RKD} ($K_a = 0,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) ; astérisques, HEL^{KK} ($K_a < 0,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$). En dessous d'une certaine affinité seuil (environ 10^6 M^{-1}), la cellule B ne répond pas. Dépassée cette affinité seuil, la surface et la concentration en antigènes sont d'autant plus grande que l'affinité est grande, jusqu'à une affinité d'environ $5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$.

La réponse de la cellule dépend également de la concentration en antigènes. La concentration en antigènes varie suivant les graphes de haut en bas (150, 75 et 15 molécules par μm^2). On voit que plus la concentration en antigène est grande, plus l'accroissement de la surface de contact est grand et plus le plateau atteint du nombre d'antigènes accumulés est élevé. En dessous d'une certaine concentration seuil, la cellule ne répond plus.

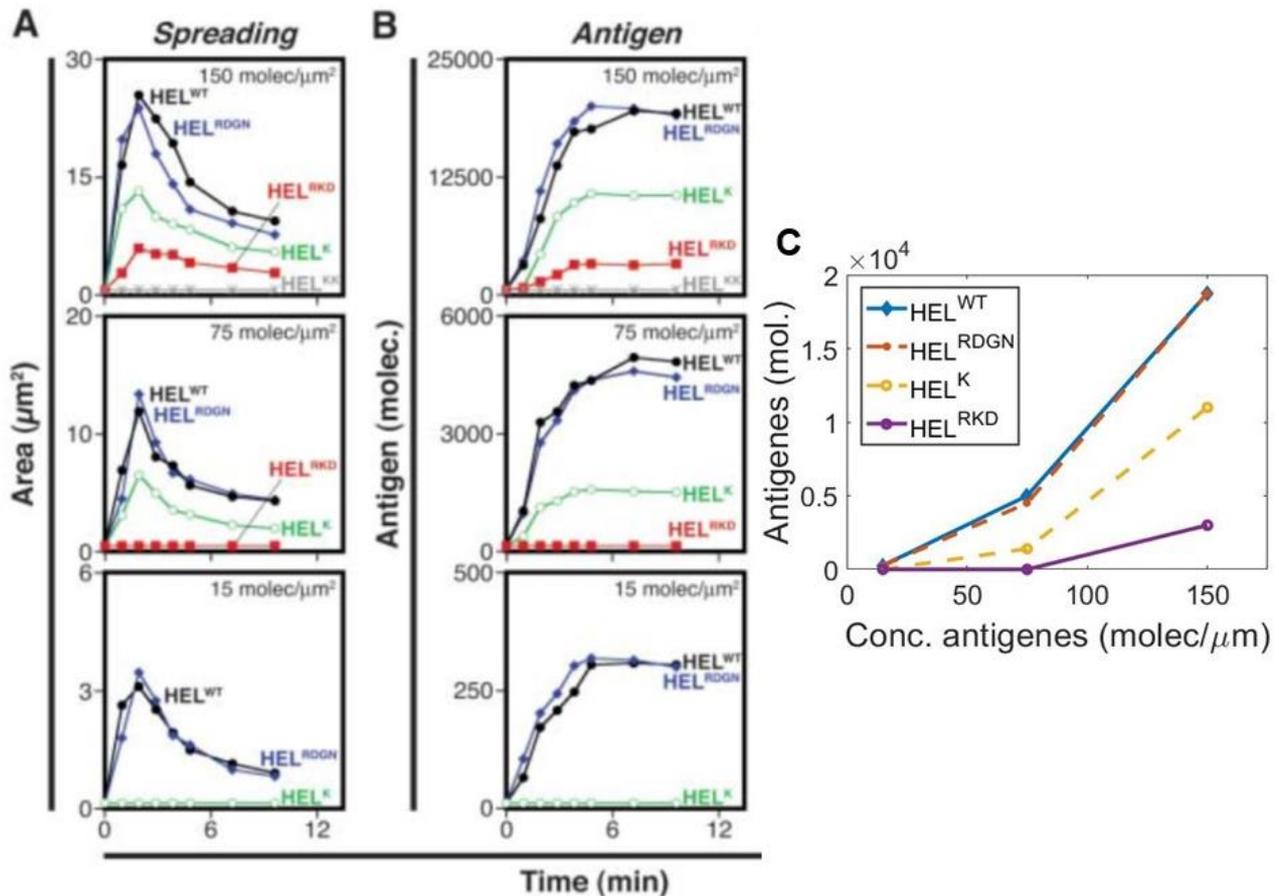


Figure 18. Surface du contact (A) et nombre d'antigènes accumulés (B) entre la cellule B et la bicouche lipidique présentant les antigènes en fonction du temps, pour différentes concentrations en antigènes et des cellules B possédant des RCB avec des affinités différentes pour les antigènes (courbes issues de Fleire *et al.* [17]). La concentration en antigènes varie suivant les graphes de bas en haut (15, 75 et 150 molécules par μm^2). On voit que plus la concentration en antigène est élevée, plus l'accroissement de la surface de contact est grand et plus le nombre d'antigènes accumulés est grand. En dessous d'une certaine concentration seuil, la cellule ne répond plus. L'affinité du RCB pour l'antigène HEL varie suivant les types de courbe d'un même graphe : cercles remplis, HEL^{WT} ($K_a = 2,1.10^{10} \text{M}^{-1}$) ; diamants, HEL^{RDGN} ($K_a = 5,2.10^7 \text{M}^{-1}$) ; cercles vides, HEL^{K} ($K_a = 8,7.10^6 \text{M}^{-1}$) ; carrés, HEL^{RKD} ($K_a = 0,8.10^6 \text{M}^{-1}$) ; astérisques, HEL^{KK} ($K_a < 0,4.10^6 \text{M}^{-1}$). On constate que plus l'affinité du RCB est grande pour l'antigène HEL, plus la surface sera grande et plus la concentration en antigènes sera grande. En dessous d'une certaine affinité seuil, la cellule B ne répond pas. (C) Nombre d'antigènes accumulés tracés en fonction de la concentration initiale en antigènes sur la membrane, pour différents types de cellules cités plus haut (points tracés par nous-mêmes à partir des données de (B)).

Il est à noter que la croissance du nombre d'antigènes accumulés en fonction du nombre d'antigènes initialement présents sur la surface n'est pas linéaire. De manière à le voir clairement, nous avons tracé le nombre d'antigènes accumulés au plateau en fonction de la concentration initiale en antigènes sur la Figure 18C. Pour les cellules HEL^{WT} et HEL^{RDGN} dont la réponse est la plus grande, on constate que le nombre d'antigènes augmente peu pour des concentrations initiales allant de 15 à 50 molécules par μm^2 , puis que la pente augmente.

Notons enfin que la quantité d'antigènes accumulés est d'autant plus grande que la surface a augmenté, ceci pour des affinités des RCB pour les antigènes différents. Fleire *et al.* [17] ont aussi

montré que le nombre d'antigènes présentés à la surface de la cellule B après extraction est proportionnel au nombre d'antigènes accumulés à la surface. On voit donc que le phénomène d'extension de la membrane de la cellule B a un impact sur son degré d'activation.

5) Interprétation

Le lien entre l'expansion de membrane de la cellule B et l'augmentation du nombre d'antigènes accumulés a fait l'objet de simulations numériques. Fleire *et al.* [17] ont montré que l'augmentation de surface de contact est nécessaire pour comprendre les résultats expérimentaux. En considérant des processus stochastiques, ils ont modélisé le système comme suit (voir Figure 19) :

- des antigènes libres de se déplacer par diffusion brownienne sur une surface plane (ligands) ;
- une surface de contact initialement petite et qui peut varier, sur laquelle sont liés des RCB fixes capables de se lier aux antigènes ;
- l'augmentation de la surface se fait par incréments ;
- la surface augmente si et seulement si l'affinité entre ligands et récepteurs est telle qu'il y a 75 % de récepteurs attachés aux ligands, sinon la simulation s'arrête ;
- au bout de 2 minutes (paramètre de temps déterminé par l'expérience), la surface de contact est diminuée.

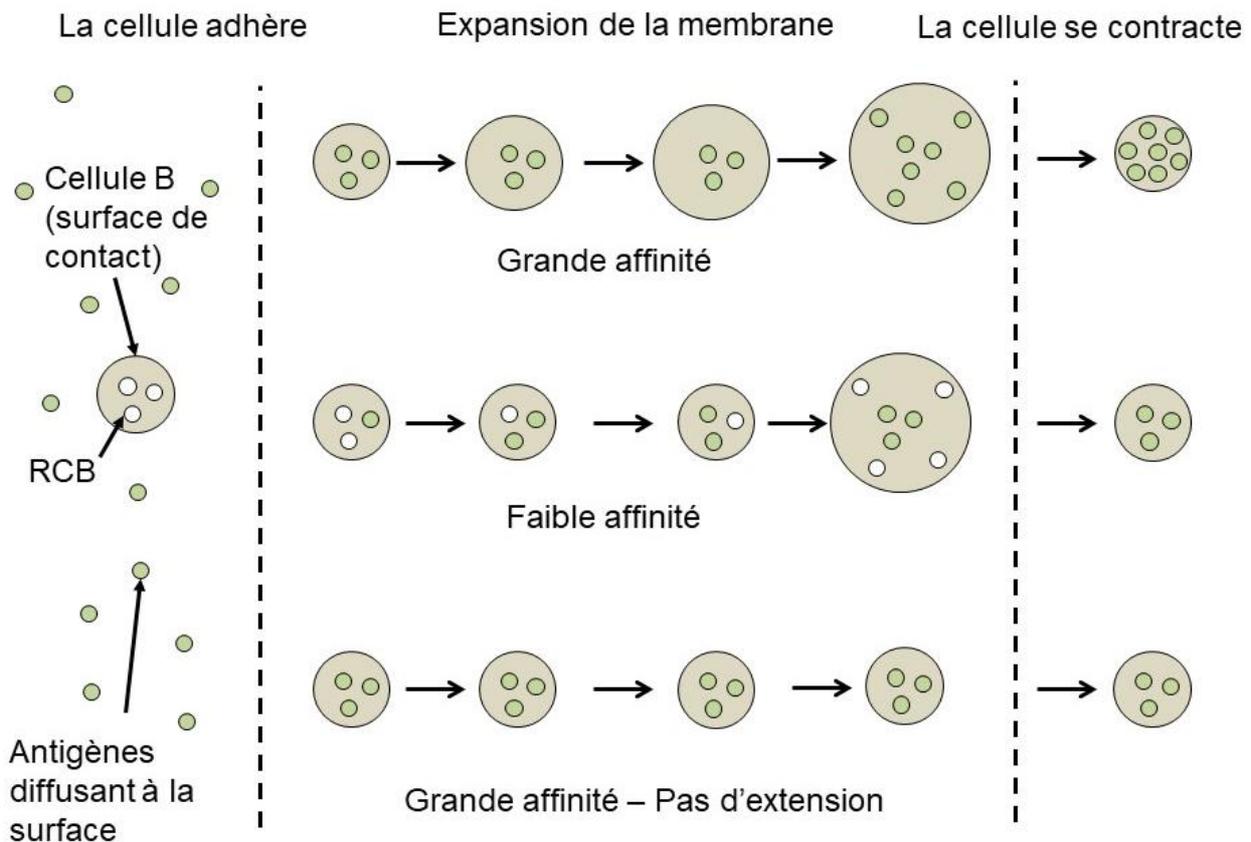


Figure 19. Schéma illustrant le lien entre l'expansion de la membrane et l'affinité des BCB pour les antigènes (schéma reproduit d'après Fleire *et al.* [17]). La cellule B adhère au départ à la membrane portant les antigènes grâce à ses récepteurs membranaires (RCB) représentés par des cercles blancs. Nous représentons la surface de contact entre la cellule et la membrane. Les antigènes (cercles verts)

sont libres de diffuser à la surface de la membrane (cercles verts). Dans le cas d'une grande affinité entre les RCB avec les antigènes (ligne du haut), les antigènes se lient rapidement aux RCB, puis la surface de contact augmente, augmentant ainsi le nombre de RCB en contact avec la surface et donc le nombre d'antigènes liés aux RCB. Enfin, au bout de 2 minutes, la surface de contact se contracte et collecte des complexes ligand/récepteur en un agrégat central. Dans le cas d'une affinité faible (ligne du milieu), les antigènes se lient lentement, si bien qu'à la fin de la contraction, il y a peu d'antigènes liés aux récepteurs. Dans le cas d'une grande affinité sans expansion de la membrane, le nombre d'antigènes liés aux RCB est limité à ceux présentés initialement, donc le nombre de complexes ligand/récepteur à la fin est faible [17].

En considérant ce modèle, Fleire *et al.* [17] ont retrouvé les principaux résultats obtenus expérimentalement. La quantité d'antigènes accumulés au cours du temps suit bien une loi non linéaire avec un plateau. Ce plateau est différent selon différentes affinités seulement si la surface augmente dans le modèle. En effet, si la surface est fixée constante dans le modèle, la quantité d'antigènes accumulés est la même pour deux affinités différentes, contrairement à ce qu'il a été trouvé expérimentalement.

La Figure 19 illustre le rôle de l'expansion de la membrane dans l'accumulation d'antigène. Dans le cas où l'expansion de la membrane est possible et où l'affinité est grande, les antigènes se lient rapidement aux RCB, puis la surface de contact augmente, augmentant ainsi le nombre de RCB en contact avec la surface et donc le nombre d'antigènes liés aux RCB. Enfin, au bout de 2 minutes, la surface de contact se contracte et collecte des complexes ligand/récepteur en un agrégat central. Dans le cas d'une affinité faible (ligne du milieu), les antigènes se lient lentement, si bien qu'à la fin de la contraction, il y a peu d'antigènes liés aux récepteurs. Dans le cas d'une grande affinité sans expansion de la membrane, le nombre d'antigènes liés aux RCB est limité à ceux présentés initialement, donc le nombre de complexes ligand/récepteur à la fin est faible. L'augmentation de la surface de contact permet donc de discriminer clairement l'accumulation d'antigènes entre deux affinités différentes.

Il est intéressant de constater que des considérations d'ordre « physique » de diffusion et de liens ligands-récepteurs, sans faire appel à des notions de biologie, permet de retrouver les résultats expérimentaux obtenus. Mais ce modèle d'expansion de membrane reste descriptif et ne donne pas de mécanisme expliquant l'extraction des antigènes.

III) Deux mécanismes proposés pour l'extraction d'antigène

Dans notre présentation de la synapse immunologique (voir plus haut), nous avons dit que l'extraction d'antigènes de la CPA était associée chez la cellule B à une réorganisation du cytosquelette et une polarisation des lysosomes. Cette réorganisation intracellulaire correspond aux résultats des expériences de Yuseff *et al.* [26] en 2011. L'interprétation de ces expériences est basée sur des sécrétions extracellulaires des lysosomes. Mais des expériences réalisées par Natkanski *et al.* [27] en 2013 ont montré que l'internalisation faisait appel à des processus mécaniques de la membrane cellulaire. En effet, le phénomène d'endocytose des antigènes nécessite une déformation de la membrane cellulaire. Ces phénomènes de déformation de la membrane sont associés à des énergies physiques qui peuvent avoir un rôle à jouer dans

l'internalisation [28]. Ces énergies sont liées à des forces. Nous allons voir que le phénomène d'extraction d'antigène peut être compris à l'aide de ces forces (explication mécanique). Ces deux mécanismes ont été mis en regard récemment par Pierobon et Lennon-Duménil [29].

1) Mise en évidence d'une polarisation du lysosome

Dans la présentation de la synapse immunologique chez la cellule B que nous avons faite plus haut, nous avons décrit une polarisation des lysosomes vers la synapse. Cette polarisation a été observée par Yuseff *et al.* [26] en 2011.

L'expérience de Yuseff *et al.* consiste à laisser incuber les cellules B possédant des RCB IgM avec des billes de polystyrène recouvertes d'anticorps anti-IgM ou avec des billes de polystyrène recouvertes d'anticorps anti-IgG. La Figure 20A montre des images au microscope optique d'une cellule B ayant été au contact pendant une heure avec une bille anti-IgM (en haut), et une cellule B ayant été au contact pendant une heure avec une bille anti-IgG (en bas). Les molécules MHCII sont marquées en vert et les lysosomes sont marqués en rouge. On constate une accumulation de molécules MHCII et des lysosomes au contact entre la cellule et la bille dans le cas de la bille anti-IgM, et pas d'accumulation dans le cas de la bille anti-IgG. Ces observations confirment le fait que le lysosome se polarise en direction de la synapse.

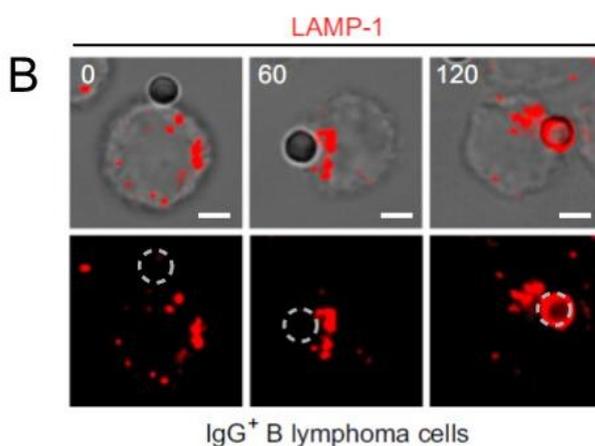
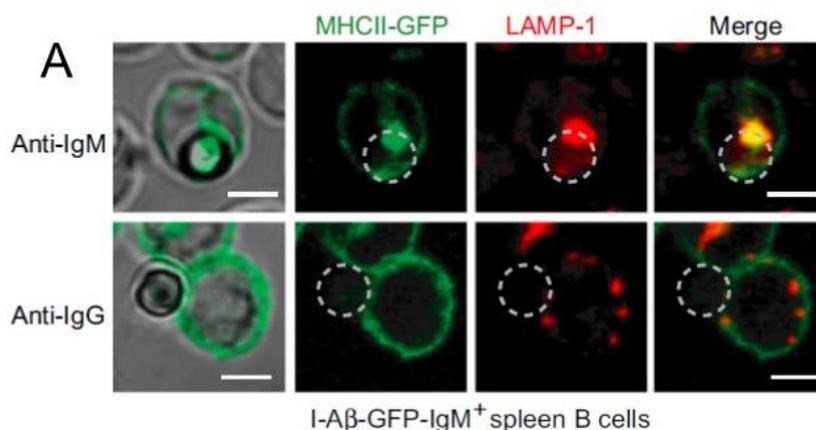


Figure 20. (A) Images au microscope à fluorescence de cellules B présentant des RCB IgM, en contact avec des billes de polystyrène couvertes d'anticorps anti-IgM (en haut) ou couvertes d'anticorps anti-IgG (en bas). Les molécules MHCII sont marquées en vert et les lysosomes sont marqués en rouge (LAMP-1).

On constate une accumulation en MHCII et en lysosomes au niveau de la bille dans le cas des billes anti-IgM. La barre d'échelle correspond à 3 μm . (B) Séquence d'images montrant l'accumulation de lysosome au cours du temps dans le cas d'une cellule avec des récepteurs IgG en contact avec une bille anti-IgG. Le temps est indiqué en minutes. La barre d'échelle correspond à 3 μm . Images issues de Yuseff *et al.* [26].

La Figure 20B montre une séquence d'images prises au microscope optique montrant la dynamique d'accumulation du lysosome marqué en rouge. La cellule B montrée possède des RCB IgG et la bille est recouverte d'anticorps anti-IgG. On constate une polarisation du lysosome au bout d'une heure, puis que les lysosomes entourent la bille après 2 heures. Le temps caractéristique de polarisation est donc de l'ordre d'une heure.

2) Mise en évidence d'actions mécaniques

L'endocytose des antigènes peut aussi se faire par déformation mécanique de la membrane cellulaire [30], [28]. Cette hypothèse a été vérifiée pour la première fois par Natkanski *et al.* [27] en 2011, puis par Spillane et Tolar [18] en 2016. Nous présentons ici les principaux faits expérimentaux.

2.1) Utilisation de substrats de rigidités différentes

De manière à savoir si l'endocytose des antigènes se fait par action mécanique de la membrane cellulaire, Spillane et Tolar [18] ont utilisé des substrats de rigidités différentes pour la formation de la synapse. Ils ont choisi d'utiliser des bicouches lipidiques, rigides, et des feuillettes de membrane cellulaire, moins rigides. Les rigidités de ces deux substrats ont été mesurées à l'aide de mesures de forces à l'AFM (pour « Atomic Force Microscopy »). Nous présentons le principe des mesures et les résultats.

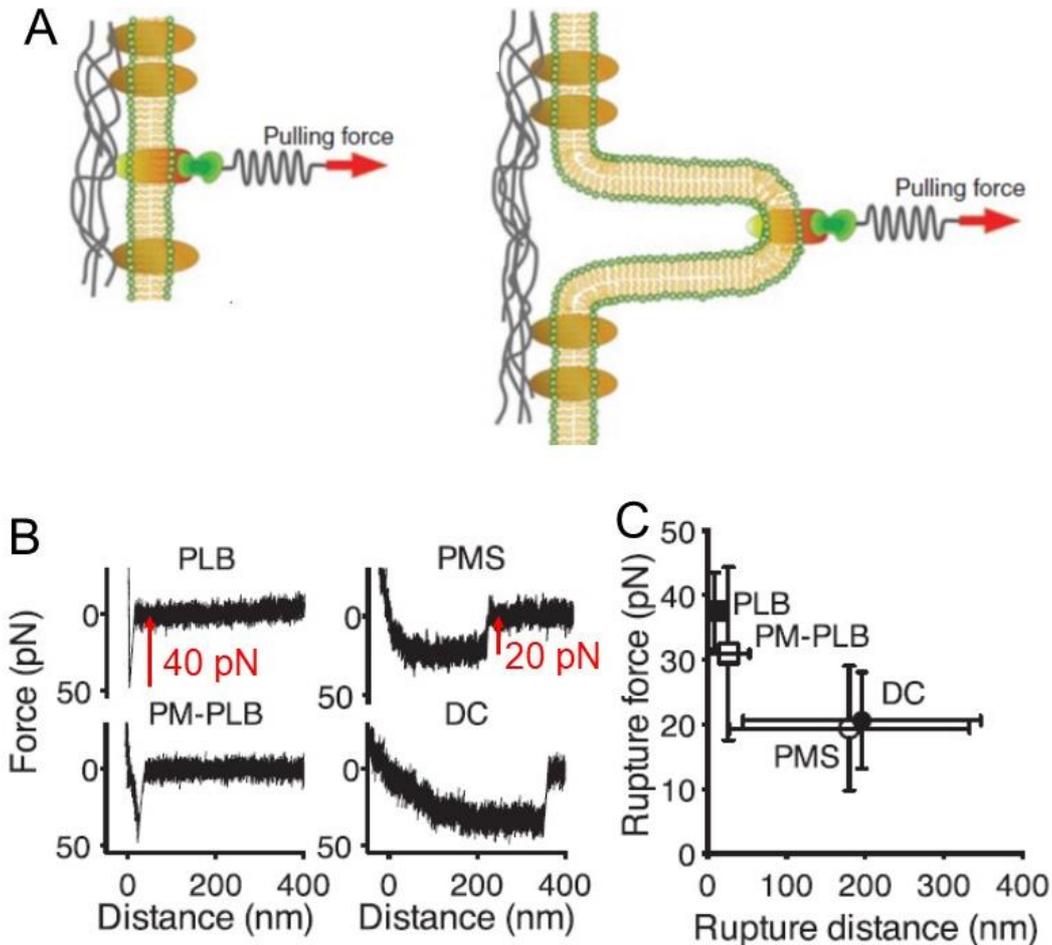


Figure 21. (A) Schéma de la membrane cellulaire tirée par la pointe d'un AFM. Une protéine membranaire est liée à la pointe. La force augmente jusqu'à une valeur limite où le lien se casse. De la force limite peut être déduite la rigidité de la membrane (schéma issu de [31]). (B) Mesure de rigidité de bicouche lipidique (PLB), de feuillet de membrane cellulaire (PMS), et de membrane de cellules dendritiques (DC) à l'aide d'un AFM (Atomic Force Microscopy). La pointe de l'AFM couverte de streptavidine se lie avec les antigènes biotinylés de la surface. La force mesurée par la pointe de l'AFM est tracée en fonction de la distance entre cette pointe et la surface. Les flèches rouges indiquent la rupture du lien, et l'amplitude de cette rupture donne la valeur de la force. (C) Forces mesurées en fonction de la distance de rupture pour des surfaces rigides (PLB, PM-PLB) et des surfaces moins rigides (PMS, DC). Pour le PLB la force mesurée est de 40 pN et pour les PMS la force est de 20 pN, comparable à celle des DC (courbes issues de Natkanski *et al.* [32]).

La pointe d'un AFM est couverte de streptavidine et les antigènes présents sur la membrane sont biotinylés. La pointe de l'AFM est mise en contact avec la membrane, puis est tirée jusqu'à ce que le lien streptavidine-biotine se casse. La force du lien streptavidine-biotine étant connue et la distance de retrait de la pointe étant mesurée, la rigidité de la membrane est déduite [33] [31] (voir schéma de la Figure 21A).

La Figure 21B montre la force mesurée en fonction de la distance de retrait dans le cas de la bicouche lipidique (PLB), des feuillet de membranes cellulaire (PMS), et de la membrane d'une cellule dendritique (DC). Dans le cas de la bicouche lipidique, la rupture, caractérisée par

un saut de force, intervient pour une distance de l'ordre de quelques nanomètres. L'amplitude du saut est de l'ordre de 40 pN. Dans le cas des PMS et de la DC, l'amplitude du saut est de l'ordre de 20 pN et la distance de rupture de l'ordre de 200 nm. La Figure 21C résume ces résultats en montrant la force en fonction de la distance de rupture. On conclut de ces mesures que les PMS sont moins rigides que les PLB, et que la rigidité des PMS est du même ordre de grandeur que celle des DC.

2.2) Résultats des mesures du nombre d'antigènes extraits

Les mesures du nombre d'antigènes extraits des PLB ou des PMS ont été réalisées pour la première fois par Natkanski *et al.* [27] en 2011. Les résultats obtenus ont été confirmés cinq ans plus tard par Spillane et Tolar [18], en utilisant une mesure du nombre d'antigènes extraits par nano-capteurs à ADN. Nous présentons ici les résultats de Spillane et Tolar, bien qu'ils soient similaires à ceux de Natkanski *et al.*

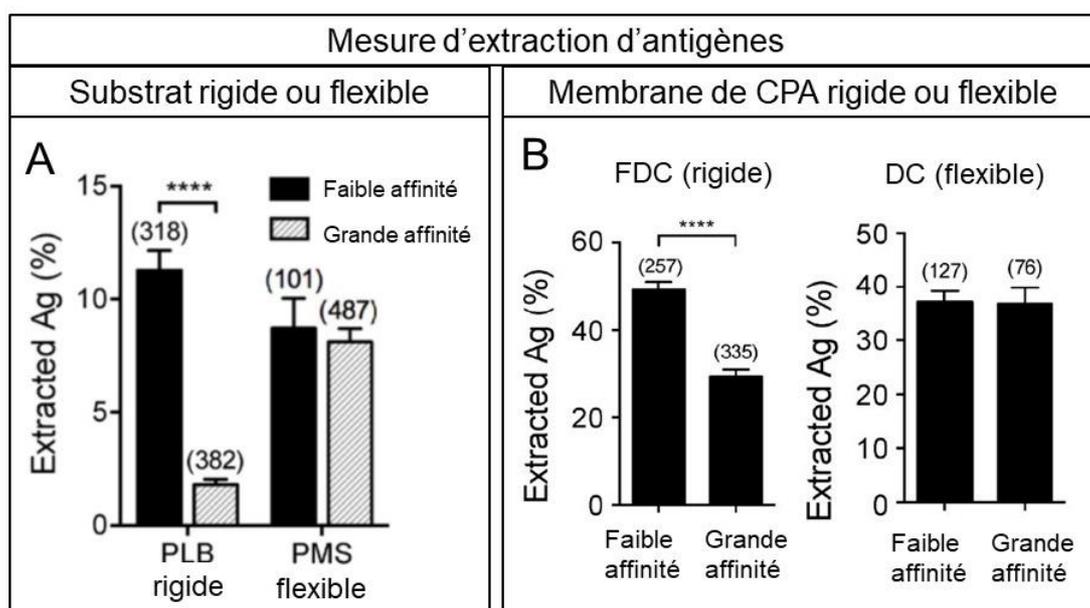


Figure 22. Résultats des mesures de Spillane et Tolar [18]. Mesures du pourcentage d'antigènes extraits par des cellules B de même type de substrats de rigidités différentes (A), et de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) possédant des membranes de rigidités différentes (B). Le nombre de cellules B analysées pour chaque pourcentage est indiqué entre parenthèses. Le nombre d'antigènes extraits est mesuré par des nano capteurs à base d'ADN. (A) Pour un substrat rigide comme une bicouche lipidique (PLB), le nombre d'antigènes extraits est grand pour une affinité faible entre antigènes et RCB, et le nombre d'antigènes extraits est faible pour une affinité grande entre antigènes et RCB. Pour un substrat peu rigide comme des feuillet de membrane cellulaire (PMS), le nombre d'antigènes extraits est sensiblement le même selon l'affinité entre l'antigène et le RCB. (B) Pour des cellules dendritiques folliculaires (FDC), le nombre d'antigènes extraits est plus grand dans le cas d'une faible affinité que dans le cas d'une grande affinité. Pour des cellules dendritiques conventionnelles (DC) dont la membrane est plus souple que les FDC, le nombre d'antigènes extraits est le même pour deux affinités différentes.

La Figure 22A montre les résultats des mesures du nombre d'antigènes extraits d'une bicouche lipidique (PLB) ou d'un feuillet de membranes cellulaires (PMS). Le feuillet de membranes cellulaires est plus dur mécaniquement que la bicouche lipidique. Pour chaque surface, la mesure est faite avec des antigènes ayant une grande affinité pour les RCB et des antigènes ayant une faible affinité pour les RCB. On constate que dans le cas de la bicouche lipidique, les antigènes possédant une faible affinité pour les RCB sont internalisés en quantité plus importante (6 fois plus) que les antigènes possédant une grande affinité pour les RCB. Dans le cas du feuillet de membrane cellulaire, le nombre d'antigènes extraits est sensiblement le même selon l'affinité des antigènes pour le RCB. On voit ici que suivant la rigidité du substrat portant les antigènes, le nombre d'antigènes extraits peut varier selon l'affinité.

La Figure 22B montre le nombre d'antigènes extraits de deux types de CPA possédant des membranes de rigidités de différentes : les cellules dendritiques folliculaire (FDC) et les cellules dendritiques conventionnelles (DC). Des mesures de tension de membrane à l'AFM (Atomic Force Microscopy) ont montré que la membrane des FDC était plus rigide que celle des DC. Dans chaque cas, deux types d'antigènes sont utilisés : des antigènes présentant une grande affinité avec les RCB (NIP¹⁰), et d'autres présentant une faible affinité pour les RCB (NP¹⁰). On voit que pour ces deux types de cellules, le nombre d'antigènes extraits est différent selon l'affinité des antigènes avec les RCB.

2.3) Observations de déformations de la surface

Natkanski *et al.* [27] ont observé l'internalisation de lipides des PMS, associée à des déformations de la surface. Ces observations ont ouvert la voie vers des interprétations d'ordre mécanique. Nous présentons ici les principaux faits expérimentaux.

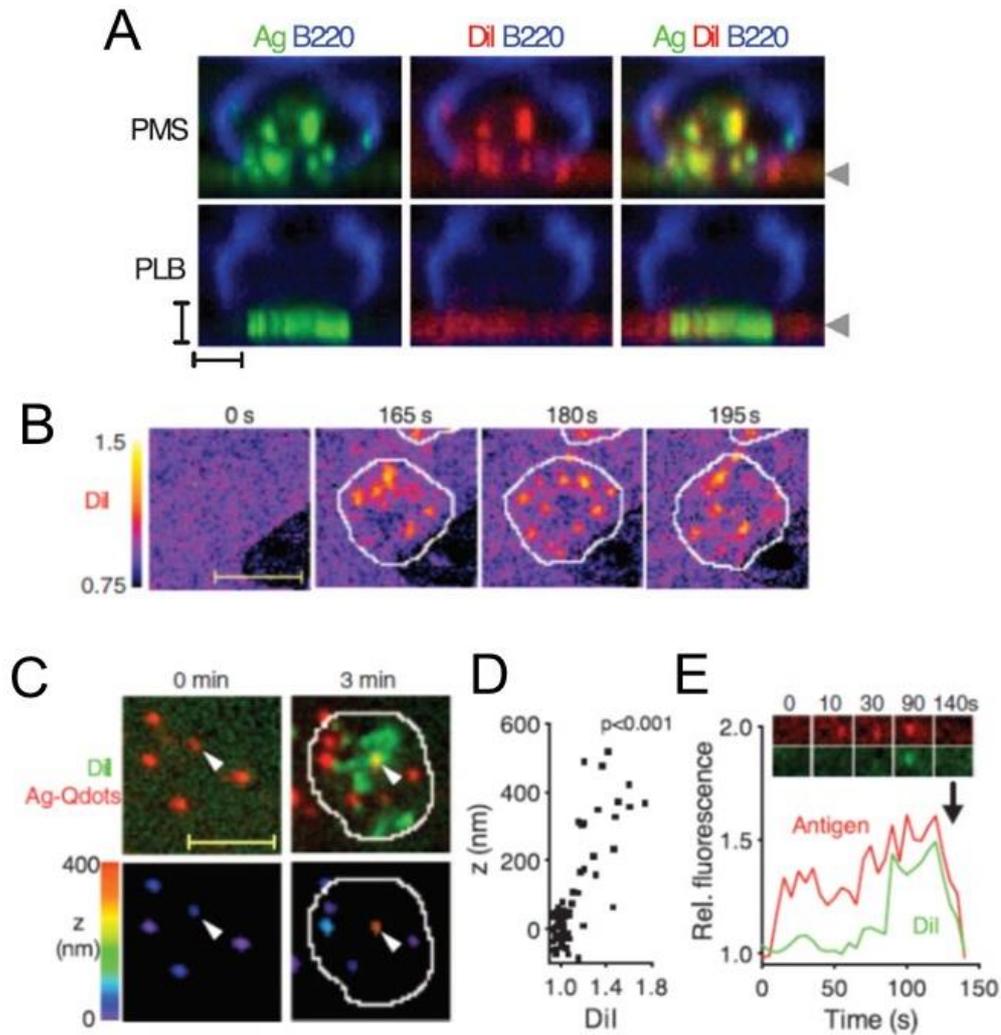


Figure 23. Résultats des expériences de Natkanski *et al.* [27]. (A) Reconstruction d'une vue de côté d'une cellule B formant des synapses avec une surface couverte de Dil (en rouge) et d'antigènes (en vert), pour des PMS (en haut) et une PLB (en bas). Le Dil est un colorant hydrophobe se liant aux lipides de la membrane. On constate que la cellule internalise des morceaux de membrane avec les antigènes dans le cas des PMS. Dans le cas de la PLB, il n'y a pas d'internalisation d'antigènes. (B) Images au TIRF montrant les variations dans le temps de la fluorescence du Dil pour une cellule B en contact avec des PMS couverte d'antigènes. Les pics de fluorescence apparaissent et disparaissent dans le temps. (C) Localisation en trois dimensions des antigènes (en rouge) à $t = 0$ min et $t = 3$ min. Le Dil est marqué en vert. Les pics en fluorescence des antigènes correspondent à des augmentations de hauteur de la surface associés à une concentration en lipides. (D) Correspondance entre la hauteur de la surface et la fluorescence en Dil. Plus la fluorescence en Dil est élevée, plus la hauteur est grande. (E) Fluorescence des antigènes et du Dil en fonction du temps pour un spot donné. La flèche indique l'internalisation de l'antigène. Les barres d'échelle correspondent à $5 \mu\text{m}$.

Natkanski *et al.* ont mis en contact des cellules B avec des PLB et des PMS. Ils ont marqué les lipides des membranes avec un colorant hydrophobe (Dil). La Figure 23A montre une reconstruction d'une vue de côté d'une cellule B en contact avec des PMS (en haut) et une PLB (en bas). L'antigène est marqué en vert et le Dil est marqué en rouge. On constate une internalisation des antigènes dans le cas des PMS, et pas d'internalisation d'antigènes dans le cas

de la PLB, comme attendu d'après les résultats présentés précédemment. On constate également l'internalisation de morceaux entiers de membranes lipidiques dans le cas des PMS. Ces morceaux de membranes sont localisés au même endroit que les antigènes.

La Figure 23B montre une séquence d'images prises au TIRF montrant l'apparition et la disparition de pics fluorescents de Dil au cours du temps. On voit que le Dil se concentre en des points et que l'apparition et la disparition de ces points se font sur des temps courts (de l'ordre de 20 secondes).

La Figure 23C montre la localisation à trois dimensions des antigènes (marqués en rouge), associée à la visualisation du Dil (en vert). On voit que les pics fluorescents d'antigènes sont associés à une déformation des PMS. Les amplitudes de déformations sont inférieures à 100 nm. La Figure 23D montre l'amplitude des déformations du substrat (PMS) en fonction de la fluorescence du Dil. On constate que plus le patch de Dil est fluorescent, plus la déformation est importante. Enfin, la Figure 23E montre la fluorescence d'un patch fluorescent d'antigène et de Dil au cours du temps, montrant que leur augmentation et diminution jusqu'à l'internalisation sont corrélées.

Toutes ces observations faites par Natkanski *et al.* suggèrent une extraction des antigènes par une déformation mécanique du substrat. De plus, elles montrent que l'extraction par voie mécanique est un processus dynamique et local.

3) Explication des deux mécanismes

3.1) Notions d'énergie de déformation de bicouches lipidiques

Le phénomène d'endocytose des antigènes chez la cellule B nécessite une déformation de la membrane cellulaire. Cette déformation a un coût énergétique qui est fourni par les protéines de la cellule, comme par exemple les moteurs moléculaires [28]. La taille typique d'une déformation de la membrane conduisant à un endosome est de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres, l'épaisseur de cette membrane étant d'environ 5 nm. Ces ordres de grandeurs sont à comparer à la taille typique d'une cellule de quelques microns.

La membrane cellulaire, sous l'action des protéines intracellulaires peut former des « puits » de différentes formes : des tubes cylindriques de rayon R_t ou des sphères de rayon R (voir schéma de la Figure 24A). Les courbures associées sont $C = 1/R_t$ pour le tube et $C = 2/R$ pour la sphère. D'un point de vue physique, l'énergie nécessaire pour plier une bicouche lipidique et lui imposer une courbure locale C est donnée par la formule [34] :

$$F_b = \frac{\kappa}{2} C^2$$

avec κ est le coefficient d'élasticité de la membrane et C la courbure locale de la membrane. Cette énergie (F_b) peut être directement fournie par les moteurs moléculaires tels que les kinésines, dynéines ou myosines. Ces molécules se lient aux membranes et tirent dessus en utilisant l'énergie produite par hydrolyse de l'ATP, en se déplaçant le long de microtubules (dans le cas des kinésines et dynéines) ou le long des filaments d'actine (dans le cas de la myosine) (voir Figure 24B).

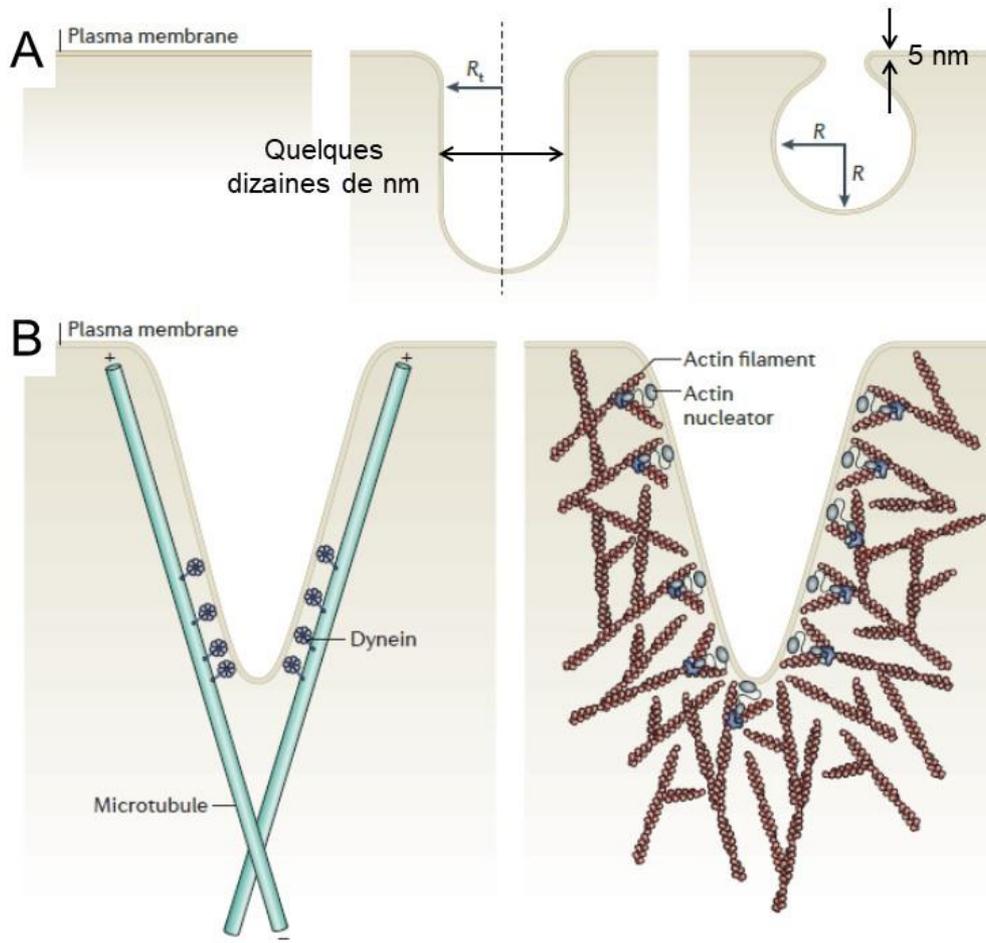


Figure 24. Schémas issus de [28] illustrant les mécanismes de déformation de membrane cellulaire conduisant à la formation de l'endosome. (A) La membrane cellulaire est plate en l'absence de protéines. Sous l'action des protéines intracellulaires, la membrane peut prendre la forme d'un tube de rayon R_t ou d'une sphère de rayon R , correspondant à des courbures égales à $C = 1/R_t$ pour le tube, et $C = 2/R$ pour la sphère. L'ordre de grandeur typique du tube est de quelques dizaines de nanomètres, l'épaisseur de la membrane cellulaire étant d'environ 5 nm. (B) A gauche, membrane cellulaire déformée sous l'action de la dynéine, un moteur moléculaire, se déplaçant sur les microtubules. A droite, implication du réseau de filaments d'actine dans la déformation.

3.2) Présentation des deux mécanismes

Nous présentons ici les interprétations des expériences de Yuseff *et al.* d'un côté, et celles de Natkanski *et al.* et Spillane et Tolar de l'autre. L'interprétation des expériences de Yuseff *et al.* repose sur la sécrétion d'enzymes par les liposomes, alors que les résultats de Spillane et Tolar suggèrent que les propriétés physiques de la surface portant les antigènes jouent un rôle dans l'extraction des antigènes.

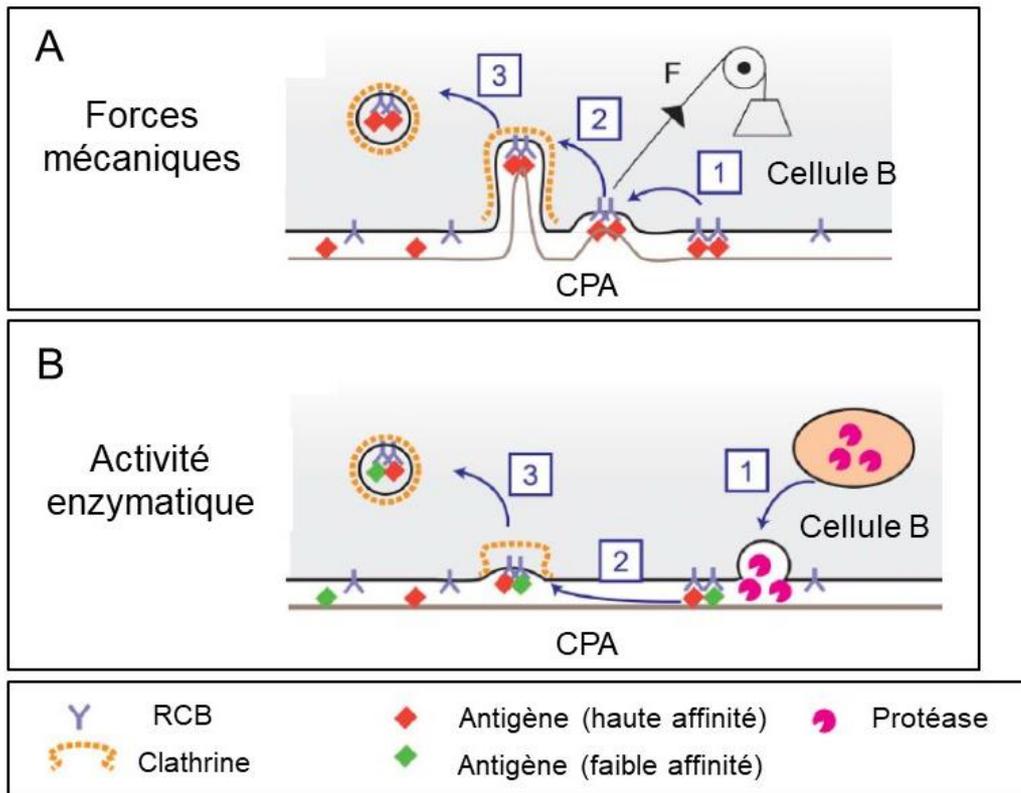


Figure 25. (A) Schéma du mécanisme d'extraction des antigènes par la cellule B par action mécanique. Des forces mécaniques poussent sur le complexe antigène - RCB (1), formant un puit dans la membrane cellulaire entouré de clathrine (2), puis la membrane se ferme sur elle-même pour former une vésicule contenant le complexe antigène - RCB (3). (B) Schéma du mécanisme d'extraction d'antigènes par action enzymatique. Après polarisation du lysosome à la synapse, la cellule B sécrète des hydrolases (1) qui induisent la libération des antigènes du substrat (2). Les antigènes solubles sont alors internalisés (3) (schémas issus de [29]).

La Figure 25A schématise les différentes étapes de l'extraction des antigènes par des processus mécaniques [29]. La membrane cellulaire tire sur le complexe antigène - RCB (1 et 2), formant ainsi une poche entourée de clathrine. Puis la poche se ferme pour former une vésicule contenant le complexe antigène - RCB (3).

Le second mécanisme proposé, schématisé sur la Figure 25B, repose sur la sécrétion d'enzymes induisant la dégradation des antigènes au niveau de la synapse immunologique [26], [29]. Le lysosome délocalisé proche de la synapse délivre des hydrolases dans le milieu extracellulaire qui ont pour action de libérer les antigènes de leur surface (1 et 2). Puis les antigènes solubles sont internalisés (3).

La part de ces deux mécanismes dans le phénomène d'extraction des antigènes par les cellules B est restée mal connue jusqu'en 2016 avec les travaux de Spillane et Tolar.

3.3) Explication des expériences de Spillane et Tolar

Les travaux de Spillane et Tolar [18] reposent sur l'utilisation de nano-capteurs à ADN permettant de distinguer le nombre d'antigènes extraits par action enzymatique du nombre

d'antigènes extraits mécaniquement. Ils ont montré que l'intervention d'un des deux mécanismes excluait l'intervention de l'autre, et que les propriétés physiques de la surface présentant l'antigène déterminaient lequel des deux mécanismes était utilisé.

Les mesures faites avec le nano-capteur à ADN montrent que le nombre d'antigènes extraits par la cellule B varie suivant la rigidité de la surface, suggérant une internalisation par déformation mécanique de la membrane cellulaire. Nous allons voir que des considérations purement mécaniques permettent d'expliquer les résultats expérimentaux.

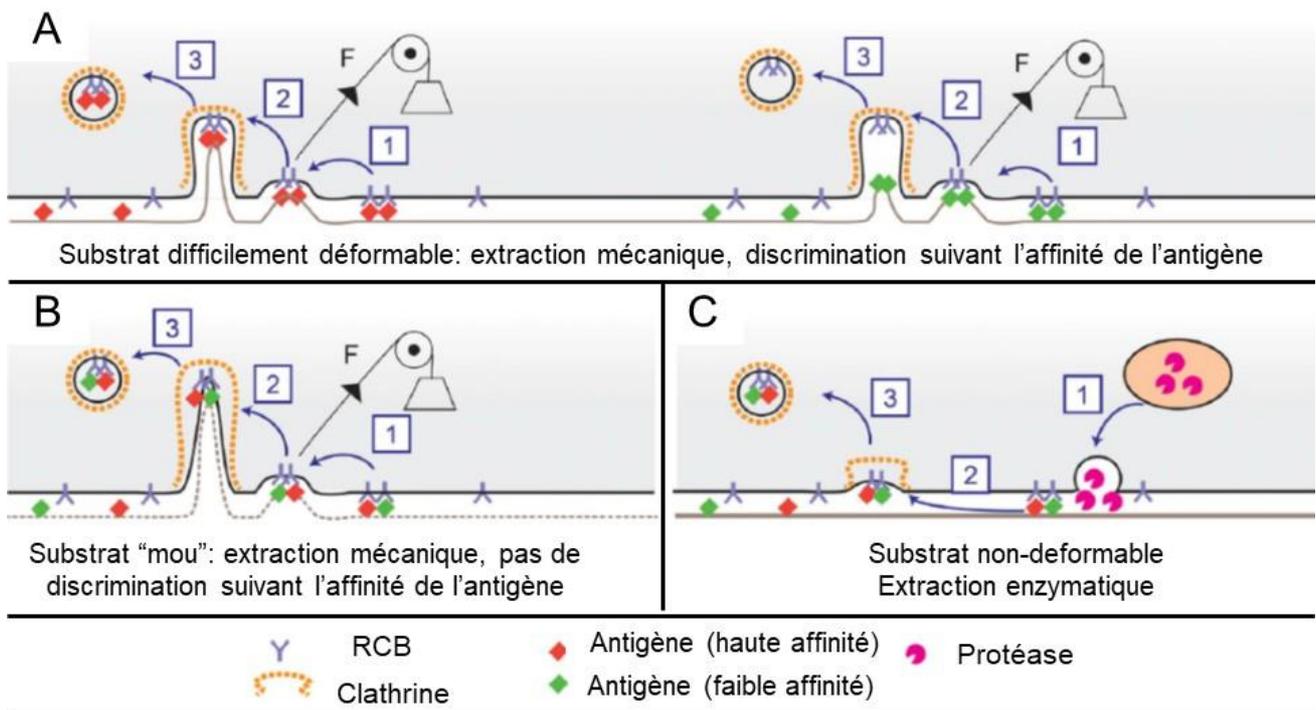


Figure 26. (A) Schéma de l'extraction mécanique des antigènes pour un substrat difficilement déformable, dans le cas d'une grande affinité antigène - RCB (diamants rouges) à gauche, et dans le cas d'une faible affinité antigène - RCB (diamants verts) à droite (schéma issu de [29]). Dans le cas d'une forte affinité, tous les complexes antigène - RCB sont internalisés, tandis que dans le cas d'une faible affinité, les antigènes se détachent des RCB sous la tension. (B) Schéma de l'extraction mécanique des antigènes pour un substrat facilement déformable. Les antigènes ayant une faible affinité avec les RCB restent attachés aux RCB car la tension est moins grande que dans le cas d'une surface difficilement déformable. (C) Schéma de l'extraction des antigènes dans le cas d'une surface non-déformable. La surface présentatrice des antigènes ne peut pas être étirée par la cellule. Les antigènes sont extraits via une dégradation enzymatique.

La Figure 26 illustre les différents cas rencontrés suivant la rigidité de la surface et l'affinité antigène - RCB [29]. La Figure 26A montre le cas d'une surface difficilement déformable. A gauche, les antigènes (en rouge) ont une grande affinité pour les RCB, et donc ils restent attachés aux RCB lors de l'action mécanique de traction de la membrane cellulaire ; alors qu'à droite, les antigènes (en vert) ont une faible affinité pour les RCB, et donc ils se détachent des RCB sous l'action mécanique de traction de la membrane cellulaire. Cela explique la forte

différence du nombre d'antigènes extraits dans le cas d'une surface dure (la PLB) selon l'affinité antigène – RCB.

La Figure 26B illustre le cas d'une surface facilement déformable. Dans ce cas-là, les antigènes possédant une faible affinité pour les RCB ne sont pas détachés des RCB car la force de traction nécessaire pour tirer le complexe antigène – RCB lié à la surface est plus faible que dans le cas précédent. Cela explique pourquoi dans le cas d'une surface facilement déformable comme la PMS, il n'y a pas de différence du nombre d'antigènes extraits selon l'affinité antigène – RCB.

Il reste le cas où la surface n'est pas déformable, comme par exemple le verre, ou trop dure pour que l'extraction par déformation mécanique soit possible (Figure 26C). Dans ce cas-là, l'extraction par action enzymatique prend le relais : le lysosome sécrète des hydrolases dans le milieu extracellulaire qui détachent les antigènes, et les antigènes viennent se lier aux RCB. Il est à noter que l'action enzymatique n'intervient seulement si l'action mécanique n'est pas possible (surface trop dure à déformer).

Les mesures du nombre d'antigènes extraits par les cellules B sur les DC et les FDC montrent les mêmes résultats que ceux obtenus pour les surfaces PLB et PMS. On peut en déduire que l'extraction des antigènes de ces CPA se fait mécaniquement. Une question ouverte à présent est de savoir comment est produite cette force d'un point de vue biologique [29]. Si la Myosine II a été identifiée comme étant à l'origine de cette force [27], le mécanisme biologique complet de production de cette force n'a pas été identifié pour le moment.

4) Rôle de la myosine dans l'extraction d'antigène

Les myosines représentent une famille très grande de moteurs moléculaires qui ont un rôle important dans la contraction des muscles et la motilité de nombreuses cellules eucaryotes. Leurs fonctions chez les cellules du système immunitaires restent mal connues [35].

La myosine est composée d'une partie motrice (appelée « moteur ») et d'une queue. En tant que moteur moléculaire, cette protéine utilise l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour produire de l'énergie mécanique. Les myosines de classe I et II sont les plus présentes dans les cellules B. Ces deux types de myosines diffèrent de par leur structure et leurs fonctions chez la cellule eucaryote. La myosine II est bien connue pour exercer des forces de contractions sur les microfilaments d'actine, alors que la myosine I est impliquée dans la stabilisation et la modification de la membrane cellulaire (voir schémas issus de [35] de la Figure 27A et B).

Vascoto *et al.* [36] ont montré que l'apparition de clusters de complexe d'histocompatibilité majeur était couplée à des contractions de la cellule B et à l'activation de la myosine II. La Figure 27A à droite montre une séquence d'images d'une cellule B activée par le substrat. Les flèches noires montrent les zones où la membrane est contractée. Vascoto *et al.* montrent que ces contractions sont associées à une production de myosine II.

Il a été supposé récemment que la myosine II intervenait dans l'extraction mécanique des antigènes par les cellules B [29], puisque ce procédé d'extraction se fait par déformation de la membrane cellulaire.

La myosine I est également présente chez les cellules B. Maravillas *et al.* [37] ont montré que les microvillosités des cellules B activées étaient riches en myosine I. La Figure 27B à droite montre une image d'une cellule B dans un état non activé et dans un état activé. Dans l'état activé,

la cellule s'étend et sa membrane forme des microvillosités. On constate la présence de myosine 1C marquée en vert. Maravillas *et al.* [37] ont montré que l'expansion de la membrane cellulaire dépendait de la myosine 1C.

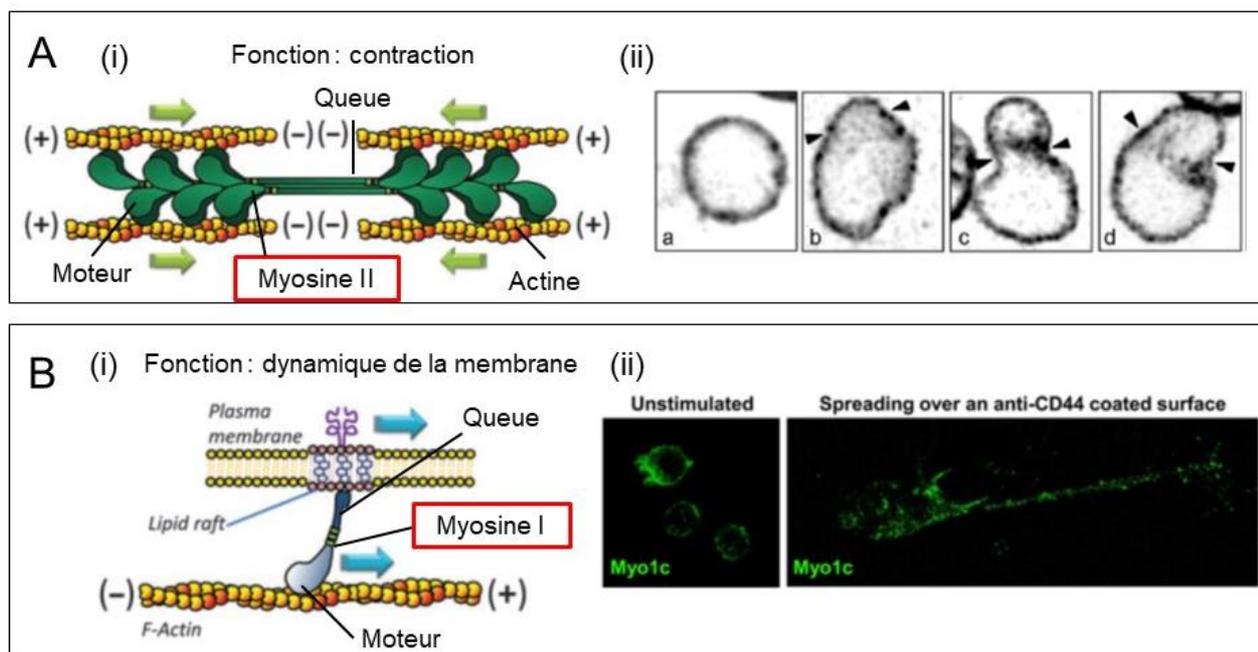


Figure 27. Présentation des myosines I et II et de leur rôle chez les cellules B. (A)(i) Schéma d'une myosine II composée d'une queue et de deux moteurs et exerçant une force de compression sur les microfilaments d'actine (schéma issu de [35]). (ii) Images d'une cellule B activée. Les flèches noires indiquent les parties contractées de la membrane, correspondant à des zones d'activation de la myosine II (images issues de [36]). (B)(i) Schéma d'une myosine I composée d'une queue et d'un moteur. La myosine I permet notamment la régulation des protéines transmembranaires (schéma issu de [35]). (ii) Images d'une cellule B non stimulée (à gauche) et stimulée par des anticorps (à droite). La myosine 1C est marquée en vert. Lorsqu'elle est stimulée, la cellule B s'étale en formant des lamellipodes et microvillosités riches en myosine 1C (images issues de [37]).

5) Limites des substrats utilisés

On peut se demander quelles sont les limites de la méthode présentée par Spillane et Tolar, ou en tout cas quelles sont les informations relatives à la force que la cellule B exerce sur le substrat qui ne sont pas données. La principale remarque qu'on peut faire du point de vue de la biophysique, est l'utilisation de substrats plats, alors que la cellule présentatrice d'antigènes possède une forme ronde. On peut penser que cet aspect géométrique a une influence sur le comportement de la cellule B.

Les billes de polystyrène couvertes d'antigènes utilisées par Yuseff *et al.* [26] ne sont pas déformables donc ne permettent pas la mesure de forces cellulaires.

Dans la suite, nous proposons un matériau innovant pour la présentation d'antigènes, possédant une forme ronde. De plus, il est potentiellement déformable, donc la mesure de forces reste possible, et liquide permettant la diffusion des anticorps en surface.

IV) Idée de l'utilisation de gouttes fonctionnalisées par des anticorps comme substrat pour les cellules B

Nous avons vu que la formation de la synapse immunologique fait appel à des phénomènes dynamiques liés à une expansion et à une déformation mécanique de la membrane cellulaire. Nous proposons l'utilisation de gouttes d'huile d'émulsion fonctionnalisées avec des anticorps en surface comme substrat présentant les antigènes. Ces objets possèdent l'avantage d'être à la fois ronds, déformables et liquides.

1) Présentation des gouttes d'huile d'émulsion fonctionnalisées

Au laboratoire, nous avons développé des méthodes de fabrication et de fonctionnalisation de gouttes d'émulsion [38]. Ces gouttes d'huile possèdent à leur surface des anticorps qui peuvent être reconnus par différents types de cellules du système immunitaire, notamment les macrophages [39]. Nous exposons ici les principes des méthodes expérimentales mise en œuvre et les principales caractéristiques physiques et chimiques de ces gouttes.

1.1) Fabrication des émulsions

a) Par cisaillement contrôlé

Une émulsion correspond au mélange de deux liquides immiscibles. Dans notre cas, il s'agit d'une dispersion de gouttes d'huile dans une solution contenant des surfactants.

On considère au départ deux liquides immiscibles comme l'huile et l'eau dans un système fermé (Figure 28A). L'huile étant moins dense que l'eau, elle se place en haut de l'eau à l'équilibre, formant une interface plane qui minimise l'énergie de surface. Former des gouttes d'huile dans l'eau nécessite une augmentation de la surface de l'interface huile/eau. Il faut donc fournir de l'énergie au système pour former des gouttes. Cette énergie provient d'un cisaillement fournit par exemple par une cellule de Couette (décrite plus bas).

Notons que l'émulsion obtenue n'est pas stable, et que si l'on attend assez longtemps, on obtient de nouveau le mélange huile/eau de départ, par des phénomènes de murissement et de coalescence. Les surfactants viennent se placer à l'interface entre l'huile et l'eau et ont un rôle stabilisant.

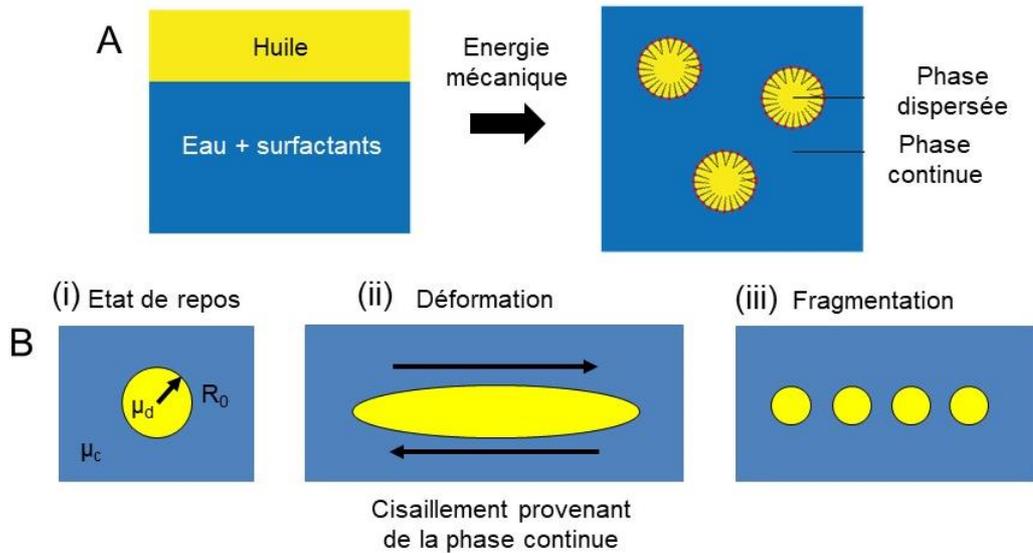


Figure 28. (A) Une émulsion est constituée d'huile et d'une solution aqueuse contenant des surfactants, deux liquides immiscibles. Sous l'action d'une énergie mécanique transférée au mélange, la phase huileuse s'organise en une dispersion de gouttes. Les molécules de surfactant se placent à l'interface des gouttes, ayant un rôle stabilisant. (B) Schéma du principe d'émulsification sous cisaillement. (i) Une goutte à l'état de repos possède un rayon R_0 . Les gouttes constituent la phase dispersée de viscosité μ_d , et la phase continue possède une viscosité μ_c . (ii) Contrainte à un cisaillement de la part de la phase continue, la goutte se déforme. (iii) A partir d'un certain cisaillement, dépendant du rapport des viscosités μ_d/μ_c , la goutte se fragmente en plusieurs petites gouttes (schéma d'après [40]).

Nos émulsions sont constituées d'huile de soja et d'une phase aqueuse contenant des surfactants et de l'alginate de sodium. L'huile de soja présente le principal avantage d'être une huile biocompatible. L'alginate de sodium a pour rôle d'augmenter la viscosité de la phase aqueuse pour permettre un cisaillement plus important de l'huile.

La formation des gouttes d'émulsions a pour origine le cisaillement des gouttes par la phase continue, comme l'a décrit par exemple Taylor [40] pour des gouttes de diamètre de l'ordre du millimètre. Une goutte à l'état de repos possède une forme sphérique, de rayon R_0 (schéma de la Figure 28B(i)). Sous l'action du cisaillement de la phase continue, elle se déforme (ii) jusqu'à ce qu'elle se fragmente en petites gouttes (iii). Celles-ci ne se fragmentent pas si leur pression de Laplace est assez grande devant le cisaillement, si bien que toutes les gouttes, pour un cisaillement donné, possède à la fin de l'émulsification une taille minimale limite.

Lors de l'étape d'étirement de la goutte, le cisaillement visqueux de la phase continue s'oppose à la pression de Laplace de la goutte qui tend à maintenir la goutte sphérique. Le cisaillement s'écrit $\tau = \mu_c D$ avec μ_c la viscosité de la phase continue et D le taux de cisaillement. La demi-pression de Laplace s'écrit $\Delta P = \gamma/R_0$. Le nombre capillaire est défini comme le rapport de la contrainte des forces visqueuses sur la demi-pression de Laplace :

$$Ca = \frac{\mu_c D R_0}{\gamma}$$

Plus ce nombre capillaire est grand, plus la goutte est étirée, jusqu'à atteindre un nombre capillaire limite Ca_{lim} pour lequel il y a fragmentation. Taylor a remarqué que le nombre capillaire limite dépendait du rapport des viscosités $Rap = \mu_d/\mu_c$. En effet, pour $Rap \approx 1$, Taylor

trouve $Ca_{lim} \approx 0,5$, alors que lorsque Rap dépasse quelques unités, Ca_{lim} tend vers l'infini : la goutte ne casse pas, elle atteint une forme d'équilibre sous écoulement.

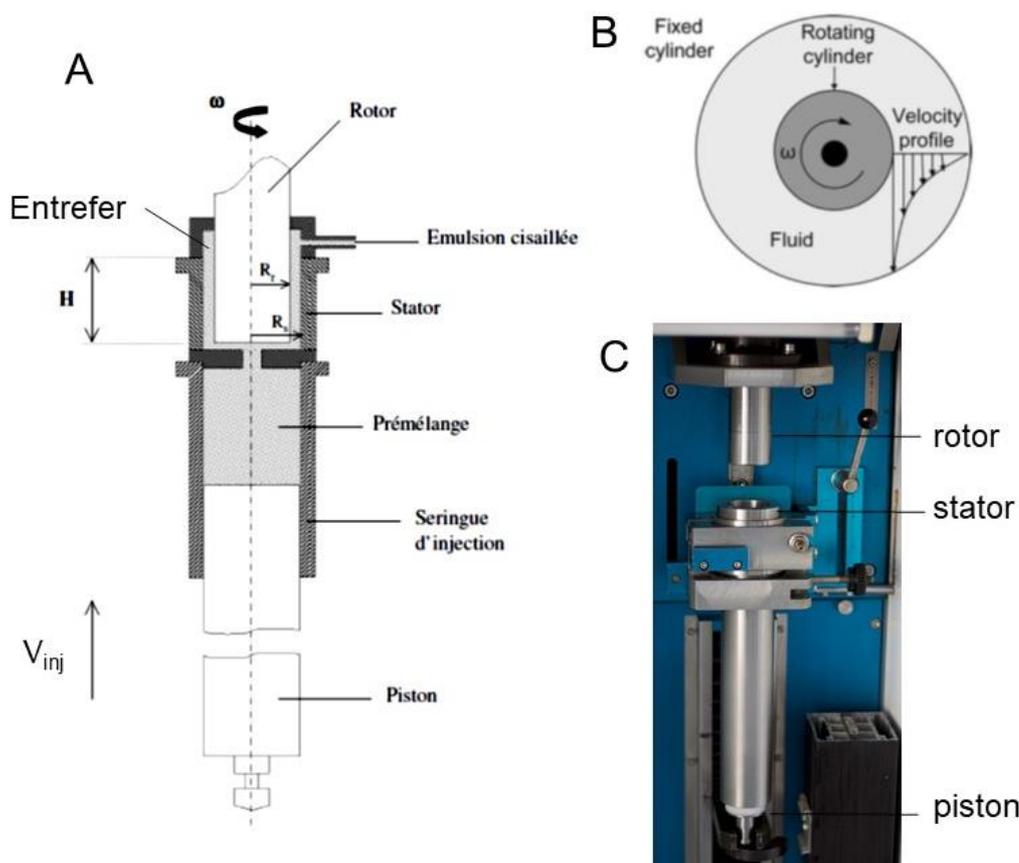


Figure 29. (A) Schéma de la cellule de Couette permettant l'émulsification. Le pré-mélange d'huile et d'eau contenant des surfactants et de l'alginate est introduit dans la seringue d'injection. Ce pré-mélange est injecté dans l'entrefer à la vitesse V_{inj} , dans lequel il est soumis à un cisaillement constant. (B) Schéma du rotor et du stator vus de haut. Le rotor tourne à une vitesse angulaire ω et le stator est fixe. Le profil de vitesse représenté est associé à un cisaillement constant dans l'entrefer. (C) Photo de notre cellule de Couette.

Dans notre cas, l'émulsion est cisailée par une cellule de Couette, selon la méthode développée par Masson *et al.* [14]. Cette cellule est constituée de deux cylindres métalliques coaxiaux séparés d'un entrefer de $100 \mu\text{m}$. Un pré-mélange d'huile et d'eau contenant des surfactants et de l'alginate de sodium est injecté dans l'entrefer (schéma de la Figure 29A et la photo de la Figure 29C). Le rôle de l'alginate est de rendre la phase continue (l'eau) plus visqueuse, et donc de faciliter la formation de gouttes par fragmentation des gouttes déjà existantes (voir le schéma de la Figure 28B). Le cylindre intérieur tourne à une vitesse angulaire ω (vitesse de l'ordre de 200 tours par minute) alors que le cylindre extérieur reste immobile, imposant ainsi un cisaillement constant dans l'entrefer (schéma de la Figure 29B). Cette méthode présente l'avantage de fabriquer une quantité importante d'émulsion (de 15 à 100 mL) qui peut être conservée durant plusieurs semaines dans une chambre à température régulée à 12°C .

L'émulsion récupérée est diluée et observée au microscope (Figure 30A). La Figure 30B montre une distribution des diamètres des gouttes obtenues avec la cellule de Couette. La

polydispersité en taille typique est de l'ordre de 30 %, ce qui est suffisant pour des expériences de contact avec des cellules. La moyenne de la distribution peut varier de 3 à 12 μm suivant la vitesse de rotation du cylindre intérieur, et la viscosité de la phase aqueuse (ajustement de la concentration en alginate de sodium dans l'eau).

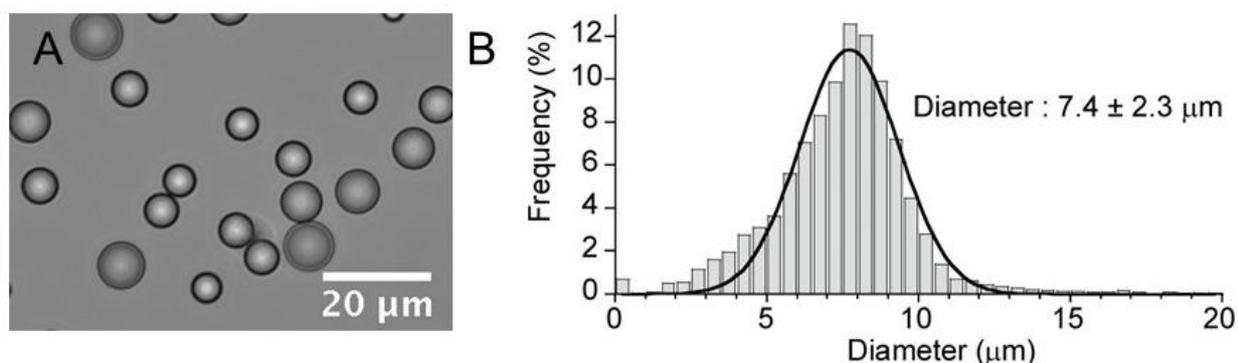


Figure 30. (A) Image au microscope optique de gouttes d'émulsion après passage à la cellule de Couette. (B) Distribution de probabilité des diamètres pour une émulsion donnée après passage à la cellule de Couette. La distribution est ajustée par une courbe de type gaussienne, avec une moyenne à 7,4 μm et un écart type de 2,3 μm , soit une largeur relative de 30 %.

b) Génération de gouttes en microfluidique

Il est aussi possible de générer des gouttes d'huile en microfluidique [41]. L'avantage de ce mode de fabrication est la monodispersité de la distribution en taille des gouttes. Les inconvénients sont le faible débit de production et le fait que les tailles des gouttes sont légèrement plus grosses que celles que nous cherchons à avoir (supérieures à 15 μm en général).

La Figure 31A montre une image de la puce permettant la génération de gouttes d'huile de 14,4 μm de diamètre. Cette géométrie de puce est appelée « flow-focusing ». L'huile, contenant éventuellement des phospholipides, est injectée dans le canal central, et l'eau contenant des surfactants et de l'alginate est injectée par les canaux du haut et de bas. Les gouttes d'huiles se forment à l'intersection des canaux et sont récupérées à l'extrémité du canal central. La hauteur du canal est de 5 μm et la largeur des canaux est de 8 μm . Notons que la dimension des gouttes obtenues est donnée par la plus petite dimension des canaux formant le croisement. Plus cette dimension est faible, plus les gouttes seront petites. Les pressions mises en jeu sont de l'ordre de 300 mbar, pour un débit en sortie de 1 μL /heure. Ce faible débit est dû au fait que les canaux sont étroits et que l'huile employée (huile de soja) est plus visqueuse que l'eau, ce qui donne une grande résistance hydrodynamique pour le système. Le protocole de fabrication de ces gouttes est détaillé en Annexe.

La puce de la Figure 31A est en PDMS, et est collée sur une lame de microscope en utilisant un plasma. Le moule en résine SU-8 a été fabriqué avec la Dilase par écriture directe.

La Figure 31B montre une image au microscope optique des gouttes obtenues. On constate qu'elles possèdent la même taille, et qu'elles forment un réseau régulier par endroits. La distribution en taille des gouttes (Figure 31C) montre un pic centré à 14,4 μm . La courbe rouge est ajustement de type gaussien, d'espérance 14,4 μm et d'écart type 1,0 μm . On obtient donc une population de gouttes monodisperse en taille (écart relatif de 7 %).

La fonctionnalisation par des anticorps n'ayant pas fonctionné de manière reproductible sur ces gouttes faites en microfluidique, nous avons préféré dans la suite utiliser les gouttes fabriquées avec la cellule de Couette. En effet, une cause à cela pourrait être le fait que les phospholipides initialement dans l'huile sont adsorbés sur les parois en PDMS. Quelques expériences de contact avec des cellules B ont néanmoins été faites lorsque la fonctionnalisation a fonctionné, notamment celles avec un marquage du noyau (voir dans la suite).

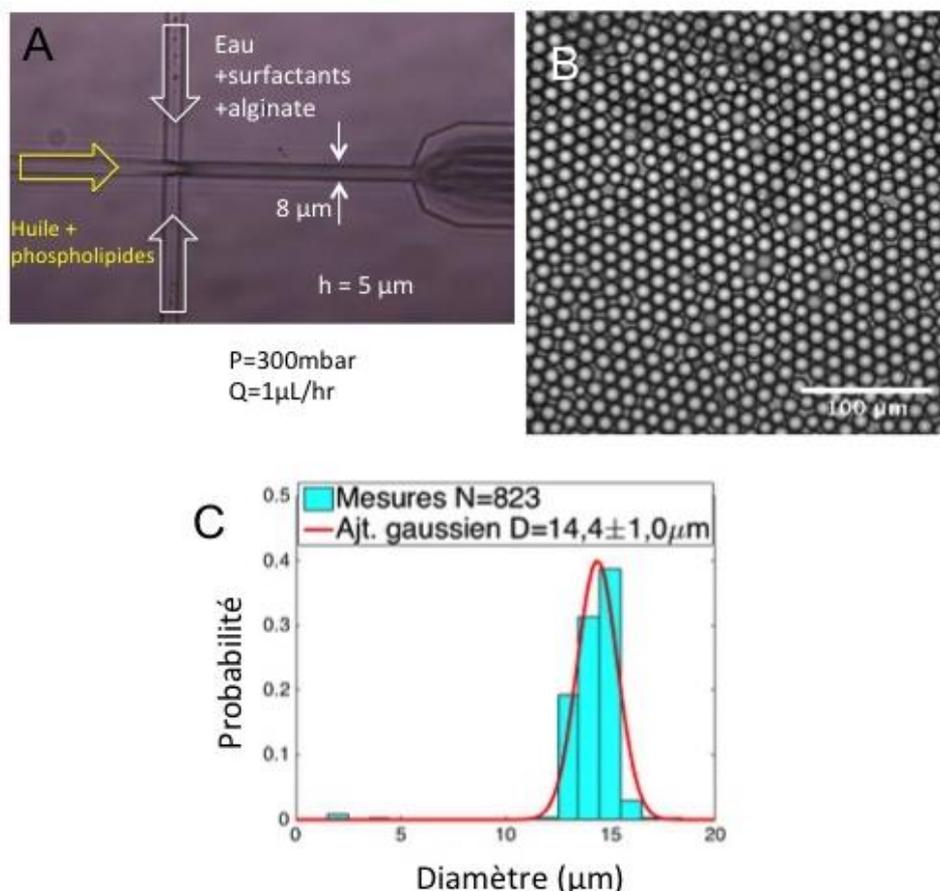


Figure 31. (A) Image de la puce « flow-focusing » permettant de générer des gouttes d'huile de 15 μm de diamètre. L'huile de soja contenant des phospholipides est injectée dans le canal central (flèche jaune), et l'eau contenant des surfactants et de l'alginate est injectée par les canaux du haut et du bas. La hauteur des canaux est de 5 μm . L'épaisseur des canaux est de 8 μm . La pression appliquée est de l'ordre de 300 mbar pour l'huile et l'eau, pour un débit en sortie de 1 $\mu\text{L}/\text{heure}$. (B) Image au microscope optique des gouttes d'huile obtenues, formant un réseau régulier. (C) Distribution des diamètres des gouttes. La courbe rouge est un ajustement de type gaussien d'espérance 14,4 μm et d'écart type 1,0 μm .

1.2) Fonctionnalisation des gouttes d'émulsion

Ces gouttes d'huile obtenues, il faut leur donner une fonction. Nous indiquons le principe de fonctionnalisation dont nous nous inspirons dans la suite de cette étude.

Cette méthode de fonctionnalisation se base sur la présence de phospholipides biotinylés dans l'huile (voir schéma de la Figure 32A). La chaîne hydrophobe du phospholipide est présente dans l'huile, alors que la partie présentant la biotine est dans l'eau. L'ajout d'anticorps fluorescents anti-biotine dans la phase aqueuse permet alors de fonctionnaliser la goutte. La Figure 32B

montre une image en fluorescence d'une goutte d'huile fonctionnalisée par des anticorps fluorescents. Le profil en intensité à droite est tracé suivant la ligne pointillée. On constate que la surface de la goutte est plus intense qu'en volume, indiquant la présence des anticorps en surface de manière uniforme.

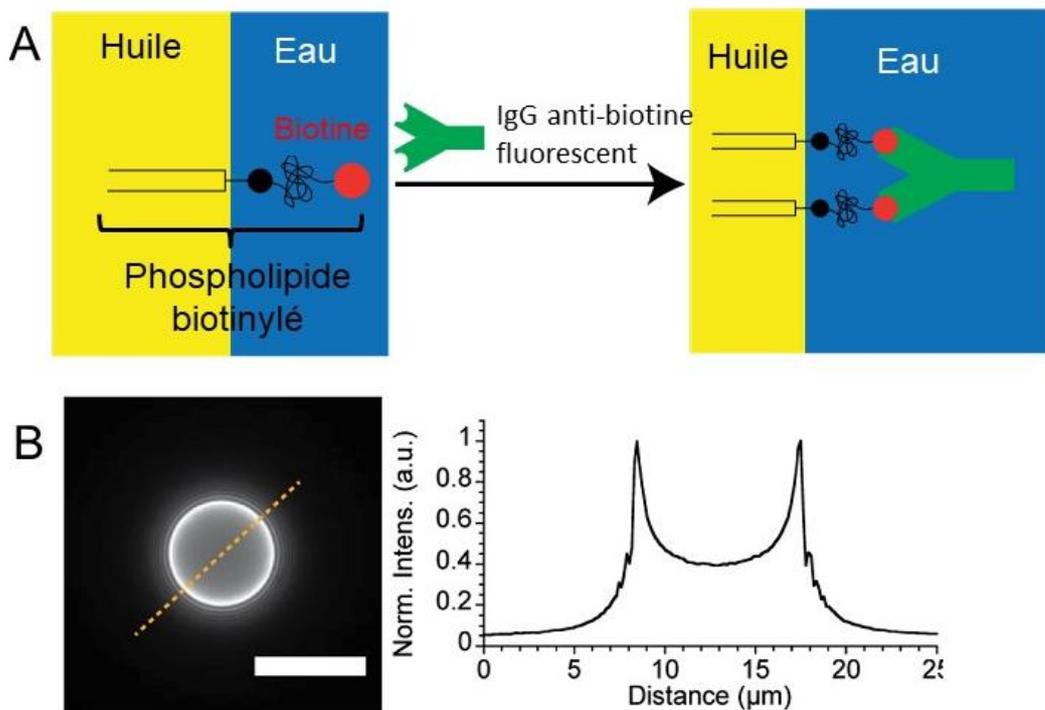


Figure 32. (A) Principe de fonctionnalisation des gouttes d'huile d'émulsion. La phase huileuse contient des phospholipides biotinylés qui se concentrent à l'interface huile/eau étant donné leur caractère amphiphile. L'ajout dans l'eau d'anticorps anti-biotine permet de fonctionnaliser la surface de la goutte. Un fluorophore est attaché à l'anticorps, permettant l'observation par épifluorescence. (B) A gauche, image en fluorescence au microscope optique d'une goutte d'huile fonctionnalisée par des anticorps. A droite, profil en intensité suivant le trait en pointillé. L'intensité est normalisée par rapport au maximum d'intensité. Celui-ci correspond à la surface de la goutte, indiquant que la fonctionnalisation a eu lieu à l'interface huile/eau. La barre d'échelle correspond à 25 µm.

2) Avantages des gouttes par rapport aux substrats déjà utilisés

Les gouttes d'huile d'émulsion étant fonctionnalisables en surface par des anticorps, elles sont des candidats comme substrat pour les cellules B et pour l'étude de la synapse immunologique. La Figure 33A résume les principaux substrats utilisés dans le passé, et illustre les propriétés intéressantes des gouttes d'huile fonctionnalisées (B).

En effet, la première caractéristique intéressante de ces gouttes est le fait que les anticorps présents à la surface sont libres de diffuser. Le coefficient de diffusion latéral des anticorps à la surface des gouttes est de l'ordre de $1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [42], ce qui est 10 à 1000 fois plus grand que les coefficients de diffusivité typiques des protéines transmembranaires de la membrane cellulaire [43]. La vitesse de diffusion des anticorps à la surface des gouttes n'est donc pas limitante par rapport à celle des RCB en surface des cellules B. La diffusion des RCB, ou d'autres types de récepteurs membranaires, peut donc être étudiée à l'aide de ces gouttes [44].

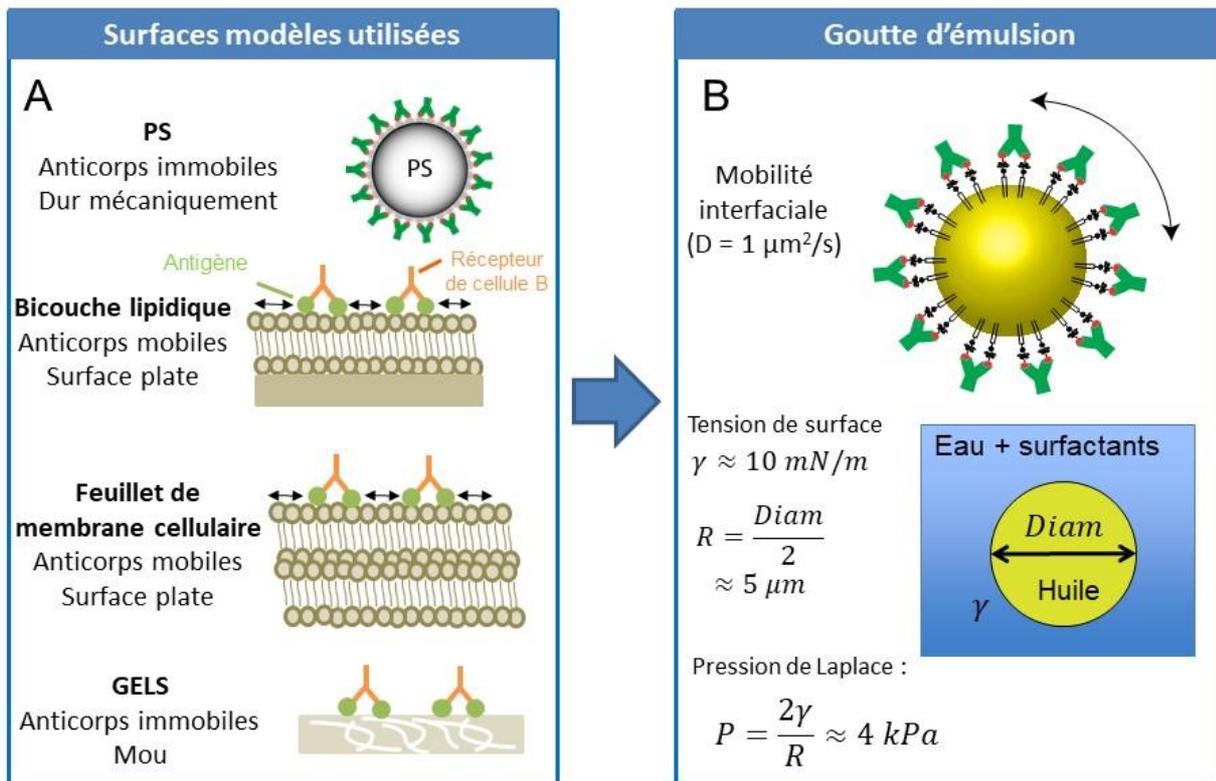


Figure 33. (A) Présentation des différents substrats utilisés pour l'étude de la synapse immunologique. Les particules de polystyrène (PS) d'environ $2 \mu\text{m}$ de diamètre ont pour inconvénients d'être dures mécaniquement et de ne pas permettre la diffusion des antigènes en surface. Les gels sont mous mais les antigènes greffés restent immobiles à la surface. Dans le cas de la bicouche lipidique, les antigènes sont libres de diffuser en surface mais la surface reste rigide. (B) Passage à une goutte d'émulsion fonctionnalisée par des anticorps en surface. La diffusion latérale des anticorps est possible et la goutte est déformable. L'élasticité E est donnée par la pression de Laplace et vaut typiquement 2 kPa pour une goutte de diamètre $10 \mu\text{m}$ et une tension de surface eau/huile valant typiquement 10 mN/m .

Le deuxième avantage de ces gouttes d'émulsion, par rapport notamment aux billes de polystyrène utilisées dans le passé [26], est le fait qu'elles soient déformables. La rigidité est donnée par la tension de surface γ de l'interface huile/phase aqueuse. Pour une tension de surface typique de $\gamma = 10 \text{ mN.m}^{-1}$ et une goutte de diamètre $Diam = 10 \mu\text{m}$, la pression de Laplace associée à la goutte est donnée par :

$$P = \frac{2\gamma}{R}$$

avec $R = Diam/2$ le rayon de la goutte. Ce qui donne une pression de Laplace de $P = 4 \text{ kPa} = 4 \text{ nN.}\mu\text{m}^{-2}$. L'ordre de grandeur de la force associée à cette pression, qui correspondrait à la force nécessaire pour déformer la goutte est donnée par :

$$F = PS$$

avec $S = \pi \text{Diam}^2$ la demi-surface de la goutte. On obtient alors après calcul une surface de $S = 314 \mu\text{m}^2$, et une force F de l'ordre de $1,6 \mu\text{N}$. Cette valeur de force est environ 100 000 fois plus grande que les forces mesurées par Spillane et Tolar dans le cas de feuillettes de membranes cellulaires ou de bicouches lipidiques. On peut donc s'attendre à ce qu'il n'y ait pas de déformation de la goutte par les cellules B, la cellule trouvant la goutte trop rigide. Néanmoins, nous verrons que la surface de contact entre les cellules B et les gouttes est typiquement de l'ordre de $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m} = 25 \mu\text{m}^2$, ce qui donne pour force associée $F = 120 \text{nN}$. De plus, Spillane et Tollar considèrent eux des surfaces à des échelles moléculaires, puisqu'il s'agit de la formation d'endosomes de taille typique 100 nm, alors que dans notre cas il s'agit de forces exercées à l'échelle de quelques micromètres. Il est donc difficile de comparer ces forces entre elles, car les surfaces mises en jeu sont très différentes (d'un facteur 2000 environ).

Notons enfin que des gels de polyacrylamide ont été utilisés comme substrats « mous » pour les cellules B par Anita Kumari dans le laboratoire de Paolo Pierobon à l'Institut Curie. Ces gels présentent l'intérêt d'avoir un module d'Young bien caractérisé, mais la diffusion en surface des antigènes n'est pas possible car la surface est solide. De la mesure de la déformation du gel, des forces de l'ordre de 10 à 50 nN sont déduites, ces forces n'étant pas forcément liées à une internalisation d'antigènes. On retrouve ici le même ordre de grandeur que la force calculée plus haut dans le cas d'une goutte et en prenant $S = 25 \mu\text{m}^2$.

3) Mise en contact de gouttes fonctionnalisées avec des cellules T

Des expériences de mise en contact de gouttes d'émulsion fonctionnalisées avec des cellules T ont été déjà menées [44]. Les résultats obtenus comportent des similarités avec des expériences de mise en contact de gouttes fonctionnalisées avec des ligands-récepteurs [42]. Nous présentons les expériences de mise en contact de gouttes entre elles dans un premier temps, puis les principales observations faites avec les cellules T.

3.1) Mise en contact de gouttes « complémentaires »

Les expériences de mise en contact de gouttes fonctionnalisées avec des protéines complémentaires de type ligands-récepteurs ont été menée par Bourouina *et al.* [42]. Ces expériences ont consisté à étudier la diffusion à deux dimensions des protéines fonctionnalisées en surface suite à la mise en contact des gouttes.

Les gouttes sont divisées en deux lots : un lot fonctionnalisé avec de la biotine et un lot fonctionnalisé avec de la streptavidine fluorescente (schéma de la Figure 34A). Le principe de fonctionnalisation est le même que celui indiqué plus haut : des phospholipides biotinylés initialement dans l'huile se placent en surface des gouttes, et de la streptavidine fluorescente est ajoutée pour le deuxième lot de gouttes. La Figure 34B montre des images au microscope optique de deux gouttes complémentaires en lumière blanche (à gauche) et en fluorescence (à droite). On constate sur l'image en fluorescence une concentration de streptavidine fluorescente au contact entre les deux gouttes. La Figure 34B en bas montre un profil d'intensité suivant la ligne tracée en pointillé. On constate que la fluorescence du patch est environ 7 fois plus intense que la fluorescence du côté opposé au patch.

Une étude de la dynamique de formation du patch a été faite. La Figure 34C en haut montre l'interface de la goutte fonctionnalisée par de la streptavidine et mise en contact avec la goutte fonctionnalisée par de la biotine. On observe l'apparition du patch dès 1 minute de contact. En bas, l'intensité moyenne du patch a été mesurée en fonction du temps. On constate une forte augmentation au début de la fluorescence, puis l'atteinte d'un plateau. Les points expérimentaux ont été ajustés par une loi exponentielle.

L'établissement de liens à l'échelle microscopique à la surface fluide des gouttes entraîne donc une diffusion à deux dimensions, visible macroscopiquement. Les coefficients de diffusion 2D des protéines impliquées ont été mesurés par Bourouina *et al.* par la technique de FRAP. Cette méthode consiste à exposer l'interface d'une goutte fonctionnalisée par de la streptavidine fluorescente avec un laser, entraînant la dégradation des fluorophores (« bleaching »). Une analyse d'images montrant la réapparition de la fluorescence permet de remonter au coefficient de diffusivité. Les coefficients de diffusivité mesurés dans le cas de la streptavidine sont de l'ordre de $1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [42].

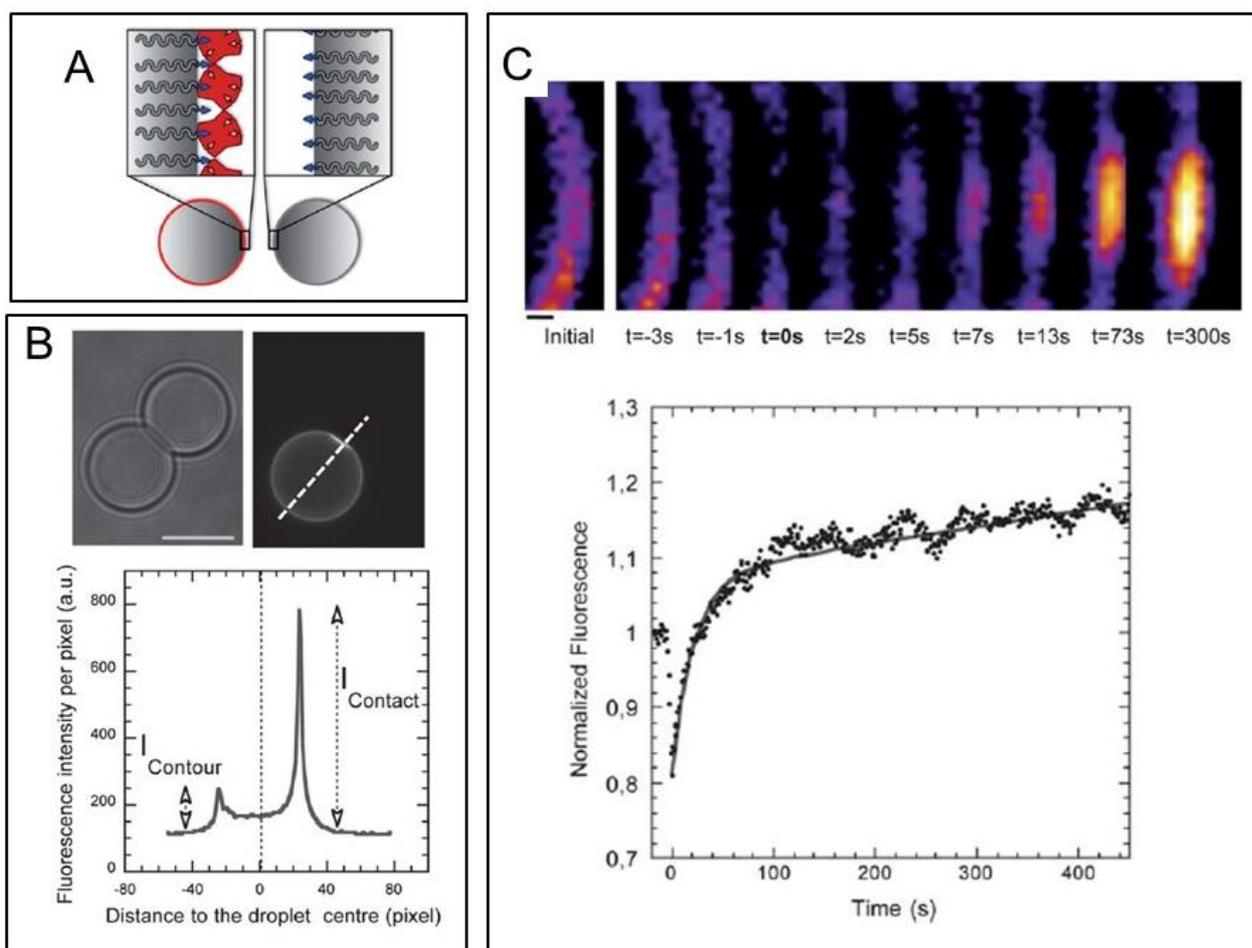


Figure 34. Formation de complexes ligand – récepteur entre deux gouttes, suivant Bourouina *et al.* [42]. (A) Schéma des gouttes d'huile fonctionnalisées par de la biotine (goutte du bas) et par de la streptavidine (goutte du haut). Les phospholipides biotinylés assurent le lien avec la streptavidine liée à un fluorophore. (B) Image au microscope optique de deux gouttes en contact. La goutte du haut est fonctionnalisée seulement avec de la biotine, tandis que celle du bas est fonctionnalisée avec de la streptavidine. L'image en fluorescence (à droite) montre une accumulation de streptavidine dans la zone de contact. En bas, profil en intensité suivant la ligne en pointillé coupant la goutte en deux. (C) En haut,

séquence d'images au microscope optique de la formation du patch. En bas, mesure de la fluorescence moyenne du patch en fonction du temps. Les points expérimentaux sont ajustés par une loi de type exponentielle.

3.2) Mise en contact de gouttes fonctionnalisées par des anticorps avec des cellules T

Des expériences menées par Bourouina *et al.* [44] ont consisté à la mise en contact de gouttes fonctionnalisées par des anticorps avec des cellules T. Comme dans le cas des gouttes « complémentaires », on observe la formation d'un patch fluorescent dans la zone de contact, mais cette fois-ci couplée à des phénomènes de fragmentation.

Les cellules T portent à leur surface des récepteurs dits « CD3 ». Les gouttes d'huile d'émulsion sont fonctionnalisées par des anticorps (dits « anti-CD3 ») pouvant se lier spécifiquement aux récepteurs des cellules T. Les gouttes et les cellules sont placées dans une chambre et observées au microscope optique à épifluorescence. La Figure 35A montre une séquence d'images obtenue. Les récepteurs des cellules T sont marqués en vert et les anticorps anti-CD3 en rouge. La Figure 35B montre la fluorescence dans la zone de contact liée aux récepteurs CD3 des cellules T (ronds remplis) et celle liée aux anticorps anti-CD3 (triangles pleins), en fonction du temps. La fluorescence de la goutte du côté opposé au patch est indiquée par des triangles vides.

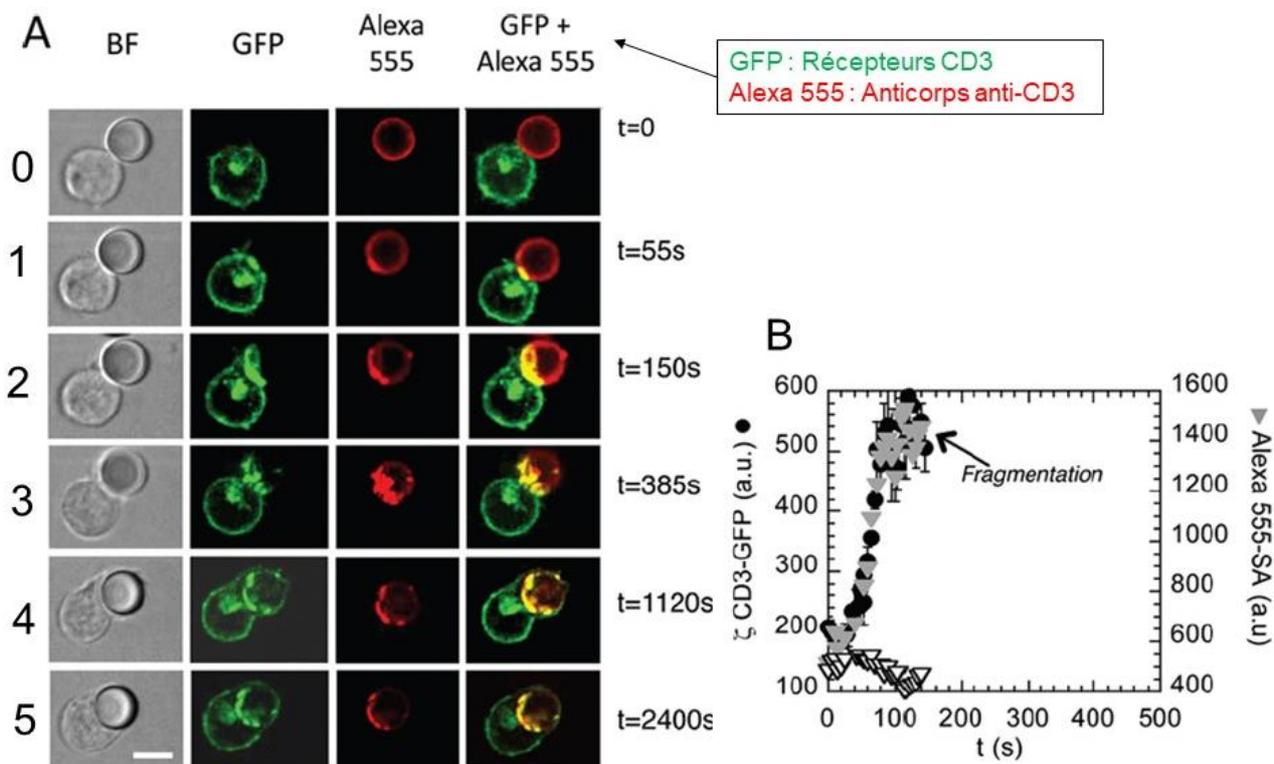


Figure 35. Mise en contact de gouttes d'huile fonctionnalisées avec des cellules T, d'après Bourouina *et al.* [44]. (A) Séquence d'images au microscope optique à fluorescence d'une cellule T portant des récepteurs CD3 (marqués en vert par la protéine fluorescente GFP) mise en contact avec une goutte d'huile fonctionnalisée avec des anticorps anti-CD3 (marqués en rouge par le fluorophore Alexa 555). (B) Intensité de la fluorescence dans la zone de contact des récepteurs CD3 (ronds pleins) et des anticorps anti-CD3 (triangles gris). La fluorescence de l'interface opposée au patch est indiquée par des triangles

vides. La phase 1 de contact à $t = 55$ secondes correspond au recrutement des anticorps anti-CD3 dans la zone de contact. Durant la phase 2, le patch en anticorps anti-CD3 se fragmente et augmente en intensité jusqu'à atteindre un plateau, alors que la membrane de la cellule s'étend dans la zone de contact. Dans la phase 3, le patch se décompose en clusters de ligands-récepteurs. Les phase 4 et 5 ($t = 20$ minutes) montrent une internalisation associée à une expansion de membrane autour de la goutte.

A $t = 55$ secondes après contact (phase 1), on observe l'apparition d'un patch fluorescent assez similaire à celui observé dans le cas de deux gouttes portant des ligands et récepteurs complémentaires. La fluorescence de la zone de contact augmente. A partir de $t = 150$ secondes commencent des événements spécifiques au contact entre goutte et cellule. Durant la phase 2, la surface de contact s'étend et la fluorescence de la zone de contact augmente jusqu'à atteindre un plateau de quelques dizaines de secondes. Puis à $t = 6$ minutes, le patch fluorescent se décompose en plusieurs fragments de liens ligands-récepteurs se déployant autour de la goutte (phase 3). La phase 4 ($t = 19$ minutes) correspond à un déploiement de la cellule autour de la goutte jusqu'à l'internalisation (phase 5), les clusters de ligands-récepteurs se positionnant à la zone de contact initiale. Le processus total dure environ 30 minutes.

La mise en contact de gouttes ne portant pas d'anticorps anti-CD3 avec des cellules T n'a pas donné de patch fluorescent ni de réponse particulière de la cellule T [44]. La reconnaissance spécifique des anticorps anti-CD3 par les récepteurs de la cellule T induit donc la formation du patch et une réponse dynamique de la part de la cellule T.

3.3) Réponse biochimique de la cellule T

De manière à savoir si la reconnaissance des anticorps greffés sur la goutte induisait chez la cellule T une réponse biochimique particulière, Bourouina *et al.* [44] ont mesuré la concentration en calcium dans la cellule T durant le contact avec la goutte anti-CD3. Les cellules sont traitées avec un indicateur de calcium Fura-2 dont l'intensité de fluorescence et la longueur d'onde d'excitation change en fonction de la concentration en calcium.

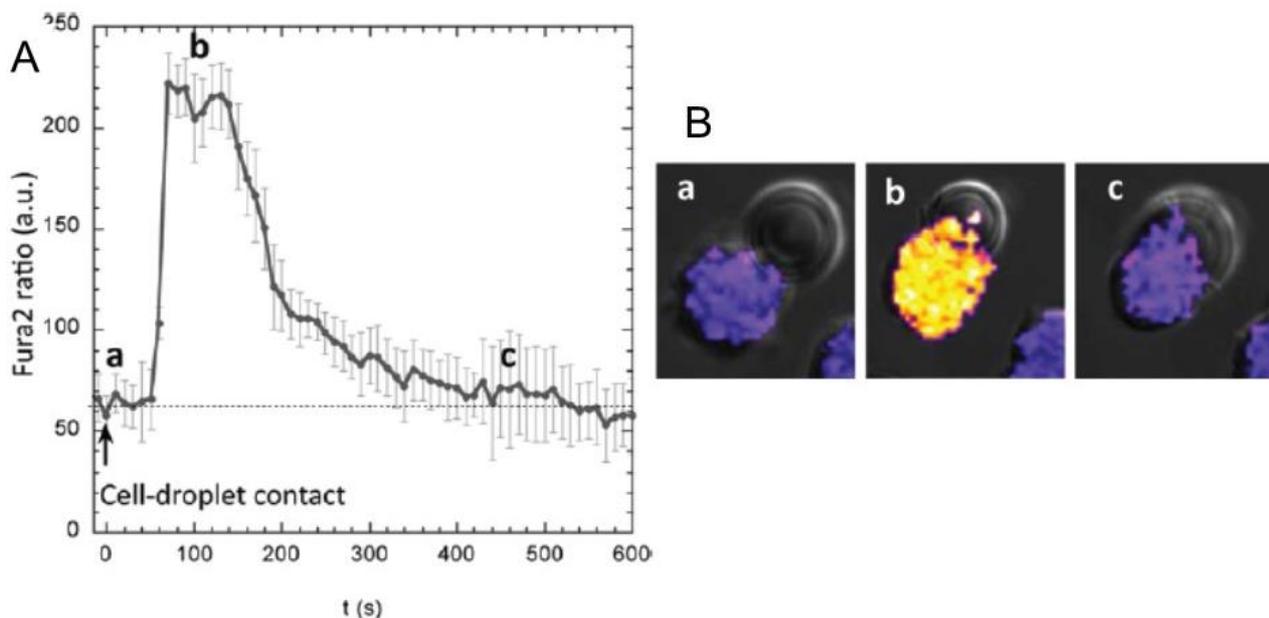


Figure 36. Analyses de la concentration en calcium dans la cellule T en contact avec la goutte, d'après Bourouina *et al.* [44]. (A) Rapport de fluorescence d'un indicateur en concentration de calcium (Fura2) en fonction du temps. (a) La cellule T contenant cet indicateur et la goutte portant des anticorps anti-CD3 sont mis en contact. (b) Après deux minutes, la concentration en calcium augmente brusquement, puis reprend progressivement sa valeur initiale au bout d'une dizaine de minutes (c). (B) Images en fluorescence de l'indicateur de calcium dont l'intensité de fluorescence et la longueur d'onde d'excitation change en fonction de la concentration en calcium. De l'image (a) à l'image (b), la couleur de la cellule T passe de violet à jaune, indiquant une augmentation de la concentration en calcium dans la cellule T, et donc une réponse biochimique de la cellule T induite par la goutte anti-CD3.

La Figure 36A montre le rapport d'intensité indiquant la concentration en calcium en fonction du temps. On constate un pic de la concentration en calcium après la mise en contact avec la goutte, puis un retour progressif à la concentration initiale. Les images en fluorescences de la Figure 36B montrent la cellule T traitée avec l'indicateur en calcium dont la couleur change après contact avec la goutte, puis reprend sa couleur initiale. Ces observations montrent que la reconnaissance spécifique de la goutte anti-CD3 par la cellule T induit une réponse biochimique de la part de la cellule.

3.4) Influence de l'actine et de la nature des récepteurs sur la cinétique

Bourouina *et al.* [44] ont ensuite cherché à savoir quels étaient les paramètres influençant la dynamique d'accumulation. La première hypothèse qu'ils ont voulu tester a été le rôle de l'actine dans la réponse de la cellule T. Pour cela, ils ont traité les cellules T avec de la tranculine ayant comme effet de bloquer la polymérisation d'actine dans la cellule sans altérer sa viabilité.

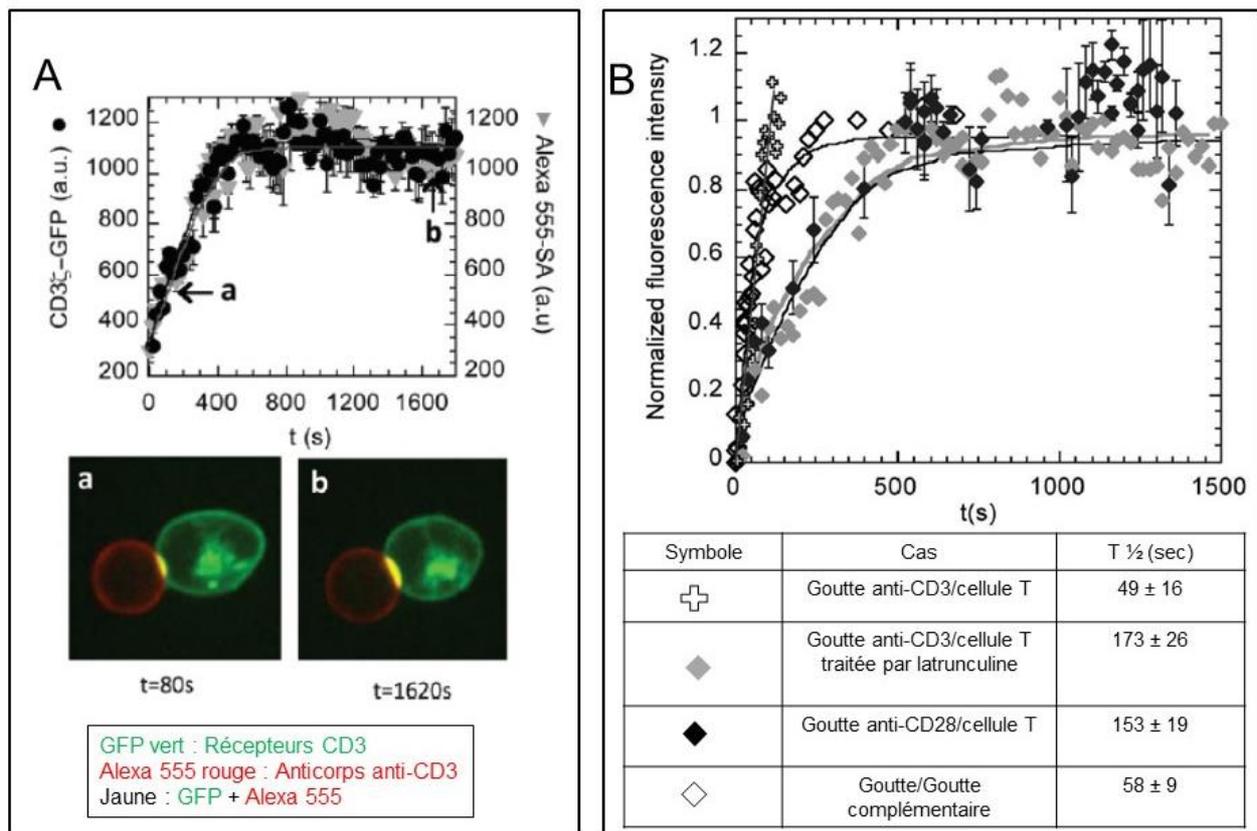


Figure 37. (A) Intensité de la fluorescence dans la zone de contact en fonction du temps pour une cellule T dont le cytosquelette d'actine est bloqué par de latrunculine, et une goutte anti-CD3. Les images en fluorescence montrent les anticorps anti-CD3 sur la goutte et les récepteurs CD3 de la cellule T. On constate la formation d'un patch fluorescent caractérisé par une augmentation de fluorescence mais pas de fragmentation de ce patch. (B) Intensité normalisée de la zone de contact en fonction du temps pour des couples goutte anti-CD3/cellule T (croix), des couples goutte anti-CD3/cellule T traitée avec de latrunculine (diamants gris), des couples goutte anti-CD28/cellule T (diamants noirs), et des couples goutte anti-CD3 /goutte (diamants vides). En bas, les temps caractéristiques sont indiqués pour chaque cas. Le fait de bloquer la polarisation d'actine avec de latrunculine, ou d'utiliser d'autres anticorps pour la goutte augmente le temps caractéristique des cinétiques noté $T_{1/2}$. Images et courbes issues de Bourouina *et al.* [44].

La Figure 37A montre des images en fluorescence d'une cellule T traitée par latrunculine dont les récepteurs sont marqués en vert, en contact avec une goutte anti-CD3. On constate la formation d'un patch fluorescent au contact, mais pas de fragmentation de ce patch après un certain temps. La fluorescence des récepteurs CD3 et des anticorps anti-CD3 au niveau du patch en fonction du temps montre une augmentation puis l'atteinte d'un palier stable, de manière similaire à un contact de type goutte/goutte (Figure 37A en haut). Le cytosquelette d'actine a donc un rôle important dans la réponse de la cellule T.

De manière à étudier l'influence de la nature de l'anticorps présenté par la goutte, Bourouina *et al.* ont également fonctionnalisé des gouttes avec des anticorps anti-CD28. Dans ce cas, un patch en fluorescence pour les anticorps anti-CD28 est observé, mais pas d'accumulation des récepteurs CD3 de la cellule T.

De manière à quantifier les temps caractéristiques d'accumulation des anticorps sur la goutte suivant les différents cas, Bourouina *et al.* ont normalisé les courbes de cinétique de fluorescence. La Figure 37B montre ces cinétiques normalisées sur le même graphe. Les temps caractéristiques sont courts et du même ordre de grandeur pour les couples gouttes anti-CD3/cellule T et goutte/goutte (temps caractéristique de l'ordre de 1 minute). En revanche, les temps caractéristiques sont plus grands dans le cas des couples goutte anti-CD3/cellule T traité avec latrunculine et les couples gouttes anti CD28/cellule T (temps caractéristique de l'ordre de 3 minutes).

On voit que le blocage de la polymérisation d'actine a une influence sur la dynamique d'augmentation de la fluorescence des anticorps dans la zone de contact, et que donc des phénomènes actifs dus à l'activité de la cellule influence la dynamique de recrutement à l'interface de la goutte. De même, la nature des anticorps présentés change la dynamique de recrutement.

3.5) Dynamique des ligands et récepteurs à l'interface

Des mesures de FRAP ont été menées par Bourouina *et al.* [44] dans le cas du contact goutte anti-CD3/cellules T de manière à étudier la dynamique et la stabilité du recrutement des anticorps anti-CD3 et des récepteurs CD3 une fois le patch fluorescent formé.

La Figure 38A montre les résultats de l'expérience de FRAP dans le cas d'une cellule T traité par latrunculine et d'une goutte anti-CD3. Les récepteurs CD3 de la cellule sont marqués en vert et les anticorps anti-CD3 de la goutte sont marqués en rouge. Le laser utilisé possède un diamètre de 1 μm et est centré sur le patch fluorescent de manière à « bleacher » une partie des fluorophores liés aux anticorps anti-CD3 (longueur d'onde de 561 nm) et une partie des fluorophores liés aux récepteurs CD3 (longueur d'onde de 488 nm). A titre de comparaison, la Figure 38B montre le cas goutte/goutte.

Les kymographes représentant les profils d'intensité suivant la ligne pointillée en fonction du temps sont représentés sur la colonne de droite. Le trait vertical correspond à l'action du laser. On constate que dans le cas des anticorps anti-CD3 et des récepteurs CD3, l'intensité reste altérée en fonction du temps, sans retrouver son état initial au bout de 15 secondes ; alors qu'on constate une tendance à un retour à l'état initial dans le cas goutte-goutte au bout de 5 secondes. Les phénomènes diffusifs semblent être gelés dans le cas goutte-cellule T aux échelles de temps considérées (environ 15 secondes), alors que les ligands et récepteurs dans le cas goutte/goutte restent mobiles sur ces échelles de temps. Ceci reste en accord avec le fait que la diffusion des récepteurs en surface des cellules T est bien plus lente que celle des anticorps en surface des gouttes. En effet, Bourouina *et al.* ont mesuré un coefficient de l'ordre de 1 $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ pour les anticorps anti-CD3 à la surface des gouttes, et un coefficient de diffusion de 0,05 à 0,1 $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ pour les récepteurs CD3 impliqués dans le contact avec la cellule. La difficulté de cette mesure dans le cas de la cellule couplée à la goutte vient de la fragmentation du patch. Néanmoins cet ordre de grandeur de coefficient de diffusion est en accord avec ceux mesurés précédemment pour les protéines membranaires des cellules T [45].

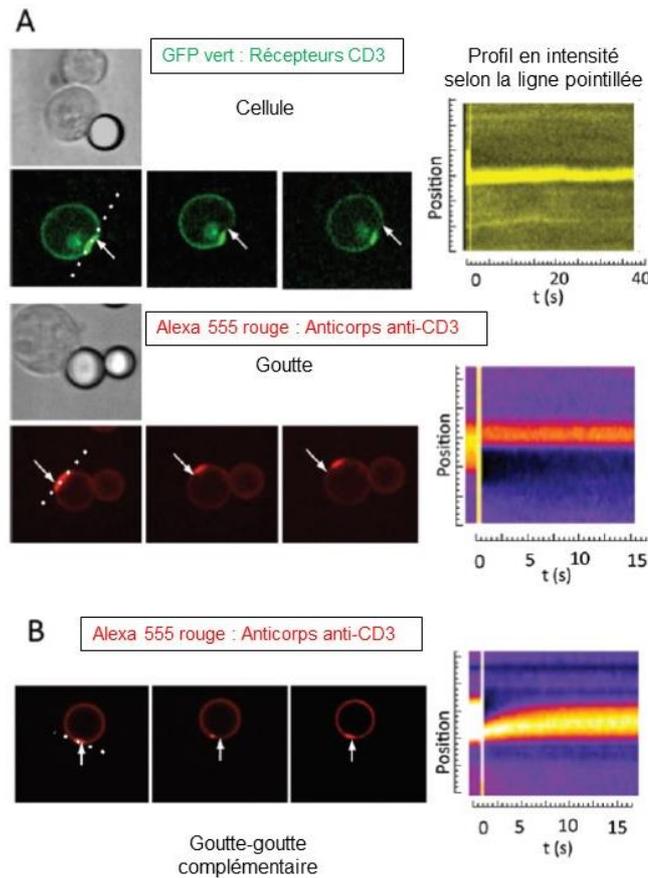


Figure 38. Principales observations des expériences de FRAP dans le cas d'un contact entre une cellule T traitée par de latrunculine et une goutte anti-CD3 (voir image en lumière blanche) (A), et dans le cas d'un couple goutte/goutte. Les images en fluorescence montrent les récepteurs CD3 de la cellule T marqués en vert, et les anticorps anti-CD3 en rouge. La colonne de droite montre des kymographes du profil d'intensité suivant les lignes en pointillé. Les fluorophores des récepteurs CD3 sont dégradés avec un faisceau à 488 nm et ceux des anticorps anti-CD3 avec un faisceau à 561 nm. Le faisceau est centré sur la zone de contact et possède un diamètre de 1 μ m. Après bleaching (trait vertical sur les kymographes), la fluorescence des récepteurs et des anticorps reste altérée (A), alors que dans le cas goutte/goutte, la fluorescence de la zone de contact tend à retrouver son état initial (B). Images et analyses issues de Bourouina *et al.* [44].

3.6) Conclusions

En conclusion, les gouttes portant des anticorps permettent d'étudier la dynamique de diffusion des récepteurs membranaires des cellules T et d'identifier les facteurs gouvernant le processus. Le recrutement des ligands et récepteurs de manière passive a un rôle au début du contact, puis la cellule T répond de manière active, notamment grâce à l'action du cytosquelette d'actine. Dans le cas des cellules T, les gouttes fonctionnalisées sont donc des objets bio mimétiques apportant des informations sur la dynamique de diffusion et ses mécanismes biochimiques sous-jacents. Nous proposons dans la suite de se servir de ces gouttes fonctionnalisées dans le cas des cellules B de manière à étudier la dynamique de diffusion en surface conduisant à la formation de la synapse immunologique.

3.7) Remarques sur le dispositif expérimental

Bourouina *et al.* [44] utilisent une chambre d'observation standard de 50 μm de haut pour la mise en contact des gouttes et des cellules. Les cellules sont introduites dans un premier temps et sédimentent, puis le dispositif est retourné avant l'injection des gouttes. En remontant, les gouttes rencontrent alors les cellules de manière aléatoire, puis l'observation par microscope est réalisée. Le fait que la rencontre entre une goutte et une cellule n'est pas localisée *a priori* ne facilite pas l'observation, surtout lorsqu'on cherche à avoir une image de l'état initial du système avant contact. La Figure 39 montre un schéma représentant des pièges microfluidiques en forme de U permettant de mettre en contact simultanément un grand nombre de gouttes et de cellules. La position des couples goutte-cellule est connue *a priori* par l'expérimentateur, ce qui permet l'observation des premiers instants de contact. Dans la suite, nous présentons une puce microfluidique qui permet la formation d'un grand nombre de couples goutte-cellule, de manière simultanée et à des positions données connues.

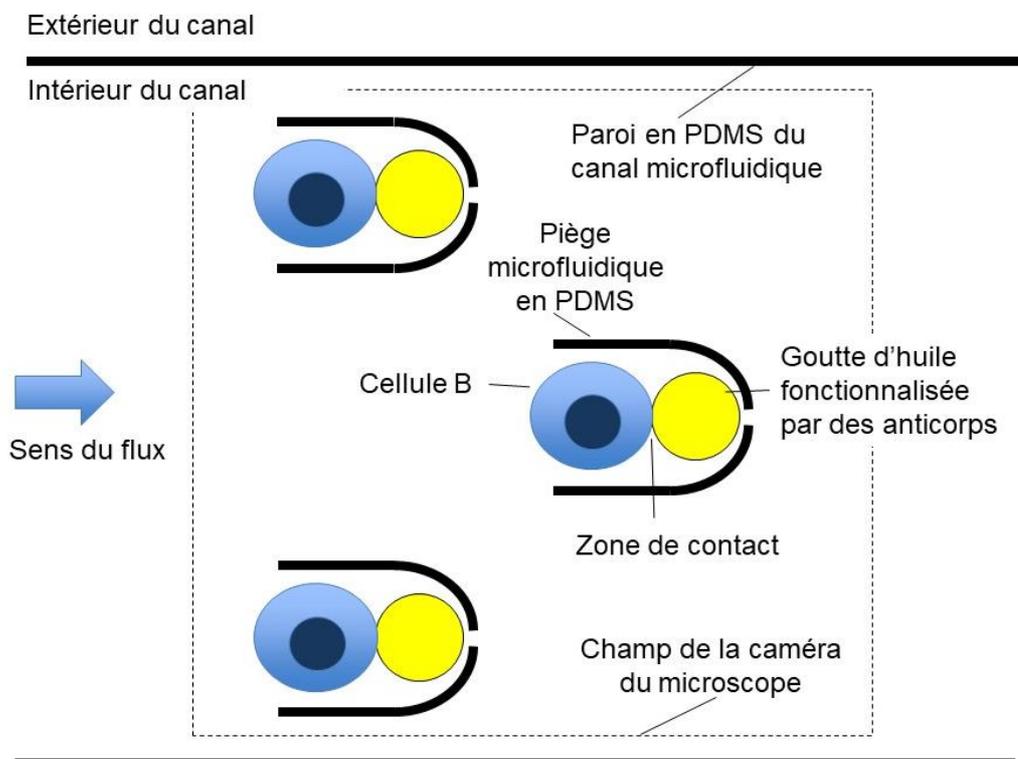


Figure 39. Schéma de principe de mise en contact de gouttes d'huile fonctionnalisées par des anticorps (en jaune) avec des cellules B (en bleu), dans un canal microfluidique. Les gouttes et les cellules sont injectées dans le canal, et piégées dans les formes en U constituées de PDMS. Le champ de vision de la caméra du microscope est schématisé par une zone en pointillés. Les couples gouttes/cellules sont positionnés à des endroits connus *a priori* par l'expérimentateur, facilitant l'observation des premiers instants de contact. Un grand nombre de couples peut être obtenu en parallèle en multipliant les formes en U dans le canal.

Partie 2.2. Fabrication et caractérisation des pièges microfluidiques

I) Introduction

1) Présentation

La capacité de contrôler spatialement et temporellement la trajectoire des objets de tailles micrométriques comme des particules colloïdales, des gouttes ou des cellules dans des canaux microfluidiques a toujours représenté un enjeu considérable pour les applications en physico-chimie et en biologie cellulaire. De nombreux systèmes ont été développés ces dernières années [46] comme par exemple les pinces optiques, les pièges magnétiques ou acoustiques.

Dans cette partie, nous décrivons les principales caractéristiques des pièges hydrodynamiques qui permettent d'isoler en peu de temps un grand nombre d'objets micrométriques à des localisations précises. Ces pièges ont les principaux avantages devant les autres pièges cités plus haut :

- leur simplicité de mise en œuvre pratique : ils ne mettent en jeu que des phénomènes hydrodynamiques et donc seule la puce en PDMS suffit, moulée sur un moule en résine fabriqué par photo-lithographie (pas d'ajout d'électrodes, de laser, ...).
- la possibilité de paralléliser les évènements, avec des géométries de canaux de plus en plus complexes.
- dans le cadre de la biologie, le cisaillement hydrodynamique peut avoir une influence sur l'activité cellulaire par mécano-transduction [47]. Ici, nous supposons que ce cisaillement est assez faible pour ne pas perturber le fonctionnement de la cellule. On pourra comparer les perturbations liées à ce cisaillement aux perturbations liées à d'autres types de pièges (laser, champ magnétique, ...).

Les pièges hydrodynamiques peuvent capturer des objets dans la gamme de taille de 5 μm à 500 μm (en général non browniens). La taille minimale est souvent limitée par la résolution spatiale des structures en PDMS obtenues en micro-lithographie (jusqu'à 2 – 3 μm).

Des simulations numériques préalables permettent d'optimiser au mieux la géométrie de la puce microfluidique, mais dans certains cas de simples comparaisons de résistances hydrodynamiques suffisent. C'est ce que nous verrons avec les pièges sous forme de canal « en serpent » . Puis nous nous focalisons sur les réseaux de pièges dans des chambres microfluidiques, que nous avons choisi pour notre expérience. Nous nous limitons ici à une étude en flux laminaire (nombre de Reynolds très petit devant 1) et avec des liquides newtoniens.

2) Les pièges microfluidiques « en serpentín »

Les pièges microfluidiques sous la forme de canal « en serpentín » peuvent être utilisés pour capturer des particules ou des gouttes [48] [49]. Le schéma de la Figure 40A (i) montre la géométrie utilisée : un canal en S entrecoupé de zones de capture. La suspension de particules est injectée dans la puce et lorsqu'une particule arrive à une intersection (point A), elle peut être piégée (chemin 1) ou passer par le canal de détour (chemin 2) jusqu'au point B. Pour qu'il y ait capture, il faut que le flux dans le canal du piège soit plus grand que celui dans le canal de détour ($Q_1/Q_2 > 1$), et donc que la résistance hydrodynamique du canal de détour soit plus grande que celle du canal du piège ($R_1/R_2 < 1$). Ainsi, pour obtenir la capture des particules, il faut préalablement ajuster les paramètres géométriques des canaux (longueur, largeur, hauteur) de manière à avoir les bonnes résistances hydrodynamiques. Les images de la Figure 40A (ii) et (iii) illustrent respectivement un cas où la capture n'est pas possible et un autre cas où elle est possible (la longueur du canal de détour a augmenté, augmentant ainsi sa résistance hydrodynamique) [48]. Notons que lorsqu'une particule est piégée, le flux dans le piège est fortement diminué et donc les particules suivantes ont peu de chance d'être piégées à leur tour.

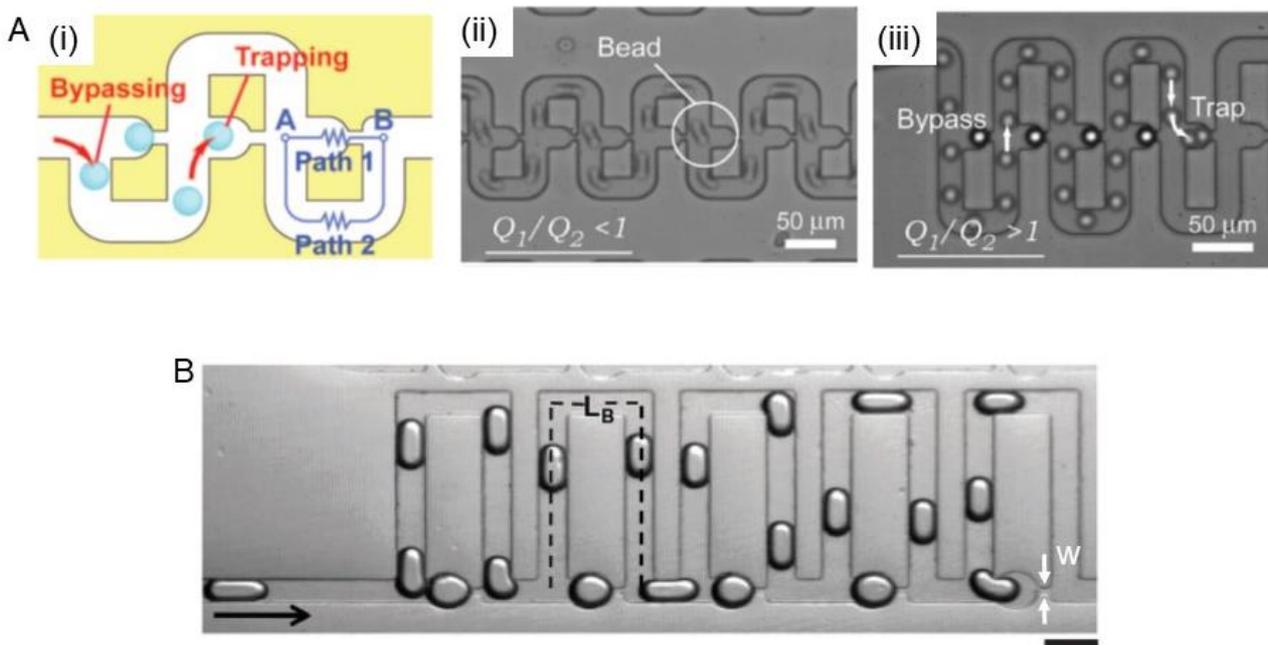


Figure 40. Pièges dans un canal « en serpentín ». (A) (i) Schéma décrivant les processus de capture et de contournement des particules dans le canal. Une particule présente au point A peut être piégée (chemin 1) ou passer par le canal de détour (chemin 2). Pour qu'une particule soit piégée, il faut la résistance hydrodynamique du canal de détour soit plus grande ou de l'ordre de celle du piège. Lorsqu'une particule est piégée, elle bloque le canal du piège et les particules suivantes passent par le canal de détour. (ii) Cas où la géométrie du canal est telle qu'aucune particule est piégée, dû au fait que la résistance hydrodynamique du canal de détour est plus petite que celle du piège, et donc le débit est plus grand dans le canal de détour que dans celui du piège. ($Q_1/Q_2 < 1$). (iii) Cas où la géométrie du canal est telle que la capture est possible car le débit est plus petit dans le canal de détour que dans celui du piège ($Q_1/Q_2 > 1$) [48]. (B) Image d'un réseau de pièges dans le cas de gouttes d'eau dans l'huile (barre d'échelle : 500 μm) [49].

Les gouttes aussi peuvent être piégées dans ces pièges suivant les mêmes mécanismes comme le montre la Figure 40B [49]. Dans le cas des gouttes, elles peuvent se déformer et passer à travers le piège. Pour qu'une goutte soit piégée, il faut qu'elle possède une pression capillaire assez grande devant la différence de pression imposée au niveau du piège. La condition de capture d'une goutte s'écrit donc :

$$P_{cap} = \frac{2\gamma}{w} > \Delta P_{imp}$$

avec γ la tension de surface huile/eau, w la plus petite largeur du piège (voir sur la Figure 40B), et ΔP_{imp} la pression imposée au niveau du piège. Dans le cas de notre expérience par exemple, où il est question de piéger des gouttes d'huile, nous avons $\gamma = 10 \text{ mN/m}$, $w = 3 \text{ }\mu\text{m}$, ce qui donne une pression capillaire $P_{cap} = 70 \text{ mbar}$. La pression imposée entre l'entrée et la sortie de la puce est $\Delta P_{imp} = 50 \text{ mbar}$, donc la différence de pression au niveau d'un piège est largement inférieure à ΔP_{imp} dans notre cas. Nos gouttes ne passeront donc pas à travers les pièges.

Malgré leur simplicité d'utilisation, les pièges « en serpentin » sont adaptés à des particules ou gouttes de tailles constantes et bien définies. En effet, l'utilisation de cellules ou de gouttes polydisperses peut entraîner l'obstruction des canaux suite à des vitesses différentes des particules.

3) Réseaux de pièges en U

Une manière de résoudre ce problème est de faire circuler les objets à capturer dans une chambre large dans laquelle sont répartis des pièges microfluidiques sous la forme d'un réseau [50] [51]. Le schéma de la Figure 41A (i) montre l'un de ces pièges et la manière dont les objets sont capturés. Le piège a une forme de U avec un trou au centre pour faire circuler le flux. Ce trou est plus petit que les objets à capturer pour permettre leur blocage. Lorsqu'une particule est capturée, elle bouche le trou et empêche le passage du flux à l'intérieur du piège. La probabilité pour qu'une autre particule soit capturée est alors plus faible. La Figure 41A (ii) montre une image de gouttes d'eau dans l'huile piégées dans un réseau de pièges [50].

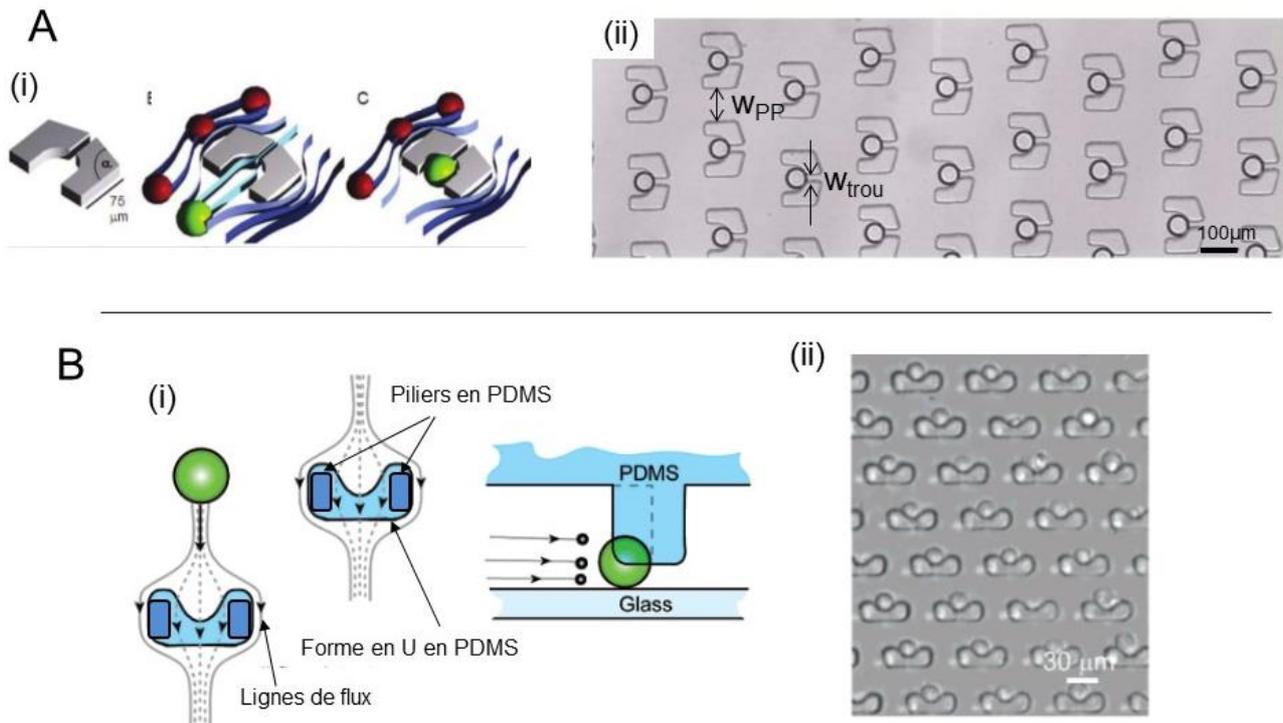


Figure 41. (A) Réseau de pièges fabriqués avec une couche de PDMS. (i) Schématisation des étapes conduisant à la capture d'une goutte. Le piège est en forme de U avec un trou au centre permettant le passage du liquide. Lorsqu'une goutte est capturée, elle bloque le trou et les gouttes suivantes passent principalement autour du piège. (ii) Image au microscope d'un réseau de gouttes d'eau dans de l'huile piégées [50]. On appelle w_{PP} la largeur entre deux pièges voisins, et w_{trou} la largeur du trou à l'intérieur du piège. (B) Réseau de pièges fabriqués avec deux couches de PDMS. (i) Schéma montrant que les lignes de flux passent sous la structure en U soutenue par deux piliers. (ii) Réseau de pièges utilisé pour obtenir une cellule par piège [51].

Il semble que la facilité de fabrication de ces pièges (une seule couche de résine pour le moule) a néanmoins un désavantage. En effet, a priori, on peut penser que ces pièges ne se remplissent pas facilement car la résistance hydrodynamique à l'intérieur du piège est plus grande que celle entre deux pièges (plus d'espace) et donc le flux principal passera entre les pièges, emmenant avec lui les particules. En effet, l'expression de la résistance hydrodynamique dans un canal de section rectangulaire s'écrit :

$$R = \frac{12\mu L}{wh^3}$$

avec μ la viscosité du liquide, L la longueur du canal, w sa largeur et h sa hauteur. Dans le cas d'un réseau de piège comme celui de la Figure 41A(ii), on appelle w_{PP} la largeur entre deux pièges voisins, et w_{trou} la largeur du trou à l'intérieur du piège. La hauteur de la chambre est notée h . La résistance entre deux pièges R_{PP} , et la résistance à l'intérieur du piège R_{trou} s'écrivent alors :

$$R_{PP} = \frac{12\mu L}{w_{PP}h^3}$$

$$R_{trou} = \frac{12\mu L}{hw_{trou}^3}$$

L est une longueur suivant la direction de l'écoulement, commune aux deux résistances, de l'ordre de grandeur de la taille du trou. Notons que le rôle de h et w s'inverse pour le calcul de R_{trou} puisque la largeur du trou est en général plus petite que la hauteur h de la chambre. Il vient alors le rapport des résistances suivant :

$$Rapport = \frac{R_{trou}}{R_{PP}} = \frac{w_{PP} h^2}{w_{trou}^3}$$

En prenant typiquement $h = 70 \mu m$, $w_{PP} = 100 \mu m$, $w_{trou} = 40 \mu m$, on obtient un rapport de résistances $Rapport = 8$. On doit donc s'attendre, avec cette géométrie et ces dimensions, à ce que le flux soit environ 8 fois plus important entre deux pièges comparé à celui à l'intérieur du piège. Donc en moyenne, les objets à piéger passeront préférentiellement entre deux pièges plutôt que dans le piège, ce qui induit une baisse de l'efficacité des pièges.

Il existe d'autres pièges fabriqués à partir de moules à deux couches de résine et ayant pour avantage de faire passer plus de flux à l'intérieur du piège et ainsi augmenter la probabilité de capture (Figure 41B).

La Figure 41B (i) montre un schéma de la géométrie de ces pièges à deux couches ainsi que leur mode de fonctionnement, assez similaire aux pièges à une couche présentés précédemment. Ces pièges sont constitués d'une structure en U en PDMS soutenue par deux piliers de PDMS. La première couche du moule en résine constitue les piliers et la seconde la structure en U. En l'absence de particule à l'intérieur du piège, le liquide peut passer sous la forme en U, emportant ainsi des particules. Les particules piégées sont retenues par la structure en U. La taille minimale des particules pouvant être piégées est fixée par la hauteur de la structure en U, donc par la hauteur des piliers. Cette caractéristique est intéressante du point de vue de la microfabrication car il est aisé de former des couches de résines assez fines (de un à quelques microns d'épaisseur) par « spin-coating », alors qu'une bonne résolution spatiale en XY (de 2 – 3 μm), nécessaire pour les pièges à une couche, est techniquement difficile à obtenir en photo-lithographie.

Encore une fois, lorsqu'une particule est piégée, la probabilité qu'une deuxième particule soit piégée est plus faible puisque la première particule réduit le flux à l'intérieur du piège. La Figure 41B (ii) montre une image de cellules piégées dans un réseau de pièges [51].

Ces structures sont conçues pour capturer une cellule par piège. Or notre objectif est de mettre en contact deux types d'objets : des gouttes fonctionnalisées par des anticorps avec des cellules B. Nous détaillons dans le paragraphe suivant une méthode développée par le groupe de Voldman du MIT qui permet cela.

4) Méthode de l'inversion de flux

La mise en contact de deux objets différents est particulièrement intéressante en biologie cellulaire où les phénomènes d'adhésions, d'échanges de signaux chimiques entre membranes sont importants. C'est dans ce contexte que Skelley *et al.* [52] ont mis au point un système d'inversion de flux permettant la mise en contact de deux types cellulaires différents (fibroblastes, cellules souches, ...).

La Figure 42A montre une image au microscope électronique à balayage des pièges fabriqués par Skelley *et al.* Ces pièges sont de la « même famille » que ceux présentés sur la Figure 41B. Ils sont constitués d'une structure en U surélevée par deux piliers en PDMS mais ils possèdent à l'arrière une petite cavité qui peut également piéger des cellules.

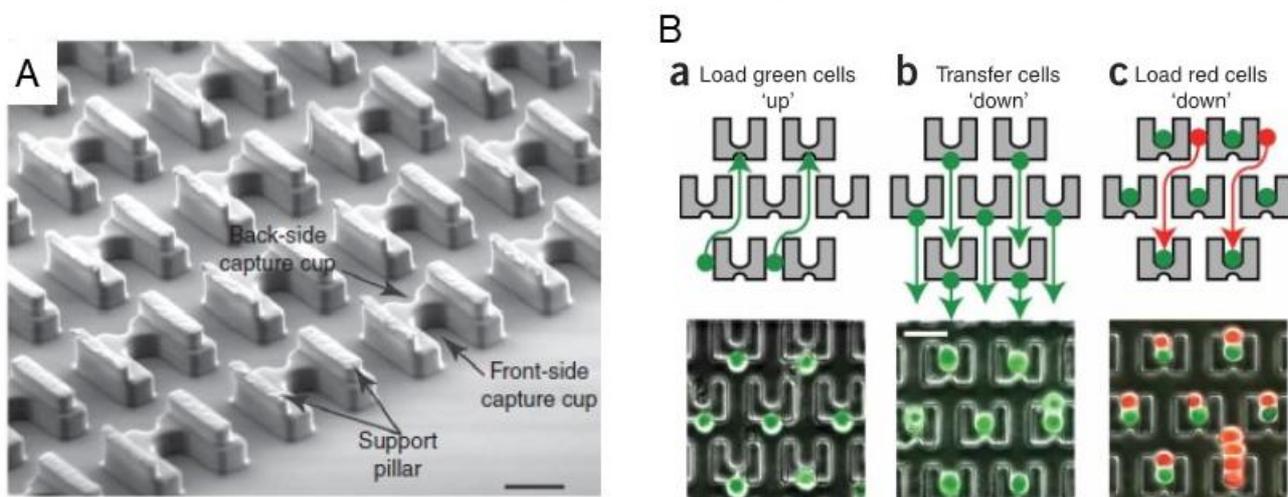


Figure 42. (A) Image par microscope électronique à balayage du réseau de pièges en PDMS permettant de capturer deux types de cellules [52]. La structure en U a une hauteur de 14,4 μm et une largeur de 20 μm . Les piliers reposant sur celle-ci ont une hauteur de 6 - 8 μm et une longueur de 40 μm (barre d'échelle : 20 μm). (B) Méthode d'inversion du flux permettant la capture de deux types de cellules. (a) Le flux est d'abord dirigé vers le haut et les cellules marquées en vert sont capturées à l'arrière des pièges. (b) Le flux est inversé et les cellules marquées en vert sont capturées à l'avant des pièges. (c) Les cellules marquées en rouge sont capturées et viennent en contact avec les cellules marquées en vert [52].

La méthode d'inversion du flux est détaillée sur le schéma de la Figure 42B. Les cellules marquées en vert sont d'abord injectées dans la chambre « vers le haut » et sont capturées à l'arrière des pièges (a). Puis, le flux est inversé de manière à faire venir les cellules marquées en vert dans les pièges avant (b). Enfin, le second type de cellule, marquées en rouge, est injecté « vers le bas » et les cellules marquées en vert sont ainsi en contact avec les cellules marquées en rouge. A la fin du processus, chaque piège contient une paire de cellules. Ce procédé est assez efficace puisqu'il permet d'obtenir 70 % de paires en comptant tous les pièges de la chambre microfluidique, à la fin de l'expérience.

5) Caractérisation du remplissage

La connaissance des lois qui régissent le remplissage des pièges répartis dans une chambre microfluidique, dans le but de prévoir à l'avance et de contrôler le nombre d'objets piégés, est intéressante, tant du point de vu des applications que de la recherche fondamentale.

On se place ici dans le cas de pièges à une ou deux couches répartis dans une chambre microfluidique. On fait l'hypothèse que les pièges peuvent capter plusieurs particules (de 1 à 5 par exemple). Dans l'hypothèse que la probabilité de capture dans un piège est indépendante des captures antérieures dans ce même piège, la distribution pour le nombre d'objets par piège suit alors une loi de Poisson. Notons que l'hypothèse d'indépendance de la probabilité de capture

selon le nombre d'objets piégés avant n'est pas vraiment vérifiée dans les expériences, car l'occupation d'un piège par une bille par exemple induit une augmentation de la résistance hydrodynamique du piège, et donc une diminution de la probabilité de capture.

Di Carlo *et al.* [51] ont mesuré la fraction de pièges contenant 1, 2, 3 ou 4 cellules (Figure 43). Les mesures expérimentales sont indiquées par des barres et l'ajustement par une distribution de Poisson par des points. Les mesures ont été faites pour quatre chargements indépendants de 100 μL d'une solution de cellules de concentration $3 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$.

On voit sur la Figure 43 qu'une espérance de 1 cellule par piège s'accompagne d'un nombre assez grand de pièges non occupés (un tiers environ). Si l'on cherche à avoir un seul objet par piège et pas deux, comme cela sera notre cas, il faut s'attendre à avoir un nombre non négligeable de pièges non occupés dans la puce.

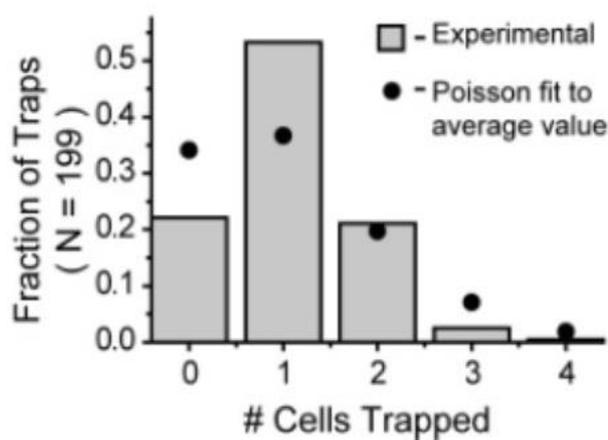


Figure 43. Fraction de pièges occupés par 1, 2, 3 ou 4 cellules dans l'expérience de Di Carlo *et al.* Les barres représentent les mesures expérimentales et les points un ajustement par une distribution de Poisson. Les mesures ont été faites pour quatre chargements indépendants de 100 μL d'une solution de cellules de concentration $3 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ [51].

6) Simulations numériques

Notons enfin que le phénomène de capture d'une particule dans un piège faisant parti d'un réseau a été simulé par Xu *et al.* [53]. Ce genre de simulation demande un grand nombre d'opérations numériques puisque de nombreux phénomènes interviennent (mouvement du fluide, interaction particule-fluide, interaction particule-piège). La maîtrise de cette technique permettrait la prédiction de l'efficacité de pièges et faciliterait la conception de ces pièges.

II) Fabrication et instrumentation

1) Choix des pièges

Ce sont la nature et les caractéristiques géométriques des objets à piéger qui ont guidé notre choix vers le type de pièges à utiliser. Notre expérience consiste à capturer une goutte d'huile et une cellule B par piège, ces deux objets étant de tailles similaires. Nous souhaitons avoir des paires de deux objets différents. La méthode d'inversion des flux développée par Skelley *et al.* [52] semble être la mieux adaptée à notre cas. C'est pourquoi nous avons conçu des pièges avec une cavité principale à l'avant et une cavité secondaire à l'arrière, mais avec une seule couche de résine, pour des raisons de simplicité dans la micro-fabrication. La méthode de l'inversion des flux pour nos pièges à une seule couche n'ayant pas été concluante, nous nous sommes servis seulement de la cavité avant des pièges. Nous avons préféré privilégier les observations liées à la biologie plutôt que l'optimisation complète des pièges.

2) Caractéristiques géométriques de nos pièges et des chambres

Les lymphocytes B sont des cellules en suspension (non-adhérentes) de forme globalement ronde. Pour des lignées, leur taille varie de 8 à 12 μm . La taille des gouttes d'huile varie de 6 à 10 μm . Ces tailles vont être déterminantes dans le choix des dimensions des pièges.

La première étape pour fabriquer un moule en résine est celle du dessin des motifs sur le logiciel CléWin. La Figure 44A montre les dessins des deux chambres microfluidiques utilisées. Elles possèdent un canal d'entrée et un canal de sortie. Dans chaque chambre, il y a 100 pièges. Avec ces deux chambres, nous voulons voir l'influence de la direction des lignes de courant sur le remplissage des pièges. Dans la chambre droite, les lignes de champ de la vitesse sont toutes dirigées selon l'axe de la puce, alors que dans la chambre décalée, les lignes de champ sont dirigées en moyenne selon la diagonale. Les deux lignes au début et à la fin de la chambre droite empêchent l'effondrement de la chambre en PDMS, sans perturber les lignes de courant axiales.

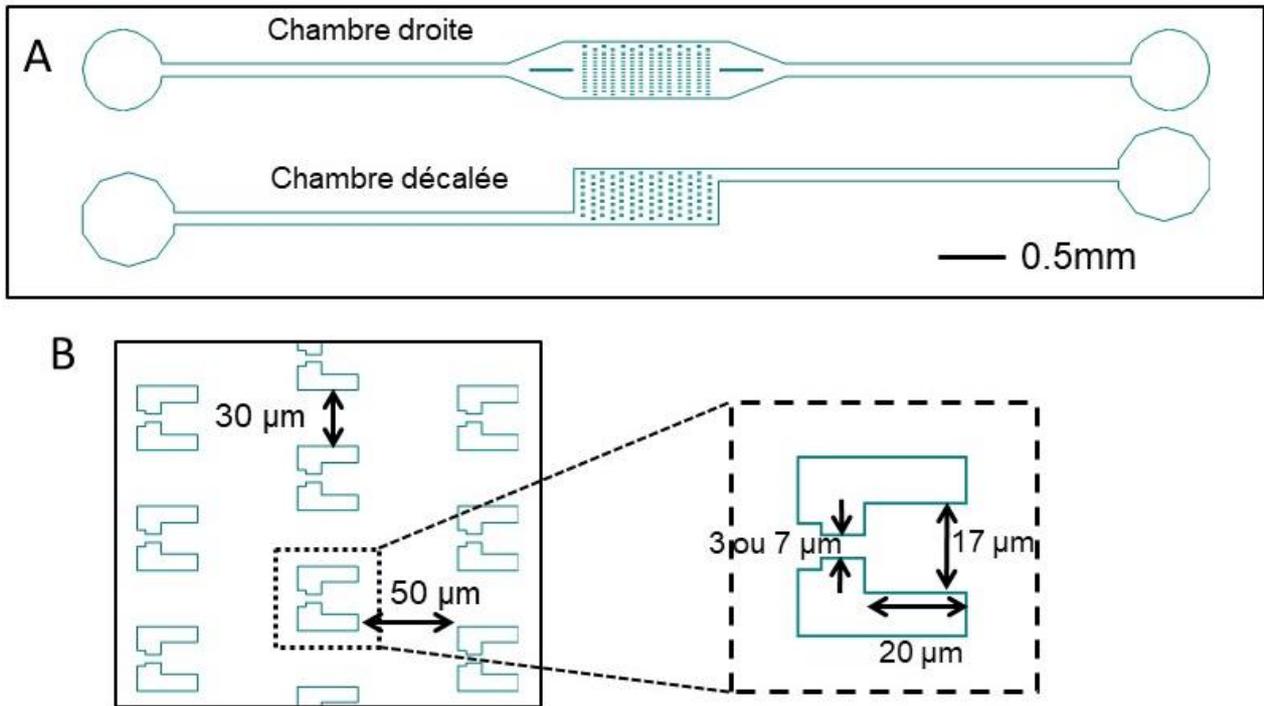


Figure 44. (A) Géométrie de la puce avec une chambre droite et de celle avec une chambre « décalée ». Dans la chambre droite, les lignes de flux sont suivant l'axe de la puce, alors que dans la chambre décalée les lignes de flux sont suivant la diagonale de la chambre. Les deux lignes au début et à la fin de la chambre droite empêchent l'effondrement de la chambre en PDMS, sans perturber les lignes de courant axiales. (B) Géométrie du réseau hexagonal des pièges. Deux lignes sont séparées de $50\ \mu\text{m}$ et deux pièges adjacents de $30\ \mu\text{m}$. Le zoom montre un piège avec une cavité principale à l'avant de $17\ \mu\text{m}$ de large et de $20\ \mu\text{m}$ de long et une petite cavité à l'arrière. L'espace central permettant le passage du liquide peut avoir une largeur de 3 ou $7\ \mu\text{m}$ selon les pièges utilisés.

La Figure 44B montre le réseau hexagonal des pièges. Les pièges doivent être assez distants les uns des autres pour éviter des phénomènes d'accumulations des cellules et d'obstruction de la chambre, et assez proches pour augmenter la probabilité de capture. Suivant les spécifications de Skelley *et al.* [52] nous avons choisi les dimensions suivantes : deux lignes horizontales sont séparées de $50\ \mu\text{m}$ et deux pièges adjacents de $30\ \mu\text{m}$.

A l'échelle d'un piège (voir le zoom de la Figure 44B), la cavité centrale doit être assez grande pour contenir une goutte et une cellule et assez petite pour ne pas contenir plus d'objets. Nous avons choisi une cavité principale à l'avant de $17\ \mu\text{m}$ de large et $20\ \mu\text{m}$ de long et une petite cavité à l'arrière.

La largeur de l'espace central doit être assez petite pour bloquer une goutte ou une cellule, et assez grande pour faire passer assez de flux et augmenter la probabilité de capture. La taille minimale des cellules B étant de $8\ \mu\text{m}$, nous avons choisi une largeur pour l'espace central de 3 ou de $7\ \mu\text{m}$ selon le piège utilisé (nous avons en effet deux types de pièges ayant deux largeurs d'espace central différentes).

La hauteur de la chambre doit être choisie assez grande pour faire passer les cellules B et les gouttes et assez petite pour ne contenir en moyenne qu'un seul objet dans la direction verticale.

La taille maximale des cellules B étant de 12 μm , nous avons choisi une hauteur de chambre de 14,4 μm .

2) Fabrication de nos pièges

Dans cette partie nous décrivons le mode de fabrication en deux étapes des pièges décrits dans le paragraphe précédent. La première étape consiste à fabriquer le moule et la deuxième étape consiste à mouler le PDMS dans ce moule.

Nos pièges ont la particularité de posséder un rapport d'aspect assez important si l'on considère la plus petite dimension dans le plan XY (3 μm) et la hauteur des pièges (14,4 μm). C'est ce fort rapport d'aspect qui nous a guidés vers la méthode de l'écriture directe par laser pour la fabrication du moule. La machine permettant cette technique est appelée Dilase 650 et est représenté sur la Figure 45A. Pour plus de détails sur la fabrication de ces pièges, se reporter à l'Annexe.

2.1) Etapes de dessin

La Dilase (Kloe) est un appareil de précision permettant de fabriquer des moules en résine avec une résolution spatiale très petite (de l'ordre du micron) et des rapports d'aspect importants (de l'ordre de 5). Cela fait d'elle l'appareil idéal pour la micro-fabrication dédiée aux applications à la biologie cellulaire. Néanmoins, les nombreuses étapes de conception du dessin de la puce et les différents formats successifs utilisés, conduisant finalement au format final « lisible » par la machine peut être source de complications pour l'utilisateur et nécessite une formation préalable. Ici nous présentons les principales étapes de conception conduisant au dessin avec le format final.

Les pièges sont d'abord dessinés avec le logiciel CléWin avec deux couches différentes (voir schéma de la Figure 45B) :

- la première couche contient la chambre microfluidique et les pièges en forme de U sans leur espace central permettant le passage du flux.
- La seconde couche contient un trait vertical à l'emplacement de chaque espace central. Ce trait vertical indique le passage du laser à cet endroit et donc la formation de l'espace central dans le piège. Nous avons fabriqué deux types de pièges : le premier avec un seul trait vertical, donnant un espacement final de 3 μm , le deuxième avec trois traits verticaux, séparés de 2 μm sur le dessin CléWin, donnant un espacement final de 7 μm (voir Figure 46D et E). Ce dessin contenant deux couches est importé dans le logiciel associé à la Dilase, KloeDesign sous le format .CIF. Chaque couche est enregistrée séparément sous la forme de deux fichiers LWI2d.

Pour le fichier contenant la chambre et les pièges, les puces sont dupliquées quatre fois et réparties sur l'espace disponible du wafer, puis les surfaces de passage du laser sont définies. Enfin, les lignes de passage du laser sont définies par la génération d'un fichier au format LWO.

Pour le fichier contenant les lignes verticales permettant la formation de l'espace central, il n'y a pas d'étape de définition de surface de passage du laser car il n'y a pas de surface mais des lignes. Le fichier peut donc être directement transformé au format LWO.

Finalement, nous obtenons deux fichiers au format LWO, l'un contenant les chambres microfluidiques et les pièges, et l'autre contenant les lignes verticales. Les dessins de ces deux fichiers ont été additionnés sur la Figure 45C de manière à illustrer nos propos. Les surfaces apparaissant en vert correspondent à des surfaces balayées par le laser avec un faisceau éteint (pas de réticulation de la résine), tandis que la surface rouge correspond à une surface balayée par le laser avec un faisceau allumé (réticulation de la résine). La Figure 45D montre un piège de près sous le format LWO. Les traits rouges correspondent au passage du laser avec un faisceau allumé et les traits verts correspondent au passage du laser avec un faisceau éteint. Les traits sont séparés les uns des autres d'une distance de 2 μm (le diamètre du laser).

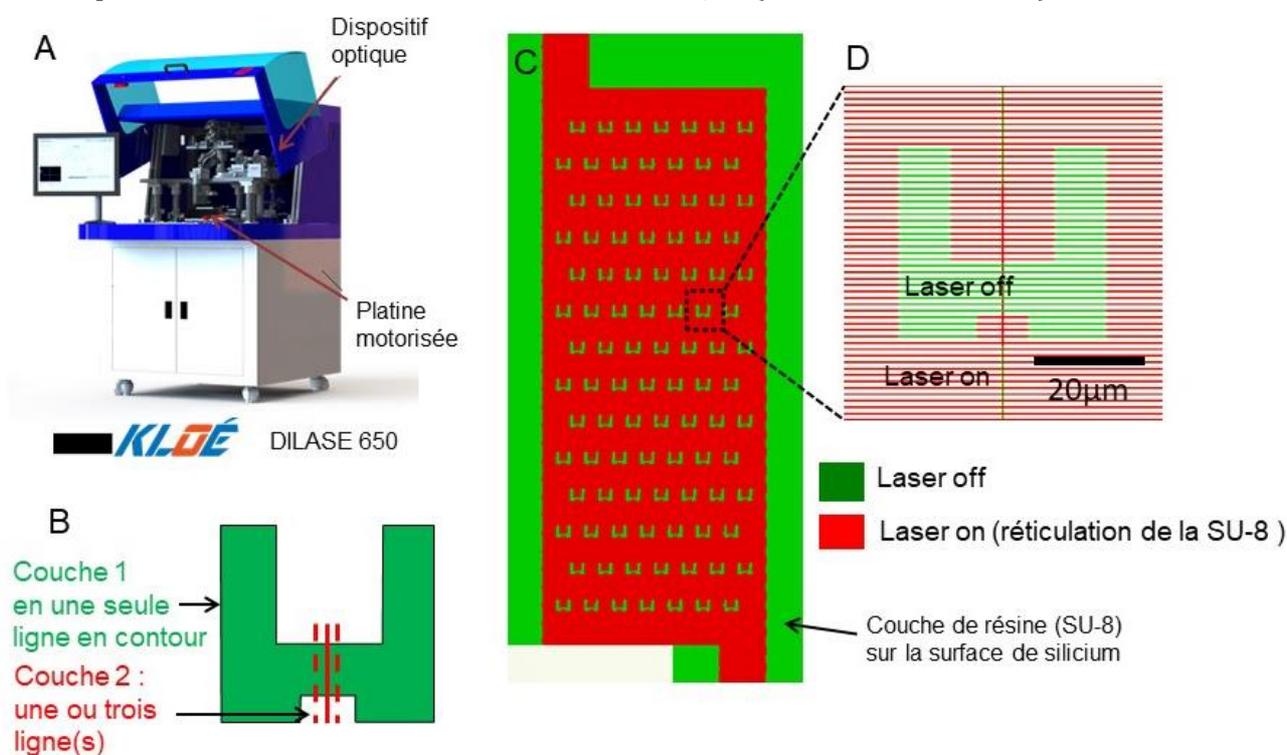


Figure 45. (A) Image de la Dilase 650, appareil permettant l'écriture directe par laser. Le wafer est déposé sur une platine motorisée disposée sous le dispositif optique, celui-ci étant composé du laser, de filtres et de nombreux miroirs et lentilles permettant une focalisation avec une résolution spatiale en trois dimensions précise (inférieure au micron). L'ensemble du dispositif est placé sous un couvercle isolant des rayonnements UV et est contrôlé par un ordinateur situé sous la table optique. (B) Schéma d'un piège dessiné sous CleWin, avec une forme en U dessinée avec un seul trait (couche 1), et un trait vertical pour un espacement de 3 μm , ou trois traits verticaux pour un espacement de 7 μm (couche 2). (C) Représentation d'une puce par le logiciel KloeDesign associé à l'écriture directe par laser sur résine SU-8. La surface du substrat en silicium, recouverte d'une couche de résine SU-8 d'épaisseur 14,4 μm , est insolée par un laser seulement dans la zone rouge. Dans cette zone, la résine réticule et reste sur le substrat après développement alors que la résine déposée sur la surface verte est éliminée lors du développement. (D) Zoom de la représentation d'un piège. Le passage du laser est indiqué par des traits, rouges lorsqu'il est allumé et verts quand il est éteint. Le trait vertical permet la formation de l'espace

central du piège, de largeur 3 μm lorsqu'il y a un trait (comme sur la photo), et de 7 μm lorsqu'il y en a trois. Le laser ($\lambda = 375 \text{ nm}$) a un faisceau de diamètre 2 μm et une vitesse de passage de 10 mm/s.

On remarque le trait vertical issu du deuxième fichier LWO et qui permet la formation de l'espace central. Lorsqu'il y a un seul trait vertical, la largeur de l'espace central final en PDMS est de 3 μm (premier type de pièges), et lorsqu'il y a trois traits séparés de 2 μm , l'espace central final en PDMS est de 7 μm (deuxième type de pièges) (voir le résultat Figure 46D et E).

Les deux fichiers LWO sont transférés dans le logiciel de la Dilase. Il reste alors à préparer le wafer avec la résine et à entrer les paramètres expérimentaux nécessaires au fonctionnement de la Dilase. Lors de l'écriture par la Dilase, les traits horizontaux sont faits en premiers, suivis des traits verticaux ensuite.

2.2) Fabrication du moule

La fabrication du moule en résine est faite avec la Dilase 650 par écriture directe par un laser sur une résine photo-sensible. Nous présentons ici les caractéristiques de la Dilase représentée sur la Figure 45C.

La Dilase est constituée d'un système optique assez complexe composé de filtres, miroirs et lentilles permettant une focalisation spatiale précise du faisceau du laser au niveau de l'échantillon. Le diamètre du faisceau en sortie du système optique et au niveau du plan focal est de 2 μm . La hauteur du plan focal peut être ajustée. La longueur d'onde du laser est de 375 nm. L'échantillon est posé et fixé à l'aide du vide sur une platine motorisée de translation dans le plan horizontal. Cette platine est située sous le système optique fixe. La position de la platine est contrôlée par ordinateur avec une précision inférieure au micron. L'ensemble de la Dilase (laser, lentilles et platine) est contrôlé par un logiciel spécifique installé sur l'ordinateur. Le logiciel lit le dessin des puces contenu dans le fichier sous format LWO et adresse les commandes adéquates à la Dilase.

Pour fabriquer un moule, la première étape consiste à mesurer à l'aide d'un micromètre l'épaisseur du support de silicium (« wafer ») utilisé. Nous utilisons ensuite la technique standard de « spin-coating » pour étaler une couche de 14,4 μm d'épaisseur de résine négative photo-sensible (SU-8 2015) sur ce wafer. Le wafer est chauffé suivant les prescriptions standards adaptées à l'épaisseur de 14,4 μm . Les éventuelles traces de résine présentes derrière le wafer à la fin du processus doivent être retirées à l'aide d'un coton tige imbibé de développeur pour éviter de modifier l'épaisseur du wafer. Enfin le wafer est fixé à l'aide du vide sur la platine motorisée de la Dilase. L'intensité du laser est fixée à 100 % et la vitesse de la platine à 10 mm.s⁻¹. La hauteur du plan focal est déterminée par l'épaisseur mesurée du wafer et la hauteur de la couche de résine. Une fois tous les paramètres enregistrés par le logiciel, le programme est lancé. Pour un wafer contenant quatre puces, chacune d'entre elle contenant 100 pièges, la durée d'écriture est de 3 heures environ.

Une fois le programme terminé, le wafer est retiré de la Dilase et les étapes de développement standard de micro-fabrication sont réalisées.

2.3) Fabrication de la puce en PDMS

Les puces en PDMS sont fabriquées selon les techniques standards de lithographie « douce » [15]. Le PDMS liquide (Polydiméthylsiloxane, RTV, proportion 1 : 10 d'agent réticulant) est versé sur le moule en résine. La puce est placée pendant une nuit à 70°C puis le PDMS est démoulé, découpé et collé sur une lame de verre (VWR, 50 × 24 mm) avec un plasma à dioxygène. L'entrée de la puce en PDMS est connectée avec un tube à un réservoir contenant la solution à injecter placé sur la platine du microscope durant l'expérience. Ce réservoir est lui-même connecté à un régulateur de pression.

3) Préparation des billes de polystyrène et des gouttes d'huile fluorescentes

3.1) Préparation des billes de polystyrène

Afin de caractériser le remplissage de nos pièges, nous avons utilisé des billes de polystyrène fluorescentes de 5 µm de diamètre (achetées chez Polyscience), et des gouttes d'huiles de soja rendues fluorescentes avec un colorant.

Les billes de polystyrène sont diluées dans une solution de surfactant (Poloxamer F-127, concentration dans la solution de finale de 0,3 % en masse) de manière à obtenir une concentration en billes d'environ 1 million par millilitre. Pour cela, typiquement, 20 µL de la solution mère en billes sont introduits dans 1 mL de la solution de Poloxamer F-127 à 0,3 % en masse. C'est cette dispersion de billes qui est injectée dans les pièges microfluidiques.

3.2) Préparation des gouttes d'huile (Couette et microfluidique)

Les gouttes d'huile de soja sont fabriquées suivant les mêmes techniques que dans la Partie 1 sur la micro vélocimétrie. Le pré-mélange contenant l'huile de soja (15 g), la solution de Poloxamer F-68 (2,5 g, concentration initiale de 30 % en masse) et la solution d'alginate de sodium (2,5 g, concentration initiale de 4 % en masse), est introduit dans la cellule de Couette et soumis à un cisaillement constant (vitesse de rotation de 5000 s⁻¹), rendant l'émulsion quasi-monodisperse. Après les différentes étapes de lavages avec la solution de Poloxamer F-68 à 1 % en masse, l'émulsion est stockée à 12°C. Le diamètre moyen des gouttes obtenues est de 5 µm (voir la distribution en taille sur la Figure 47B).

Les gouttes d'huile de 14,4 µm de diamètre sont fabriquées en microfluidique en utilisant des canaux de type « flow-focusing ». Cette méthode a été présentée dans la partie 2.1 (voir plus haut la Figure 31) et le protocole expérimental est détaillé en Annexe. La phase aqueuse est constituée de 0,1 % de Poloxamer F-68 et de 0,1 % d'alginate de sodium. L'huile utilisée est de l'huile de soja. Les gouttes ont un diamètre moyen de 14,4 µm (voir Figure 47C).

Environ une heure avant injection dans les pièges, ces gouttes sont rendues fluorescentes en volume en utilisant une technique développée par Molino *et al.* [54]. Cette technique consiste à dissoudre dans les gouttes une solution de Nile Red (colorant dans le rouge, absorption à 553 nm) présent dans du DMSO. Une solution intermédiaire de 0,5 mL de Nile Red dissout dans

du DMSO est préparée avec une concentration de $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Dans 1 mL d'une solution de Poloxamer F-68 (0,3 % en masse) sont ajoutés 100 μL de la solution de gouttes, et 1 μL de la solution de Nile Red intermédiaire. La solution est mélangée au rotor protégé de la lumière pendant une heure. Afin d'avoir une concentration adaptée aux pièges, typiquement, 100 μL de la solution obtenue sont introduits dans 1 mL d'une solution de Poloxamer F-68 (0,3 % en masse) avant observation au microscope ou injection dans les pièges.

4) Microscopie

La visualisation des billes fluorescentes et des gouttes huile fluorescentes est réalisée par microscopie à épi-fluorescence (Microscope Leica, Allemagne). La source de lumière est une diode. La caméra utilisée est une caméra sCMOS (Hamamatsu, Japon). Le microscope est contrôlé par ordinateur via le logiciel Metamorph. Les images sont enregistrées dans l'ordinateur sous la forme d'une liste d'images au format .TIFF. Pour la visualisation des billes fluorescentes, le filtre utilisé est le filtre GFP et le temps d'exposition est fixé à 40 ms. Pour la visualisation des gouttes fluorescentes, le filtre utilisé est le filtre Cy3 et le temps d'exposition est fixé à 40 ms.

5) Régulateur de pression

La suspension de billes de polystyrène fluorescentes et celle de gouttes d'huile fluorescentes sont injectées dans la puce microfluidique à l'aide d'un régulateur de pression (MFCS Fluigent) relié à une sortie d'air comprimé. Ce régulateur, contrôlable par ordinateur via un logiciel intégré, peut délivrer une pression allant de 0 à 1 bar avec une précision à 0,1 mbar.

6) Analyse d'image

Toutes les analyses d'images pour les expériences de caractérisation du remplissage des pièges ont été faites avec le logiciel Matlab MathWorks.

Les simulations numériques de vitesse de liquide ont été faites avec le logiciel Comsol 5.2.

III) Résultats et caractérisation

Dans cette partie, nous présentons les images prises par microscopie des pièges à l'issue de leur fabrication. Nous nous assurons de leurs dimensions, conformes à celles des dessins, et de leurs formes régulières. Une fois les pièges terminés, nous avons voulu savoir à quel point nos pièges étaient efficaces, et donc caractériser de manière quantitative le remplissage grâce à des particules « modèles » de densité et de diamètre bien calibrés. Pour cela, nous avons injecté deux types de particules dans les pièges : la suspension de billes fluorescentes de 5 μm (décrite plus haut) et la suspension de gouttes fluorescentes à 14,4 μm (décrite plus haut). Nous détaillons le dispositif expérimental, le protocole expérimental et la méthode d'analyse d'image. Nous présentons à la fin les résultats de la caractérisation.

1) Résultats de la micro-fabrication

Nous avons choisi des pièges microfluidiques en forme de U à une couche de résine et répartis dans une chambre. Nous avons fabriqué le moule en résine en utilisant la technique d'écriture directe par laser avec une résolution inférieure au micron. Les pièges en PDMS ont été fabriqués par la méthode standard de lithographie « douce ».

La manière la plus efficace pour se rendre compte de la qualité des micro-structures obtenues est l'observation par microscopie.

La Figure 46 montre des images à la loupe binoculaire des moules en résine obtenus pour la chambre droite (A) et les chambre décalée (B). La largeur des deux chambres est de 0,5 mm et leur longueur de 1,5 mm. Le décalage entre l'entrée et la sortie de la chambre décalée est décrit par un angle égal à 20° . Les flèches bleues indiquent la direction du flux lors des expériences.

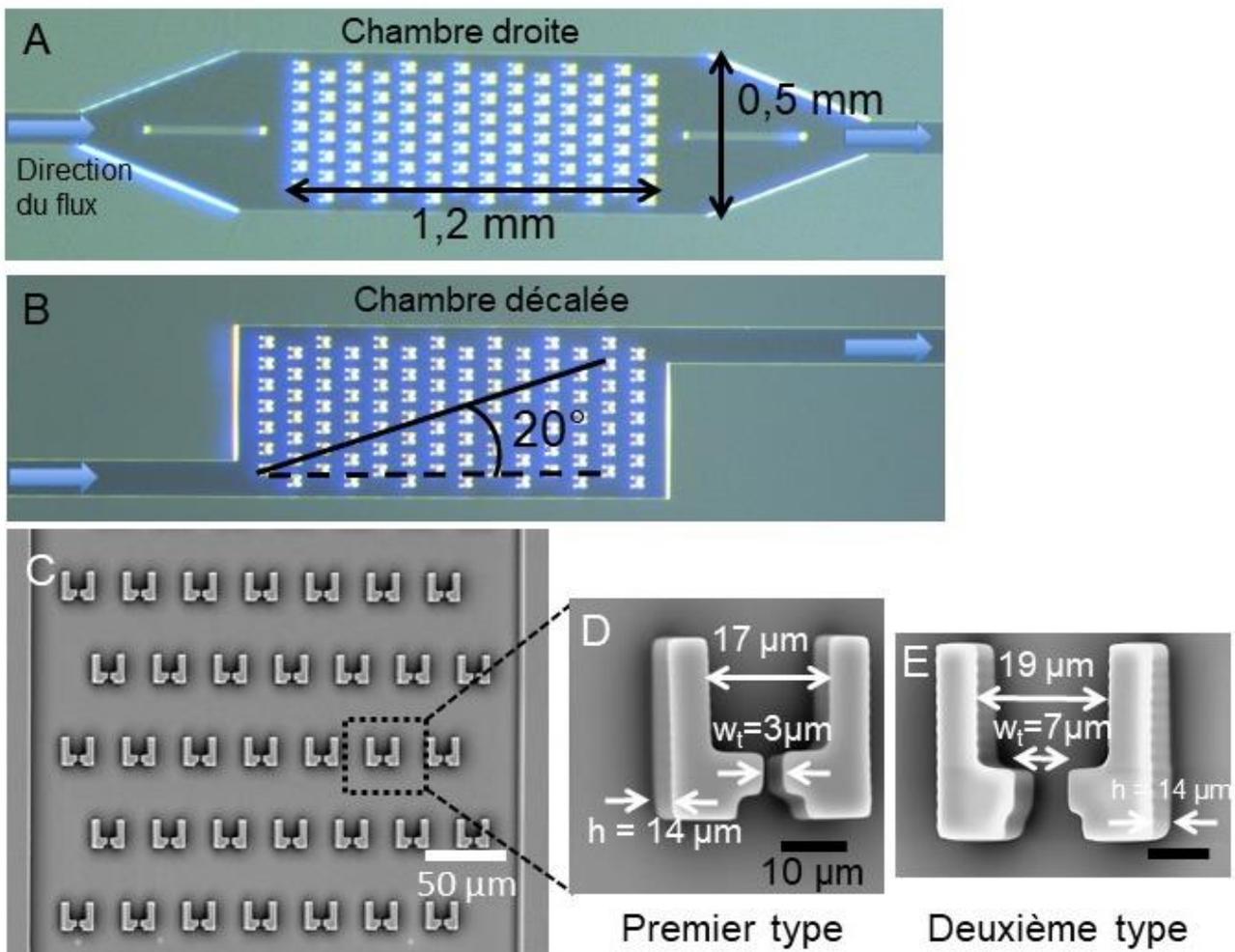


Figure 46. (A) et (B) Images des moules en résine des chambres droite et décalée respectivement. La largeur des chambres est de 0,5 mm et la longueur de 1,5 mm environ. Le décalage entre l'entrée et la sortie de la chambre décalée est décrit par un angle égal à 20° . Les flèches bleues indiquent la direction du flux. (C) Image au microscope à balayage électronique du réseau de pièges en PDMS de largeur minimale de $3 \mu\text{m}$. (D) Zoom d'un piège au microscope à balayage électronique. Le piège possède une surface de $17 \mu\text{m} \times 17 \mu\text{m}$ et une hauteur de $14 \mu\text{m}$. La largeur de l'espace central est de $3 \mu\text{m}$ (proche du diamètre du laser). (E) Image au microscope à balayage électronique d'un piège fabriqué avec trois

passages du laser au niveau du trou (deuxième type de piège). Le piège possède largeur principale de 19 μm et une hauteur de 14 μm . La largeur de l'espace central est de 7 μm .

La Figure 46C montre une image au microscope à balayage électronique du réseau de pièges en PDMS après démoulage. On constate une certaine régularité dans les motifs, due à la précision de la Dilase. La Figure 46D montre l'image d'un piège en particulier prise grâce au zoom du microscope à balayage électronique. La mesure de la largeur du piège donne 17 μm et celle de la largeur de l'espace central donne $w_t = 3 \mu\text{m}$ (premier type de piège). Ces mesures correspondent au piège dessiné présent sur la Figure 45B. On distingue également que le piège possède une certaine hauteur (14 μm mesurée avec un profilomètre optique). Ces pièges ont été utilisés pour la caractérisation avec les billes de 5 μm et les gouttes de 5 μm . Nous avons également fabriqué des pièges avec une largeur pour l'espace central de $w_t = 7 \mu\text{m}$ (voir l'image au microscope à balayage de la Figure 46E), correspondant à trois passages du laser dans la zone centrale (voir plus haut). Ces derniers ont été utilisés pour la caractérisation avec des gouttes de 14,4 μm , et pour la mise en contact entre gouttes et cellules (voir dans la suite).

2) Résultats pour les gouttes fluorescentes

Nous montrons ici les résultats de la fluorescence des gouttes d'huile dans le cas de gouttes de soja fabriquées en microfluidique. Ces gouttes sont rendues fluorescentes par dissolution en volume d'une solution de Nile Red dans du DMSO. Les gouttes ainsi obtenues sont placées dans une chambre constituée de deux lamelles de verre pour visualisation au microscope à épifluorescence. La Figure 47A montre une image au microscope à fluorescence avec le filtre Cy3 (rouge, $\lambda_{\text{exc}} = 545 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 605 \text{ nm}$) des gouttes fluorescentes. On constate que la fluorescence est bien marquée et permet une visualisation facile des gouttes dans l'espace.

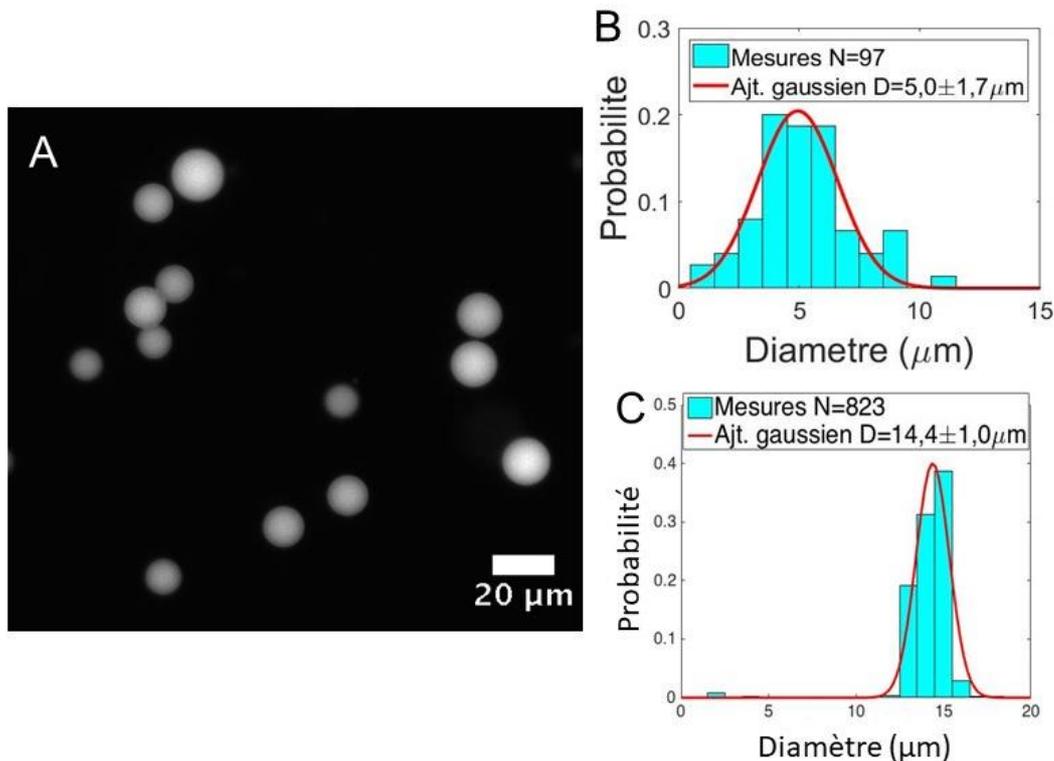


Figure 47. (A) Image par microscopie de fluorescence des gouttes d'huile de soja rendues fluorescentes en volume par une solution de Nile Red dissout dans du DMSO. Le filtre utilisé est le Cy3 (rouge). (B) Distribution du diamètre des gouttes d'huile fabriquées avec la cellule de Couette et rendues fluorescentes. Cette distribution est réalisée à partir d'images en microscopie en lumière blanche et d'un traitement d'image sur Imagej. La courbe rouge correspond à un ajustement gaussien d'espérance $5,0 \mu\text{m}$ et d'écart type $1,7 \mu\text{m}$. (C) Distribution du diamètre des gouttes d'huile fabriquées en microfluidique et rendues fluorescentes. La courbe rouge correspond à un ajustement gaussien d'espérance $14,4 \mu\text{m}$ et d'écart type $1,0 \mu\text{m}$.

La distribution du diamètre des gouttes fabriquées avec la cellule de Couette, et celle des gouttes faites en microfluidique, sont données Figure 47B et C respectivement. Les courbes rouges sont des ajustements de type gaussien d'espérance $5,0 \mu\text{m}$ et d'écart type $1,7 \mu\text{m}$ pour les gouttes faites au Couette, et d'espérance $14,4 \mu\text{m}$ et d'écart type $1,0 \mu\text{m}$ pour les gouttes microfluidiques.

3) Dispositif expérimental pour la caractérisation

Le dispositif expérimental mis en place pour la caractérisation du remplissage des pièges est schématisé sur la Figure 48.

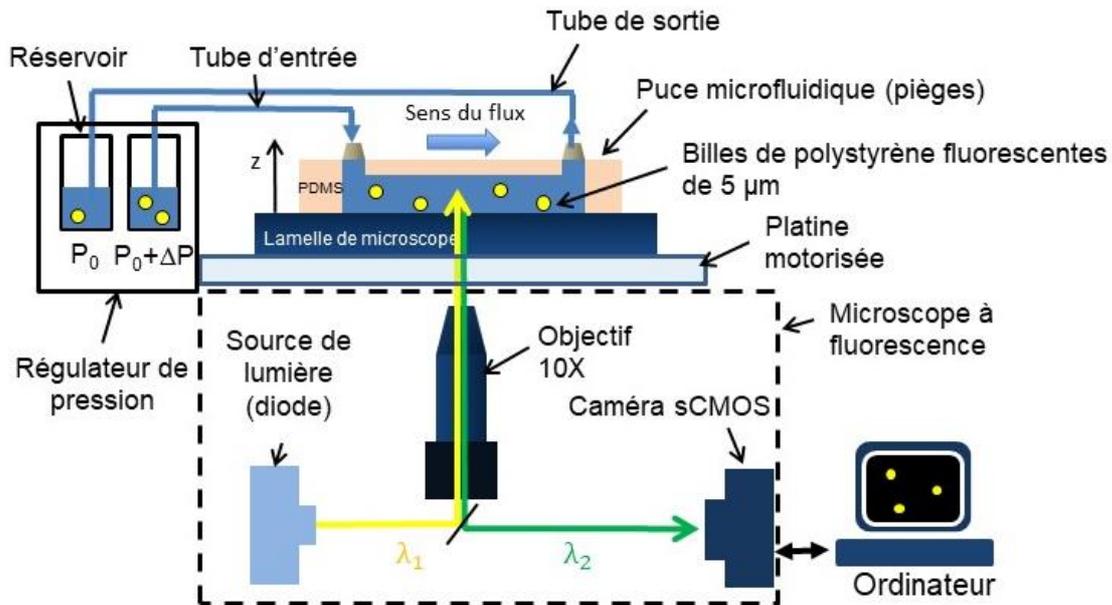


Figure 48. Schéma représentant le dispositif expérimental d'une expérience de remplissage des pièges par des billes de polystyrène fluorescentes ou des gouttes d'huile fluorescentes. La puce microfluidique (chambre droite ou décalée) est posée sur la platine d'un microscope à fluorescence. L'entrée de la puce est reliée par un tube à un réservoir contenant la dispersion de billes fluorescentes ou de gouttes fluorescentes. La sortie de la puce est reliée à un réservoir de sortie. Une différence de pression ΔP est imposée entre ces deux réservoirs avec un régulateur de pression, générant ainsi un flux constant dans la puce. La source de lumière utilisée est une diode. Les particules reçoivent une lumière de longueur d'onde λ_1 et émettent une lumière à une longueur d'onde plus élevée λ_2 qui est détectée par une caméra sCMOS. Les images sont enregistrées par un ordinateur.

La puce microfluidique (pièges avec une chambre droite ou décalée) est posée sur un microscope à épi-fluorescence. Son entrée est connectée à un réservoir contenant soit la suspension de billes fluorescentes de $5 \mu\text{m}$ (décrite plus haut), soit la suspension de gouttes d'huile fluorescentes de $14,4 \mu\text{m}$ (décrite plus haut également). La sortie de la puce est reliée à un autre réservoir par un tube. Une différence de pression ΔP est appliquée entre les deux réservoirs avec un régulateur de pression, générant ainsi un flux stationnaire dans la puce. La résistance hydrodynamique des tubes est négligeable devant celle de la puce microfluidique. La diode émet un rayonnement qui est filtré à la longueur d'onde λ_1 et qui est reçu par les particules présentes dans les pièges. Les particules émettent alors une lumière à une longueur d'onde plus élevée λ_2 qui est sélectionnée par un filtre et détectée par une caméra sCMOS. Les images sont enregistrées par un ordinateur. L'objectif utilisé (grossissement 10X) permet de visualiser l'ensemble des pièges dans le champ de la caméra. En fluorescence, l'image des pièges et de la chambre en PDMS n'apparaît pas à l'écran, seules les particules apparaissent blanches sur fond noir, facilitant ainsi l'analyse d'image.

4) Méthode expérimentale

La suspension de billes fluorescentes de $5\ \mu\text{m}$ est préparée environ une heure avant l'expérience comme indiqué plus haut. Les puces en PDMS sont collées à une lamelle de verre au plasma et remplies juste après par une solution de surfactants (Ploxamer F-127, concentration de 0,3 % en masse) environ 30 minutes avant l'expérience. Ce pré-remplissage permet de s'affranchir des effets capillaires qui influent sur le flux lors de l'injection de la suspension de billes.

La suspension de billes est placée dans le réservoir d'entrée et est agitée pour homogénéisation. Le liquide est injecté à l'intérieur du tube d'entrée pour éviter la formation de bulles d'air dans le système. Puis le tube d'entrée est connecté à l'entrée de la puce et celle-ci est placée sur la platine du microscope, ainsi que le portoir à réservoirs. Une séquence d'images en fluorescence est lancée, et juste après une pression de $\Delta P = 50\ \text{mbar}$ est appliquée. Cette pression est choisie assez grande pour que la gravité ne joue pas un rôle prédominant dans le tube d'entrée (voir calcul ci-dessous de la vitesse de sédimentation), et assez faible pour que les gouttes d'huile restent piégées dans les pièges et ne s'échappent pas par déformation (la pression capillaire doit rester plus grande que la pression au niveau d'un piège). L'intervalle de temps entre deux images est de 4 - 2 secondes. La séquence d'image dure au total 2 - 4 minutes.

La même méthode expérimentale est suivie avec les gouttes d'huile fluorescentes, à la différence que les puces sont pré-remplies avec une solution de Ploxamer F-68 à 0,3 % en masse.

5) Utilisation d'une chambre rectangulaire pour commencer

5.1) Premières observations

Au début de nos expériences sur les pièges, nous avons fabriqué des pièges dans une chambre de forme rectangulaire. Une image du moule en résine servant à fabriquer ces pièges est sur la Figure 49A. Il s'agit du même réseau de pièges et des mêmes pièges, mais dans une chambre de forme rectangulaire. La largeur centrale des pièges est de $w_t = 3\ \mu\text{m}$. Nous avons injecté une suspension de billes fluorescentes de $5\ \mu\text{m}$ de diamètre suivant la méthode expérimentale présentée ci-dessus. La pression appliquée est de 50 mbar et le flux dans la puce est de $0,5\ \mu\text{L}/\text{min}$. La Figure 49B montre une séquence d'images prises au microscope optique à fluorescence du remplissage des pièges en fonction du temps. On constate que le remplissage se fait bien au début et à la fin de la chambre, mais qu'il subsiste une zone vide au milieu de la chambre au bout de 7 minutes d'injection.

La Figure 49C montre une simulation des lignes de champs des vitesses dans la chambre rectangulaire, réalisée avec le logiciel Comsol. La géométrie de la puce est respectée et la pression est fixée à 50 mbar. L'approximation du canal peu profond est appliquée de manière à faciliter les calculs de simulation (voir plus loin pour plus de détails sur cette approximation). On constate qu'au centre de la chambre, les lignes de courant sont symétriques (trajectoires en

zig-zag), et qu'au début et à la fin de la chambre, les lignes de courant sont dissymétriques et en diagonale.

C'est la corrélation entre un remplissage efficace et des lignes de champ dissymétriques qui nous a menés à fabriquer deux types de chambres : une chambre droite et une chambre décalée. Dans la chambre droite, les lignes de champ seront symétriques, et dans la chambre décalée, elles seront principalement en diagonale. Nous nous attendons donc à un bon remplissage dans la chambre décalée.

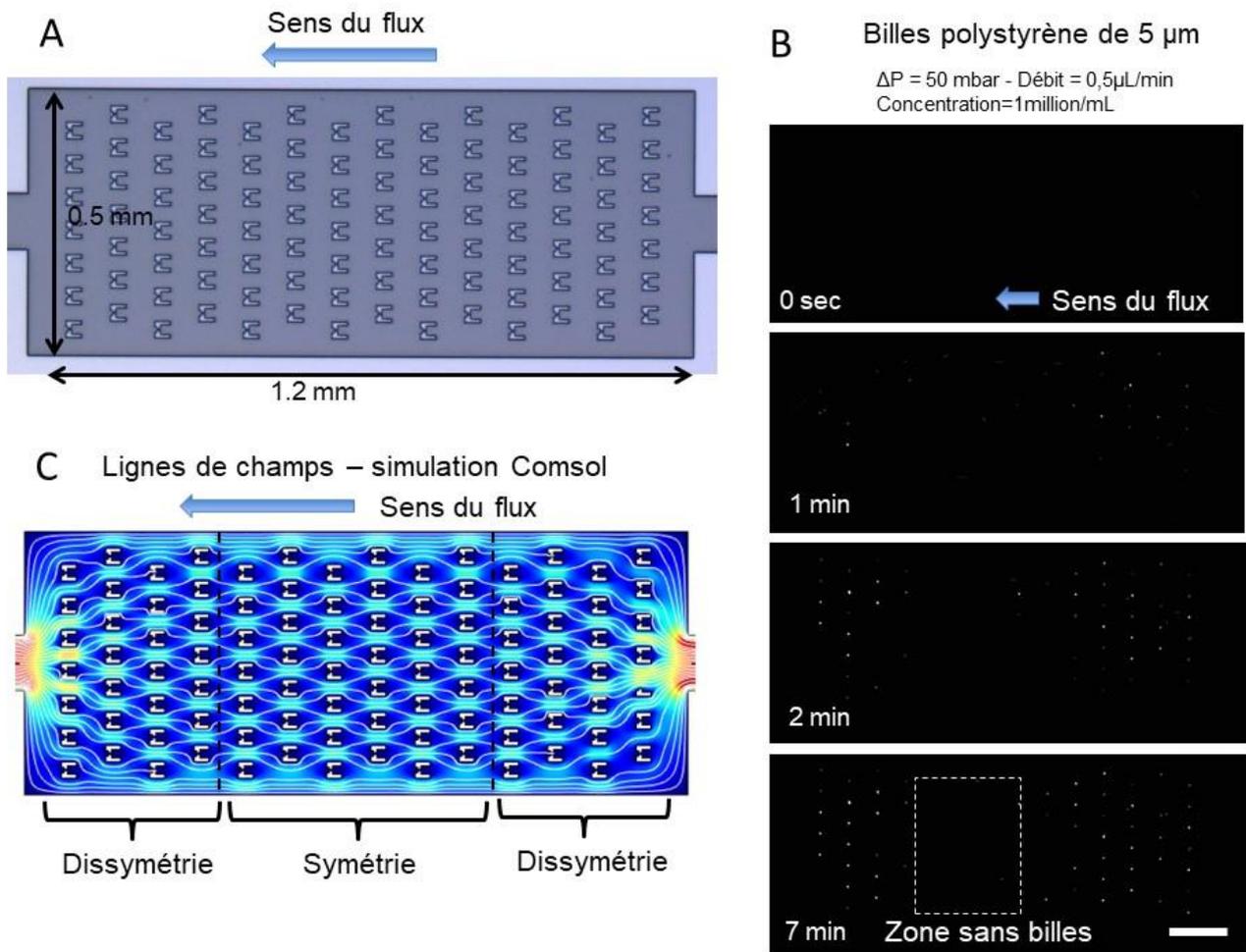


Figure 49. Premières expériences de capture de billes fluorescentes avec une chambre rectangulaire. (A) Image à la loupe binoculaire du moule en résine SU-8 permettant de fabriquer les pièges en PDMS. La longueur de la chambre vaut 1,2 mm et sa largeur vaut 0,5 mm. Il y a en tout 98 pièges ordonnés suivant un réseau hexagonal régulier. (B) Séquence d'images prises au microscope optique à fluorescence d'une chambre rectangulaire dans laquelle est injectée une suspension de billes fluorescentes (concentration de 1 million/mL). La pression appliquée est de 50 mbar et le flux dans la puce est de 0,5 µL/min. On constate qu'à $t = 7$ min, le remplissage des pièges se fait au début et à la fin de la chambre, mais pas au centre. Barre d'échelle : 200 µm. (C) Simulation des lignes de champs des vitesses avec le logiciel Comsol. La même géométrie de la puce est utilisée. La pression est fixée à 50 mbar et la hauteur de la chambre est prise à 10 µm. L'approximation du canal peu profond est utilisée (voir plus loin pour plus d'information).

5.2) Influence de la concentration sur la cinétique

Il peut être intéressant d'étudier la dépendance en la concentration initiale de billes sur le remplissage, à vitesse de flux fixée.

La Figure 50A montre la cinétique de remplissage pour différentes concentrations en billes de polystyrène de 5 μm . Le nombre de pièges occupés par au moins une bille est tracé en fonction du temps. Le nombre total de pièges est de 100. La chambre utilisée possède une forme rectangulaire (voir l'image du moule en résine sur la Figure 50B) avec un réseau de pièges identique à celui utilisé dans les chambres droites et décalées. Les suspensions de billes de 5 μm de plusieurs concentrations sont injectées suivant le protocole détaillé plus haut, avec à chaque fois un flux identique ($\Delta P = 50$ mbar).

On constate une forte augmentation du nombre de billes piégées au début, puis l'établissement d'un plateau. L'augmentation est d'autant plus forte et le plateau est d'autant plus haut que la concentration en billes est élevée. La plupart des pièges sont remplis pour une concentration de 2,5 millions par millilitre (90 % de remplissage), alors que 30 % des pièges sont remplis avec une concentration de 0,2 millions par millilitre.

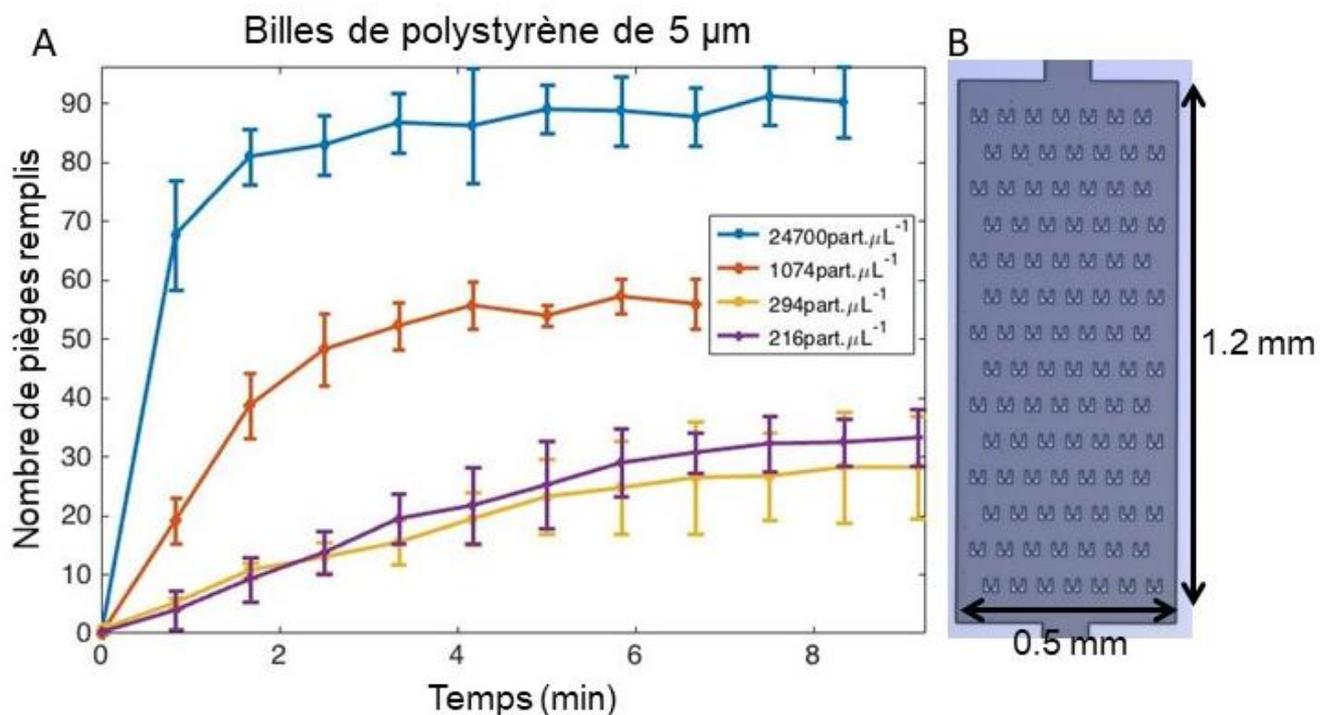


Figure 50. (A) Nombre de pièges remplis par au moins une bille de polystyrène fluorescentes de 5 μm en fonction du temps, pour différentes concentrations en billes. Le protocole d'injection est celui indiqué plus haut ($\Delta P = 50$ mbar). Le nombre total de pièges est de 100. (B) Image à la loupe binoculaire du moule en résine de la chambre utilisée pour cette série d'expériences faisant varier la concentration en billes. La chambre possède une forme rectangulaire.

Pour ce genre d'expérience faisant varier la concentration en bille, on s'attendrait à obtenir 100 % de remplissage pour toutes les concentrations, avec des pentes à l'origine différant selon les concentrations (pente élevée pour les grandes concentrations et pente faible pour de petites

concentrations). Or nous obtenons des courbes avec différents plateaux. Ceci est dû au phénomène de sédimentation des billes dans le tube d'arrivée, phénomène détaillé dans la suite, et qui induit une diminution progressive du nombre de billes entrant effectivement dans la chambre au cours du temps, jusqu'à ce qu'aucune bille ne soit présente, bien que le flux du liquide reste le même.

De manière à se rendre compte de la densité en bille correspondante à chaque concentration donnée sur la [Figure 50A](#), on peut calculer le nombre de billes présentes dans la chambre pour une concentration en billes de 1 millions/mL. Le volume de la chambre vaut $1,2 \text{ mm} \times 0,5 \text{ mm} \times 0,013 \text{ mm} \approx 10 \text{ nL}$. Une concentration en billes typique, correspondant à un bon remplissage des pièges, vaut 1 millions/mL (courbe orange de la [Figure 50A](#)). Le nombre de billes correspondant à cette concentration, dans la chambre est donc de 10. Comme il y a 100 pièges par chambre, cela donne 0,1 billes par piège. Le fait que nous obtenons un bon remplissage avec seulement 0,1 billes par piège est déjà un résultat satisfaisant. En outre, cette concentration de 1 millions/mL correspond aux concentrations typiques que l'on peut obtenir avec une suspension de cellules B à partir d'une culture cellulaire, donc ces pièges sont adaptés à la capture de cellules B.

6) Premières observations avec la chambre droite et décalée

6.1) Remplissage simple pour les billes de $5 \mu\text{m}$

Nous avons voulu savoir comment se fait le remplissage spatialement et temporellement dans chacune des chambres (droite et décalée), et pouvoir comparer ensuite ce remplissage dans ces deux types de chambre. Nous avons utilisé ici les premiers types de pièges ($w_t = 3 \mu\text{m}$).

Dans la chambre droite, on s'attend à des lignes de champ globalement dirigées suivant l'axe de la puce car l'entrée et la sortie sont dans le même axe. La forme divergente de l'entrée et convergente de la sortie permet une adaptation des lignes de courant vers un flux dirigé suivant l'axe de la puce. Les piliers longs en PDMS servent à soutenir la chambre et ne perturbent pas le flux. Dans la chambre décalée, on s'attend à des lignes de champ dirigées globalement suivant la diagonale de la chambre, liant l'entrée et la sortie. Ces hypothèses seront vérifiées lors de l'observation des lignes de champ obtenues expérimentalement et par simulation numérique.

La [Figure 51](#) montre les images des billes fluorescentes obtenues pour le cas de la chambre droite (gauche) et le cas de la chambre décalée (droite). Sur la centaine d'images enregistrées, nous avons sélectionné celles correspondant au temps initial d'injection des billes dans la puce ($t = 0$), et aux temps $t = 20 \text{ sec}$, $t = 134 \text{ sec}$ et $t = 180 \text{ sec}$, dans le cas de la chambre droite et dans le cas de la chambre décalée. La direction du flux va de droite à gauche. La concentration des billes est de 1 millions par millilitre. La différence de pression, de 50 mbar, génère un flux de $0,5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ (calculé à partir des résistances hydrodynamiques) avec une vitesse moyenne de la solution aqueuse de $1,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ dans la chambre microfluidique.

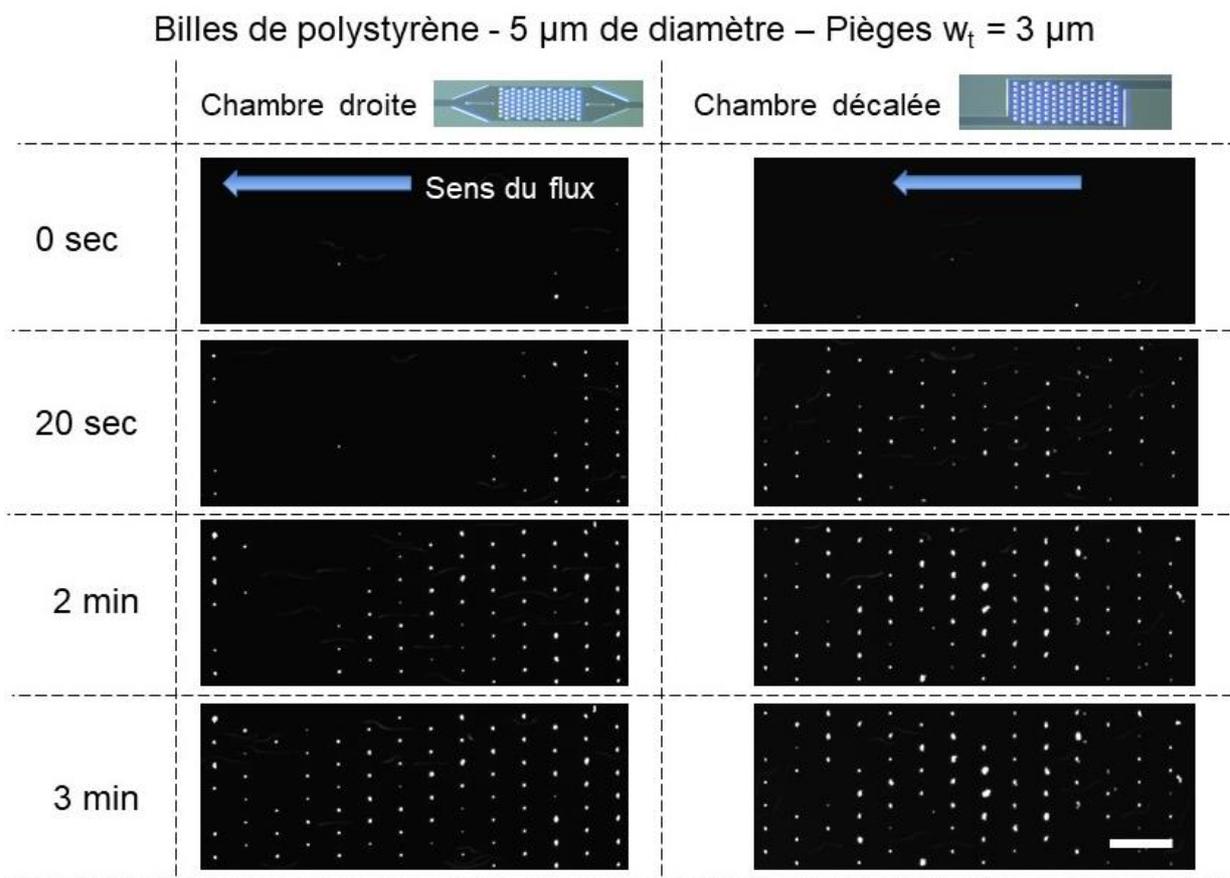


Figure 51. Images prises au microscope à épi-fluorescence des billes de polystyrène de 5 μm capturées dans les pièges avec un espacement central de $w_t = 3 \mu\text{m}$, dans le cas de la chambre droite (gauche) et de la chambre décalée (droite). Les images ont été prises au temps initial d'injection des billes dans la puce ($t = 0$), à $t = 20 \text{ sec}$, $t = 134 \text{ sec}$ et $t = 180 \text{ sec}$. Le filtre utilisé est le filtre GFP. La direction du flux va de droite à gauche. La différence de pression est de 50 mbar, générant ainsi un flux de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec une vitesse moyenne de 1,2 mm/s dans la chambre microfluidique. La concentration des billes est de 1 millions par millilitre. La barre d'échelle vaut 150 μm .

La Figure 51 montre comment se fait le remplissage dans chaque chambre, spatialement et temporellement. On constate que :

- Pour la chambre droite, les pièges les plus à droites (les premiers à rencontrer les billes) se remplissent en premier, puis leurs voisins plus à gauche se remplissent et ainsi de suite jusqu'à ce que toute la chambre soit remplie. Ce remplissage progressif fait penser à l'avancement d'un front de diffusion dont la vitesse est estimée à $5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Cette vitesse est très faible devant la vitesse moyenne du flux de la solution aqueuse dans la chambre microfluidique (de l'ordre de $1,2 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$).
- Pour la chambre droite, les derniers pièges à rencontrer le flux (à gauche) se remplissent aussi dès les premiers instants, comme les premiers (à droite) mais on ne note pas d'expansion de la zone de remplissage dans ce cas-là.
- Pour la chambre décalée, le remplissage est homogène globalement mais plusieurs fois il a été remarqué un remplissage préférentiel au centre de la chambre.
- Dans la plupart des cas, le remplissage est beaucoup plus rapide dans le cas de la chambre décalée que dans la chambre droite, à concentrations en billes égales.

Nous voyons ici que la géométrie de la chambre, pour une géométrie de pièges et un réseau donné, a une grande influence sur le remplissage des pièges, à la fois spatialement et temporellement. La chambre décalée semble être plus efficace que la chambre droite. Nous nous proposons dans la suite d'évaluer quantitativement ces différences.

Notons que les mêmes observations ont été faites avec les gouttes de $5,0 \mu\text{m}$ de diamètre fabriquées avec la cellule de Couette (voir la distribution en taille et la cinétique de remplissage plus bas).

6.2) Remplissage simple pour les gouttes de $14,4 \mu\text{m}$

Nous avons réalisé la même expérience de remplissage avec des gouttes faites en microfluidique de $14,4 \mu\text{m}$ de diamètre. Pour faciliter leur détection, nous les avons rendues fluorescentes par dissolution en volume du colorant Nile Red visible avec le filtre Cy5 (voir plus haut pour plus de détails sur le protocole). Nous avons utilisé ici les seconds types de pièges (espacement central de $w_t = 7 \mu\text{m}$).

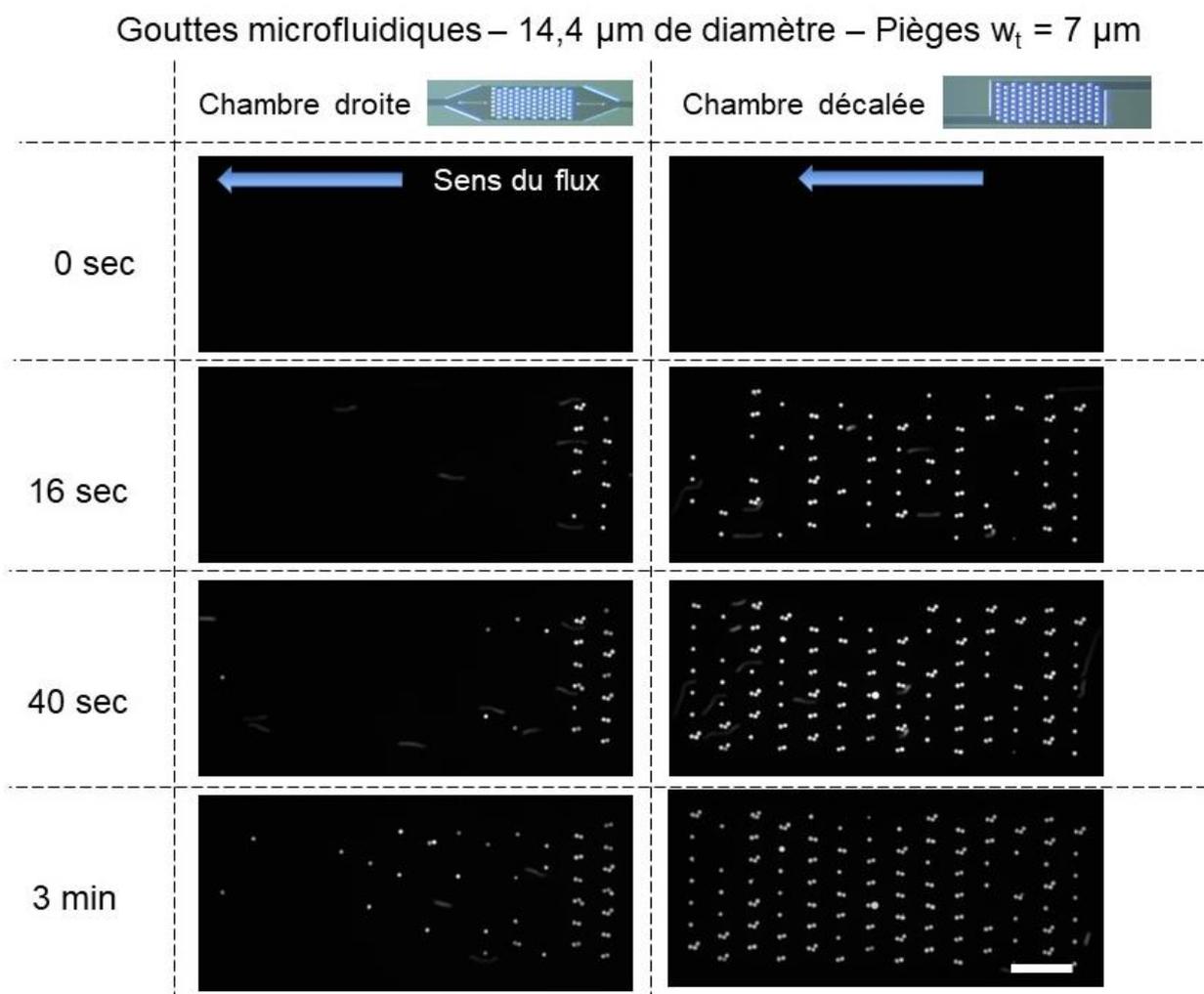


Figure 52. Images prises au microscope à épi-fluorescence des gouttes d'huile de $14,4 \mu\text{m}$ fabriquées en microfluidique et capturées dans les pièges avec un espacement central $w_t = 7 \mu\text{m}$, dans le cas de la chambre droite (gauche) et de la chambre décalée (droite). Les images ont été prises au temps initial d'injection des billes dans la puce ($t = 0$), à $t = 16 \text{ sec}$, $t = 40 \text{ sec}$ et $t = 3 \text{ min}$. Le filtre utilisé est le filtre Cy3. La direction du flux va de droite à gauche. La différence de pression est de 50 mbar , générant ainsi

un flux de $0,5 \mu\text{L}/\text{min}$ avec une vitesse moyenne de $1,2 \text{ mm}/\text{s}$ dans la chambre microfluidique. La barre d'échelle vaut $150 \mu\text{m}$.

Les gouttes sont injectées avec la même pression que les billes de polystyrène (50 mbar), et avec une concentration de $3 \text{ millions}/\text{mL}$). Les séquences d'images en fluorescence sont visibles sur la Figure 52, dans le cas de la chambre droite (colonne de gauche), et dans le cas de la chambre décalée (colonne de droite). On fait les mêmes remarques que pour les billes de polystyrène :

- la chambre droite se remplit dans la zone du début, puis difficilement dans le reste de la chambre ;
- le remplissage des pièges dans la chambre décalée est rapide et se fait de manière homogène spatialement ;
- le remplissage de la chambre décalée est beaucoup plus rapide que celui de la chambre droite. En effet, on constate que le remplissage est quasiment complet dès $t = 16 \text{ secondes}$ dans la chambre décalée, alors que la chambre droite est remplie à moitié au bout de 3 minutes .

La Figure 53 montre des images prises au microscope optique en lumière blanche des gouttes de $14,4 \mu\text{m}$ de diamètre à $t = 3 \text{ minutes}$ dans le cas de la chambre droite (A) et de la chambre décalée (B). On retrouve bien un meilleur remplissage dans la chambre décalée.

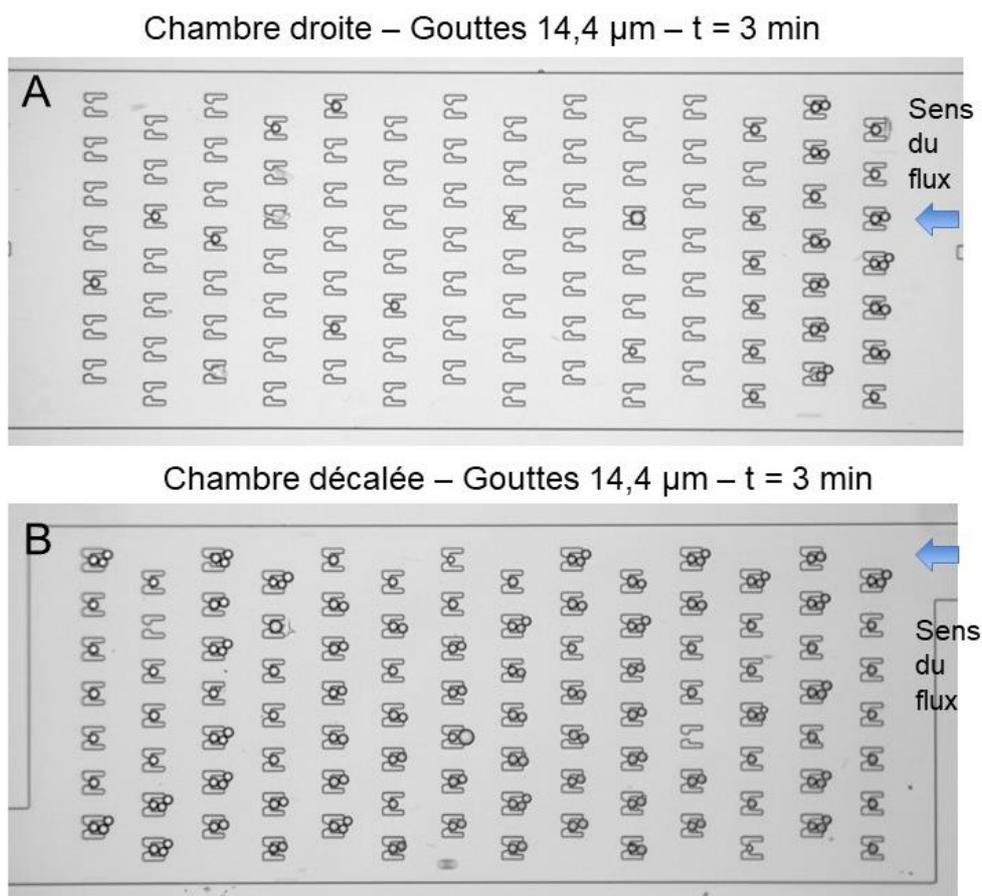


Figure 53. Images au microscope optique de gouttes de $14,4 \mu\text{m}$ de diamètre piégées dans une chambre droite (A) et dans une chambre décalée (B). Dans chaque cas, la pression appliquée est de 50 mbar et le temps après injection est de 3 minutes . Les gouttes ont été fabriquées en microfluidique avec une puce de type "flow-focusing". Les pièges sont du second type (espacement central $w_c = 7 \mu\text{m}$).

6.3) Inversion du flux

Nos pièges peuvent piéger deux objets différents par la méthode l'inversion du flux présentée plus haut. En effet, ils possèdent un piège à l'avant (piège « principal »), et un piège à l'arrière de dimensions plus petites, comme les pièges fabriqués par Skelley *et al.* [52]. Nous avons voulu savoir si la méthode de l'inversion du flux donnait de bons résultats avec nos pièges à une seule couche en résine.

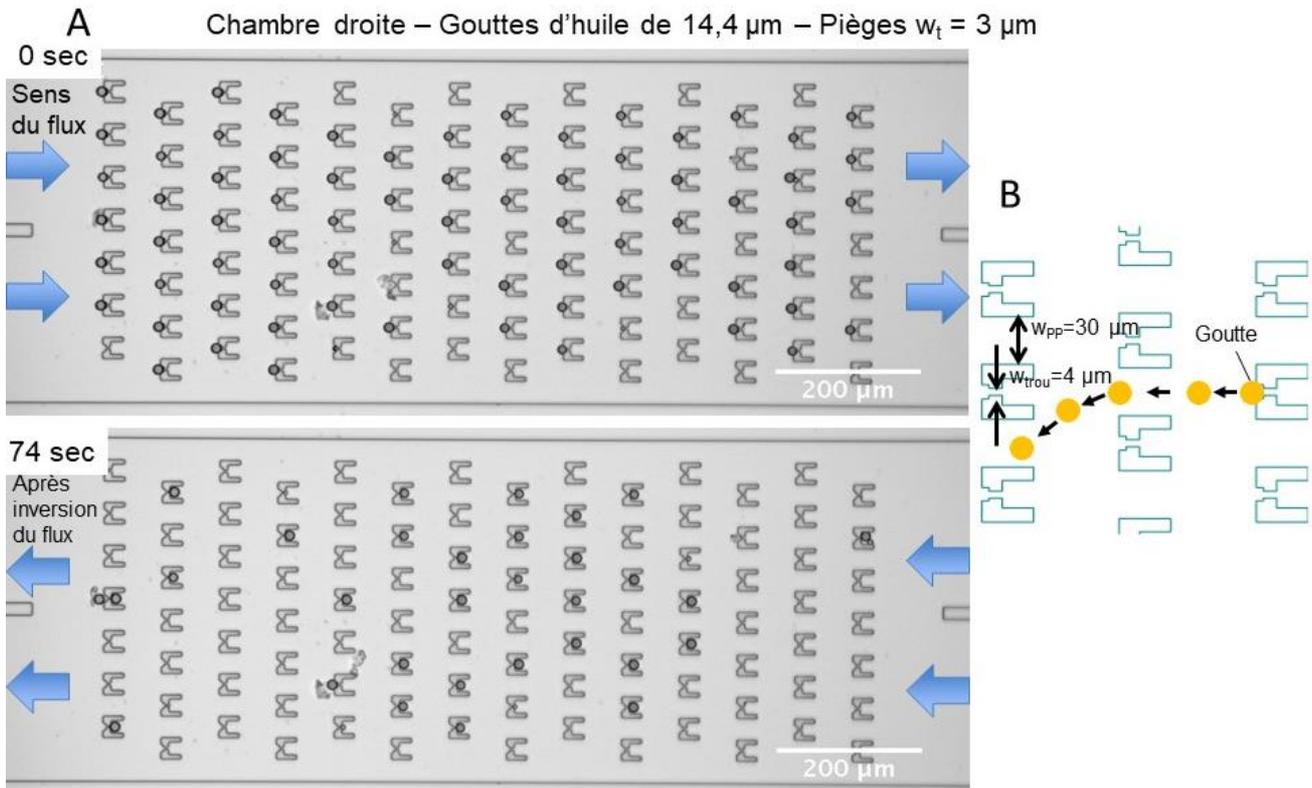


Figure 54. Méthode d'inversion du flux avec des gouttes d'huile de $14,4 \mu\text{m}$ de diamètre faites en microfluidique, et en utilisant la chambre droite. A $t = 0 \text{ sec}$, le flux est dirigé de gauche à droite de manière à piéger les gouttes à l'arrière des pièges. La concentration en gouttes est d'environ 2 millions/mL. Puis, le sens du flux est inversé en appliquant une faible différence de pression (3 - 4 mbar). Sur 80 pièges contenant une goutte à l'arrière au départ, une trentaine de gouttes sont retenues après inversion du flux. Les pièges sont du premier type (espacement central $w_t = 3 \mu\text{m}$). (B) Géométrie des pièges et trajectoire d'une goutte d'huile piégée à l'arrière d'un piège pendant l'inversion du flux.

La Figure 54A montre une image prise au microscope optique des gouttes piégées à l'arrière de la quasi-totalité des pièges, dans une chambre droite. Ces gouttes possèdent toutes un diamètre de $14,4 \mu\text{m}$ et ont été fabriquées en microfluidique (voir plus haut). Puis le sens du flux est inversé en appliquant une faible différence de pression (3 - 4 mbar). L'image du bas de la Figure 54A montre le résultat. Il y a environ une trentaine de gouttes retenues dans les pièges « avant », sur 80 présentes au départ, ce qui donne un pourcentage de réussite de 40 %, ce qui est assez satisfaisant.

Néanmoins, dans la suite, nous n'avons pas gardé cette méthode car sa mise en œuvre est assez laborieuse expérimentalement, surtout lorsque le nombre de solutions à injecter dans la puce dépasse 3, ce qui sera notre cas pour les expériences avec les cellules.

De plus, le pourcentage de réussite de l'inversion peut varier de manière assez grande suivant les expériences. Ceci est dû au fait que les gouttes préfèrent passer entre les pièges plutôt qu'à l'intérieur d'un piège, comme illustré sur la Figure 54B. En effet, la résistance hydrodynamique dans le piège est plus grande que la résistance hydrodynamique entre deux pièges. Le rapport de la résistance hydrodynamique dans un piège R_{trou} sur celle entre deux pièges R_{PP} s'écrit (voir plus haut) :

$$Rapport = \frac{R_{trou}}{R_{PP}} = \frac{w_{PP}h^2}{w_{trou}^3}$$

Avec les dimensions de nos pièges $h = 14 \mu m, w_{PP} = 30 \mu m, w_{trou} = 3 \mu m$, on obtient un rapport de résistances $Rapport = 220$. On en déduit que le flux entre deux pièges est largement plus grand que le flux dans un piège. Si la goutte piégée à l'arrière d'un piège n'est pas exactement dans l'axe du piège situé derrière lui, il y a donc peu de chance pour que cette goutte soit piégée. Cela explique le fait que cette méthode d'inversion de flux, dans le cas de nos pièges, ne donne pas de résultats fiables. Des pièges à deux couches comme ceux de Skelley *et al.* apporteraient peut être une amélioration dans la mesure où la résistance dans le piège à deux couches serait plus faible que dans le piège à une couche.

7) Étude quantitative

L'étude quantitative que nous avons menée s'attache à décrire le remplissage de manière temporelle et spatiale. La cinétique de remplissage donne un nombre de pièges remplis en fonction du temps, indépendamment de la répartition spatiale. Une manière de caractériser la répartition spatiale est d'établir une carte de remplissage donnant pour chaque piège le nombre de billes capturées. Nous donnons également la statistique de remplissage, ce phénomène mettant en jeu un grand nombre de particules.

7.1) Méthode d'analyse d'images

Les images enregistrées, comme par exemple celles de la Figure 10, sont d'abord seuillées en intensité de manière à s'abstraire de l'intensité du « fond » et à conserver l'intensité des billes. Deux types d'analyses différentes sont ensuite menés :

- 1- Pour tracer une cinétique suivant le nombre de pièges possédant au moins une bille, nous dénombrons, pour chaque temps, le nombre de d'objets possédant une intensité plus grande que le seuil. A chaque temps correspond ainsi un nombre que nous pouvons tracer. Les cinétiques obtenues sont représentées sur la Figure 56.
- 2- Pour établir une carte de remplissage, à un instant donné, indiquant pour chaque piège le nombre de billes capturées, il faut établir une correspondance entre l'intensité des billes capturées dans un piège et le nombre de billes dans ce piège. La Figure 55A montre les images en fluorescence en fonction du temps d'un piège. On constate l'apparition d'un point lumineux dont l'intensité et la surface croissent dans le temps, à chaque fois qu'une bille

entre dans le piège. La Figure 55B montre l'intensité intégrée des billes en fonction du temps, pour plusieurs pièges. Chaque « saut » en intensité correspond à l'arrivée d'une bille fluorescente dans le piège. De la valeur de chaque palier, on a donc une indication du nombre de billes dans le piège.

Il reste à attribuer à chaque piège son nombre de billes. Cela nécessite de quadriller le champ de l'image de manière à former des fenêtres ne contenant qu'un seul piège. La localisation d'un piège est donnée par la localisation de sa fenêtre (colonne numéro i et ligne numéro j). A chaque fenêtre est attribuée un nombre de billes. On obtient alors une image simplifiée ne contenant que l'information nécessaire. Chaque fenêtre est un pixel et la valeur de chaque pixel donne le nombre de bille dans le piège en question. De telles images sont représentées sur la Figure 57. Cette manière de représenter le remplissage peut s'avérer utile pour une analyse de corrélation d'images par la suite.

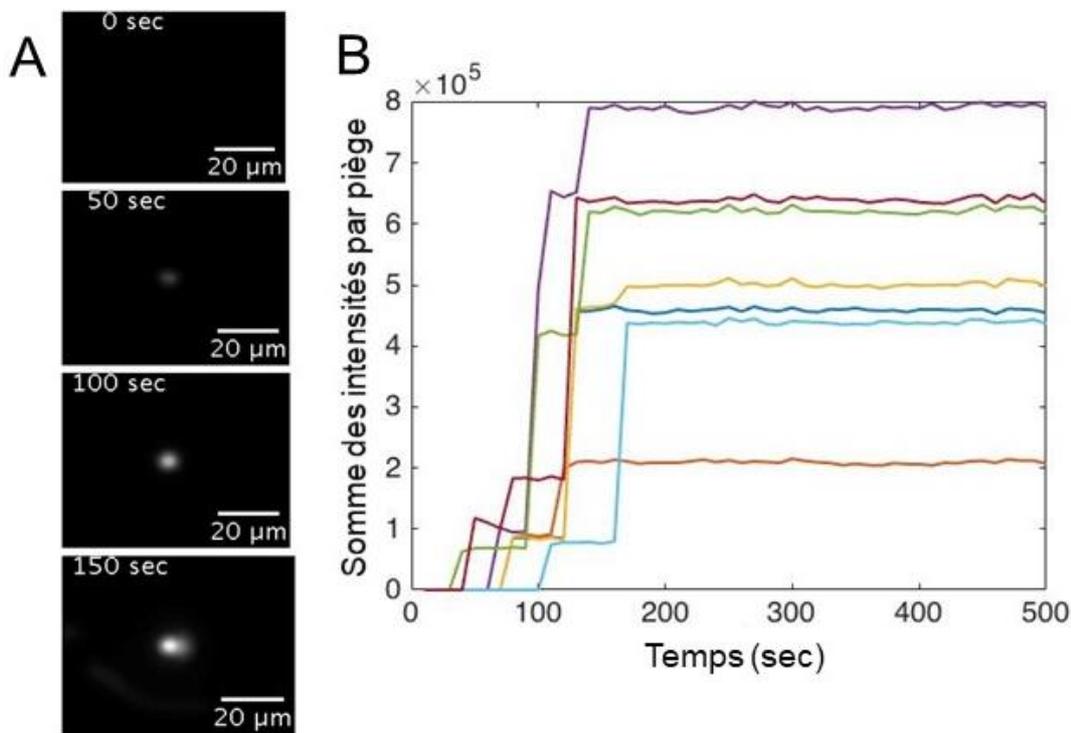


Figure 55. (A) Image en fluorescence d'un piège en fonction du temps. A chaque fois qu'une bille de polystyrène fluorescente est capturée, l'intensité de la fluorescence augmente. Ici trois billes de 5 μm sont capturées dans un piège. (B) Mesure de la somme des intensités par piège pour plusieurs pièges, en fonction du temps. Chaque « saut » en intensité correspond à l'arrivée d'une bille fluorescente dans le piège.

7.2) Cinétiques de remplissage

La Figure 56 montre les cinétiques obtenues après analyse d'image (décrite plus haut). Ces courbes représentent le rapport du nombre de pièges remplis par au moins une bille sur le nombre total de pièges (100), en fonction du temps. Le cas des billes fluorescentes de 5 μm est montré sur la Figure 56(A) et celui des gouttes d'huile fluorescentes de 5 μm et 14,4 μm sur la Figure 56(B) et (C). Les courbes bleues correspondent à des expériences faites avec la chambre décalée, et les courbes oranges celles faites avec la chambre droite. La concentration en billes est fixée à 1 millions par millilitre et celle en gouttes de 5 μm et de 14,4 μm à 3 millions/mL. Chaque courbe est une moyenne sur N courbes expérimentales et les barres d'erreur correspondent à la déviation standard sur ces N courbes (le nombre N figure dans la légende). Les pièges du premier type (espacement central de $w_t = 3 \mu\text{m}$) ont été utilisés pour (A) et (B), et les pièges du second type (espacement central de $w_t = 7 \mu\text{m}$) pour (C).

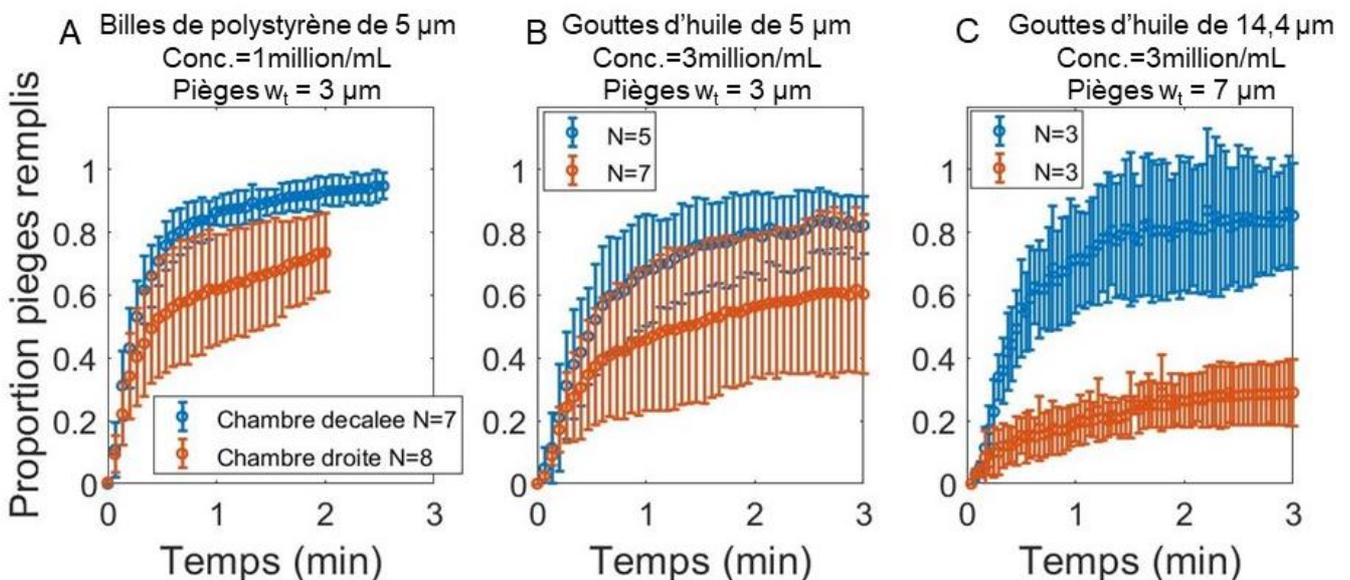


Figure 56. Rapport du nombre de pièges remplis par au moins une particule sur le nombre total de pièges dans une chambre (100), en fonction du temps, dans le cas des billes fluorescentes de 5 μm (A), des gouttes d'huile fluorescentes de 5 μm (B) et des gouttes d'huile fluorescentes de 14,4 μm (C). Les courbes en bleu correspondent au remplissage avec la chambre décalée, et les courbes en orange au remplissage avec la chambre droite. La concentration en billes et en gouttes est fixée à 1 million par millilitre pour (A), et 3 millions par millilitre pour (B) et (C). Les pièges du premier type (espacement central de $w_t = 3 \mu\text{m}$) ont été utilisés pour (A) et (B), et les pièges du second type (espacement central de $w_t = 7 \mu\text{m}$) pour (C). La pression ΔP est fixée à 50 mbar. Chaque courbe est une moyenne sur N courbes expérimentales (N figure dans la légende) et les barres d'erreur correspondent à la déviation standard associée.

Les courbes de remplissage augmentent fortement au début de la cinétique, puis de moins en moins, pour atteindre finalement un plateau. On constate que pour certaines courbes, la valeur du plateau ne vaut pas 1 aux temps longs. Ceci est dû au fait que le nombre de billes injectées réellement dans la chambre décroît avec le temps, à cause de phénomènes de sédimentation des billes dans les canaux d'arrivée. Les billes se déposent sur la paroi des tubes

d'arrivée, et comme la vitesse du liquide est nulle à la paroi, les billes s'arrêtent dans le tube sans arriver à la chambre microfluidique.

On constate que, à la fois pour les billes et les gouttes, le remplissage est plus efficace et plus rapide avec la chambre décalée qu'avec la chambre droite.

En effet, dans le cas des billes (A), la valeur du plateau est de 0,9 pour la chambre décalée et de 0,7 dans le cas de la chambre droite. Le temps caractéristique est estimé à 20 secondes pour la chambre décalée contre 40 secondes pour la chambre droite.

Dans le cas des gouttes d'huile de 14,4 μm (C), cette différence est encore plus marquée puisque la valeur du plateau pour la chambre décalée est à 0,8 contre 0,3 pour la chambre droite. Dans le cas de la chambre droite (courbes oranges), le fait que le nombre de gouttes de 14,4 μm piégées est plus faible que le nombre de billes et de gouttes de 5 μm piégées peut s'expliquer par le fait que les gouttes remontent plus vite « en surface » sous l'action de la pesanteur que les billes ne sédimentent. En effet, les gouttes d'huile de soja ont une densité de 0,917 g.mL^{-1} contre 1,05 g.mL^{-1} pour les billes de polystyrène. L'écart en densité avec l'eau est donc légèrement plus grand pour les gouttes que pour les billes (8 % au lieu de 5 %), mais cet écart ne semble pas expliquer les différences de remplissage observées. En effet, les gouttes de 5 μm et de 14,4 μm ont la même densité, et pourtant des remplissages différents dans le cas de la chambre droite.

Le paramètre déterminant est ici plutôt la taille des objets piégés. En effet, les gouttes de 14,4 μm sont plus grosses que les billes et que les gouttes de 5 μm , ce qui fait que la vitesse de remontée des gouttes est plus grande que la vitesse de sédimentation des billes. La vitesse de remontée ou de sédimentation, dans un écoulement avec un nombre de Reynolds petit devant 1, est en effet proportionnelle au carré du diamètre de la particule. On peut retrouver ce résultat en équilibrant le poids et la force visqueuse exercés sur une bille sphérique :

$$\rho \frac{4}{3} \pi R^3 g \sim 6 \pi \mu R V_{sed}$$

$$\text{d'où } V_{sed} = \frac{2 \rho g}{9 \mu} R^2$$

avec R le rayon de la bille, g le pesanteur, ρ la masse volumique de la bille, et μ la viscosité dynamique du liquide. Dans le cas des gouttes avec $R = 7 \mu\text{m}$, $g = 9,8 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $\mu = 1 \cdot 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$, $\rho = 0,9 \cdot 10^3 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, on calcule une vitesse de sédimentation pour les gouttes d'huile de diamètre 14,4 μm de $V_{sed,gouttes} = 0,1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. La vitesse de sédimentation des billes et des gouttes de 5 μm est donnée par $V_{sed,gouttes} \times (R_{bille}/R_{goutte})^2$. On trouve $V_{sed,billes} = 0,02 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$.

Ces vitesses doivent être comparées à la vitesse moyenne du liquide dans le tuyau d'arrivée. Le flux moyen dans la puce φ est de l'ordre de 0,5 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ pour une différence de pression de 50 mbar. Le flux s'exprime en fonction de la vitesse moyenne dans le tube d'arrivée comme ;

$$\varphi = \pi R_{tube}^2 V_{moy}$$

$$\text{d'où } V_{moy} = \frac{\varphi}{\pi R_{tube}^2}$$

avec R_{tube} le rayon intérieur du tuyau d'arrivée. En prenant $R_{tube} = 150 \mu\text{m}$ et $\varphi = 0,5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, on arrive à une vitesse moyenne du liquide dans le tuyau d'arrivée de $V_{moy} =$

$0,1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$, qui est du même ordre de grandeur que la vitesse de sédimentation des gouttes de $14,4 \text{ }\mu\text{m}$ de diamètre. La sédimentation dans le tube d'arrivée, en amont de la puce, a bien un impact sur la trajectoire des gouttes, et en moindre mesure sur celle des billes et des gouttes de $5 \text{ }\mu\text{m}$. Les gouttes, une fois atteintes les parois du tube n'avancent plus car la vitesse est nulle proche de parois solides.

Notons que les barres d'erreur pour les gouttes sont pour la plupart plus grandes que celles pour les billes. Ceci est sûrement dû au fait que la concentration initiale en gouttes est plus difficile à contrôler expérimentalement que celle des billes. Comme nous l'avons vu dans le cas d'une chambre rectangulaire (voir plus haut), le nombre d'objets piégés dépend de la concentration initiale en objets présents dans la solution.

En ce qui concerne les courbes pour la chambre droite, les barres d'erreur sont plus grandes pour les billes et les gouttes de $5 \text{ }\mu\text{m}$ que pour les gouttes de $14,4 \text{ }\mu\text{m}$ ($\Delta R = \pm 0,2$ pour les billes contre $\Delta R = \pm 0,1$ pour les gouttes de $14,4 \text{ }\mu\text{m}$). Néanmoins, le nombre de pièges remplis est plus faible pour les gouttes. Si on compare les erreurs relatives, on arrive à $\Delta R/R = \pm 0,2/0,7 = 0,3$ pour les billes, et $\Delta R/R = \pm 0,1/0,25 = 0,4$ pour les gouttes de $14,2 \text{ }\mu\text{m}$, ce qui est assez proche.

Notons enfin que, à notre connaissance, la littérature concernant les pièges donne assez peu de renseignements sur la cinétique de remplissage des pièges en réseau, ni sur l'efficacité finale de ces pièges. De fait, nous n'avons pas vraiment d'exemples de comparaison.

7.3) Répartition spatiale

Nous exposons dans ce paragraphe les résultats concernant les cartes de remplissage en nombre d'objets par piège dont la méthode d'analyse a été exposée plus haut. La Figure 57 montre ces cartes dans le cas des billes de polystyrène de $5 \text{ }\mu\text{m}$ (A-B) et dans le cas des gouttes d'huile de $14,4 \text{ }\mu\text{m}$ (C-D), pour la chambre droite et pour la chambre décalée. Elles se présentent comme des images de $7 \text{ pixels} \times 14 \text{ pixels}$. Chaque pixel représente un piège, et le nombre d'objets présents dans le piège est indiqué par un code couleur dont l'échelle est à droite de l'image et qui va de 0 à 6. L'injection des particules a été faite suivant le protocole indiqué plus haut ($\Delta P = 50 \text{ mbar}$, concentration en billes de 1 million/mL et de 3 millions/mL en gouttes). Les pièges du premier type (espacement central de $w_t = 3 \text{ }\mu\text{m}$) ont été utilisés pour les billes, et les pièges du second type (espacement central de $w_t = 7 \text{ }\mu\text{m}$) pour les gouttes de $14,4 \text{ }\mu\text{m}$. Le sens d'injection va de droite à gauche comme indiqué par la flèche bleue. Ces cartes ont été réalisées pour un temps après injection de 40 secondes.

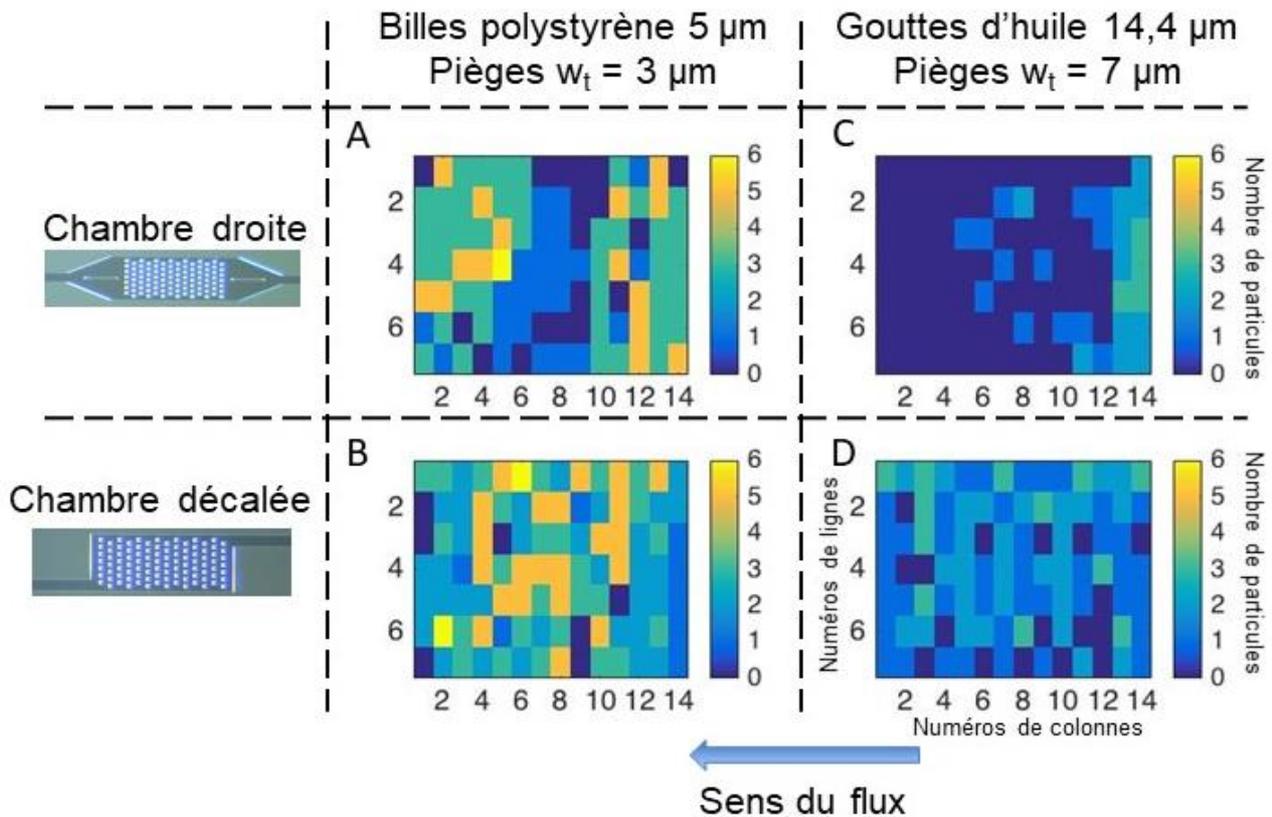


Figure 57. (A-B) Cartes de remplissage pour les billes de polystyrène de $5\ \mu\text{m}$ dans le cas de la chambre droite (A) et de la chambre décalée (B). (C-D) Cartes de remplissage pour les gouttes d'huile de $14,4\ \mu\text{m}$ dans le cas de la chambre droite (C) et de la chambre décalée (D). Le protocole de remplissage est celui indiqué plus haut ($\Delta P = 50\ \text{mbar}$, concentration de 1 million par millilitre en billes et de 3 millions par millilitre en gouttes). Les cartes sont faites à $t = 40\ \text{sec}$. Le sens d'injection va de droite à gauche comme indiqué par la flèche bleue. Les pièges du premier type (espacement central de $w_t = 3\ \mu\text{m}$) ont été utilisés pour les billes, et les pièges du second type (espacement central de $w_t = 7\ \mu\text{m}$) pour les gouttes.

Dans le cas des gouttes d'huile de $14,4\ \mu\text{m}$, on observe quelques gouttes piégées au début de la chambre droite (entre 1 et 2) et aucune à la fin. On observe plus de gouttes piégées dans la chambre décalée, et un remplissage plus homogène (entre 1 et 3 gouttes par piège). Dans la suite, nous concentrons notre étude aux billes de polystyrène, pour lesquelles nous avons réalisé un plus grand nombre d'expériences.

Pour les billes de $5\ \mu\text{m}$, on observe entre 3 et 6 billes par piège au début et à la fin de la chambre droite et entre 0 et 1 bille au centre. Pour la chambre décalée, on observe entre 3 et 6 billes par piège au milieu, et entre 0 et 3 au début et à la fin. En moyenne, on constate que la chambre décalée contient plus de billes que la chambre droite, et que le remplissage est plus homogène.

En conclusion, la chambre décalée reste mieux remplie que la chambre droite à la fois pour les gouttes et les billes (nombre de billes piégées plus grand et remplissage plus homogène).

Concernant les billes, il apparaît pour la chambre droite que le milieu se remplit moins que le début et la fin, alors que pour la chambre décalée le milieu se remplit mieux que le début

et la fin. Ces mesures confirment nos premières observations faites à partir d'images issues directement de l'expérience.

Outre des informations quantitatives sur le remplissage des pièges, ces cartes peuvent être des outils pour une analyse comparative numérique entre deux « états ». Par exemple, des opérations de corrélations de cartes peuvent être facilement faites.

7.4) Statistique de remplissage

Connaissant le nombre de billes par piège à un instant donné, il est aisé de tracer une distribution. La Figure 58 montre le pourcentage de pièges avec le nombre de billes n correspondant, dans le cas de la chambre décalée, avec les premiers types de piège ($w_t = 3 \mu\text{m}$). La courbe violette est tracée pour $t = 20 \text{ sec}$ et la courbe jaune pour $t = 1 \text{ min}$.

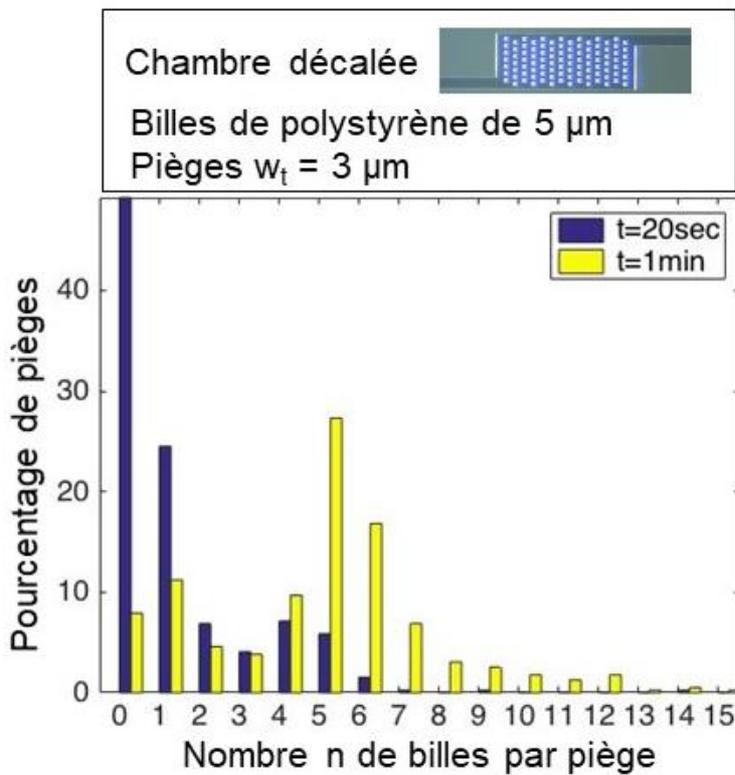


Figure 58. Pourcentage de pièges possédant un nombre n donné de billes de polystyrène par piège, à $t = 20 \text{ sec}$ (barres bleues) et à $t = 1 \text{ min}$ (barres jaunes). Le protocole de remplissage est celui indiqué plus haut ($\Delta P = 50 \text{ mbar}$, concentration de 2 millions par millilitre en billes). Pour les deux distributions, la chambre utilisée est la chambre décalée, avec les premiers types de piège ($w_t = 3 \mu\text{m}$). Chaque distribution est une moyenne de $N = 4$ distributions issues de mesures directes. Les histogrammes sont construits à partir des données des cartes de remplissage (voir plus haut). Les pièges du premier type (espacement central de $w_t = 3 \mu\text{m}$) ont été utilisés.

On voit qu'à $t = 20 \text{ sec}$, il y a un nombre important de pièges sans billes (environ 50 %), environ 25 % de pièges avec une seule bille, et moins de 10 % pour les pièges avec deux billes ou plus. Ce type de distribution est typique d'une distribution de Poisson d'espérance $\lambda = 1$. On voit néanmoins apparaître un pic secondaire pour un nombre de bille égale à $n = 4$.

A $t = 1$ min, on constate que le petit pic à $n = 4$ a augmenté en taille pour atteindre les 30 %, ce qui montre que les pièges contiennent préférentiellement $n = 4 - 5$ billes. La majorité des pièges sont remplis comme le montre la disparition du pic à $n = 0$.

Notre objectif dans la suite sera de capturer une goutte par piège, puis d'ajouter une cellule sur cette goutte. On voit sur l'histogramme bleu correspondant à $t = 20$ sec que si l'on cherche à capturer un seul objet par piège (et pas deux ou plus), il y aura forcément une assez grande quantité de pièges vides dans la chambre (près de la moitié dans le cas des billes de $5 \mu\text{m}$).

8) Simulations numériques

La simulation numérique des flux dans une puce microfluidique se révèle un outil performant pour la caractérisation et l'optimisation de celle-ci. Les simulations numériques effectuées ici sont comparées aux résultats expérimentaux. Nous nous en servons également afin de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu. Elles sont réalisées dans ce travail avec le logiciel Comsol 5.2. Il faut noter qu'il s'agit de simulations de la vitesse du liquide et pas des billes de $5 \mu\text{m}$ de diamètre (en général plus faible que celle du liquide). La simulation de la vitesse des billes dans les pièges nécessite un travail plus approfondi, entrepris par exemple par Xu *et al.* [53], et impliquant notamment la modélisation de l'interaction bille-liquide.

8.1) Hypothèses et méthodes

Pour la simulation de l'écoulement dans une puce microfluidique, des hypothèses préalables sur la nature de l'écoulement, la nature du fluide et les conditions aux limites sont nécessaires.

Etant donné les faibles dimensions du système, l'écoulement est supposé laminaire. Le liquide (eau) est supposé newtonien. La condition aux limites de non-glissement (vitesse nulle) est adoptée aux interfaces liquide-solide :

$$\vec{V} = \vec{0} \text{ aux parois}$$

On se place dans un régime stationnaire. Dans ces conditions, la vitesse du liquide \vec{V} dans la puce obéit à l'équation de Stokes donnée par :

$$\vec{0} = -\vec{\nabla}P + \mu\Delta\vec{V}$$

avec P la pression du liquide et μ sa viscosité dynamique.

Etant donné la forte demande en opérations numériques des simulations à 3 dimensions, il est préférable de se ramener à une étude à 2 dimensions. Néanmoins, pour des canaux microfluidiques avec une hauteur généralement petite devant la largeur, les conditions aux

limites suivant l'axe vertical sont déterminantes dans l'expression de la vitesse du liquide. C'est pourquoi les méthodes de simulations classiques à 2 dimensions ne donnent pas des représentations justes du champ de vitesse. De manière à prendre en compte ces conditions aux limites, l'approximation du « canal peu profond » est appliquée [53] (« shallow channel approximation »). Cette approximation consiste à ajouter une force de frottement volumique à l'équation (1), qui représente la résistance que les conditions aux limites imposent au flux. La force de frottement s'écrit :

$$\vec{F} = -\frac{12\mu}{h^2}\vec{V}$$

avec h la hauteur du canal (prise égale à $10\ \mu\text{m}$ dans notre cas).

Les dessins exacts des puces correspondant à la chambre droite et à la chambre décalée sont importés dans le logiciel Comsol. Les zones d'entrée et de sortie du liquide sont définies. Une pression de $\Delta P = 50\ \text{mbar}$ est imposée entre ces deux zones.

Un maillage à 2 dimensions (ou « mesh » en anglais) est alors généré dans la puce. Il s'agit d'une structure géométrique à 2 dimensions formant un « filet » composé d'un ensemble compact de polyèdre, formant chacun une maille, et qui sert de base géométrique au calcul par élément fini de la vitesse. A chaque nœud du maillage correspond une valeur de vitesse. Plus la maille est petite, plus la résolution spatiale du champ des vitesses est grande (mais le temps de calcul sera plus long).

Lorsque le calcul des vitesses par élément fini sur la base du maillage est terminé, on obtient alors un champ de vitesse à 2 dimensions en tout point de la puce (voir Figure 59A).

8.2) Profils de vitesse et lignes de champ

La simulation numérique donne accès à deux informations importantes : la norme de la vitesse en tout point et les lignes de champ des vitesses. Dans ce paragraphe, nous traitons surtout de la norme de la vitesse.

La Figure 59A montre les résultats des simulations numériques dans le cas de la chambre droite (à gauche) et de la chambre décalée (à droite). Les pièges du premier type (espacement central de $w_t = 3\ \mu\text{m}$) ont été pris pour la géométrie des pièges. La norme de la vitesse est indiquée par un code couleur dont l'échelle Figure à droite. Les lignes de courant sont indiquées par des lignes blanches. Nous avons choisi de faire figurer seulement la moitié des puces car le champ de vitesse est symétrique par rapport au milieu de la chambre.

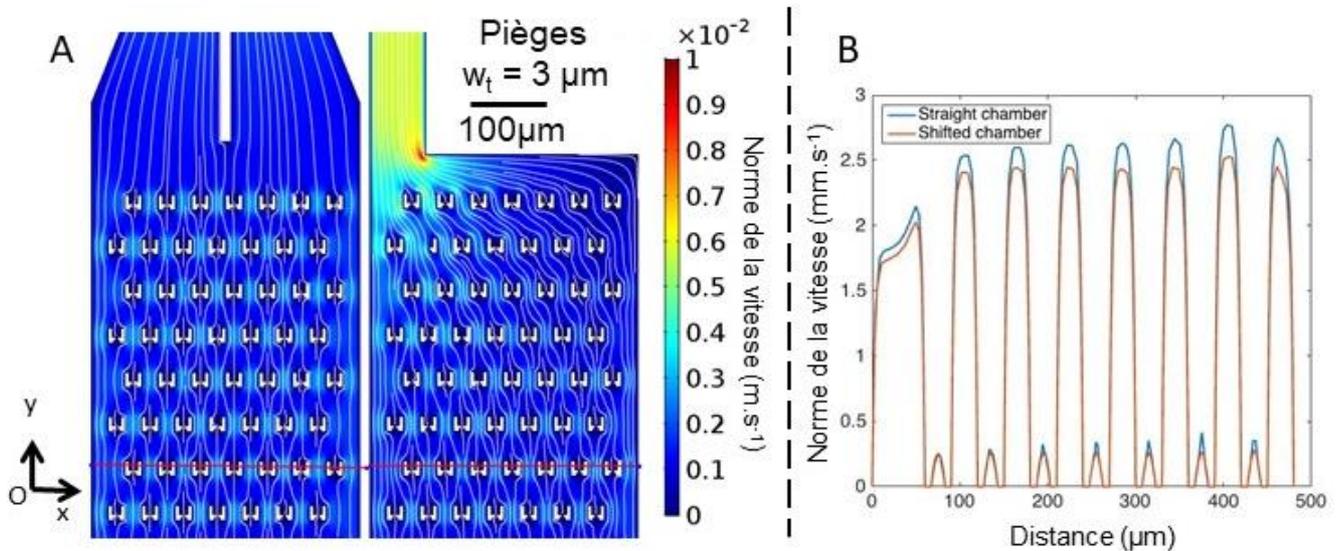


Figure 59. (A) Simulations numériques 2D du champ de la vitesse moyenne du liquide dans la chambre droite et la chambre décalée. La géométrie des pièges est respectée. Une pression de $\Delta P = 50$ mbar est appliquée (le flux va vers le bas). L'approximation du canal « peu profond » (« shallow channel approximation ») est appliquée. La norme de la vitesse est indiquée par un code couleur. Les lignes de champ sont indiquées par des lignes blanches. Du fait qu'elles sont symétriques par rapport au milieu de la chambre, nous avons représenté seulement la moitié de la puce pour des raisons de visibilité. (B) Profil de la norme de la vitesse moyenne suivant la ligne rouge de la Figure (A) dans la chambre droite (courbe en bleu) et la chambre décalée (courbe en orange). La simulation a été réalisée avec Comsol 5.2. Les pièges du premier type (espacement central de $w_t = 3 \mu\text{m}$) ont été pris pour la géométrie des pièges.

Un trait rouge, passant par une ligne de pièges positionnée au centre de la chambre, est tracé. Le profil de la norme de la vitesse suivant ce trait est donné sur la Figure 59B. Le cas de la chambre droite est donné par la courbe bleue et le cas de la chambre décalée est donné par la courbe orange.

On constate que, pour une pression de $\Delta P = 50$ mbar, la vitesse entre deux pièges de cette ligne vaut en moyenne $2,6 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ pour la chambre droite et $2,4 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ pour la chambre décalée. Au sein d'un piège, la vitesse moyenne est d'environ $0,3 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ pour les deux chambres. La vitesse est donc légèrement plus grande dans la chambre droite que dans la chambre décalée, cette différence restant faible (de l'ordre de 7 % entre les pièges).

8.3) Comparaison des lignes de champ avec l'expérience

Les lignes de champ du liquide issues de la simulation peuvent être comparées aux lignes de champ expérimentales des billes de $5 \mu\text{m}$. La Figure 60A montre les lignes de courant expérimentales des billes de $5 \mu\text{m}$ et celles issues de la simulation numérique 2D, dans le cas de la chambre droite (A) et de la chambre décalée (B). Les pièges du premier type (espacement central de $w_t = 3 \mu\text{m}$) ont été pris pour les expériences et les simulations.

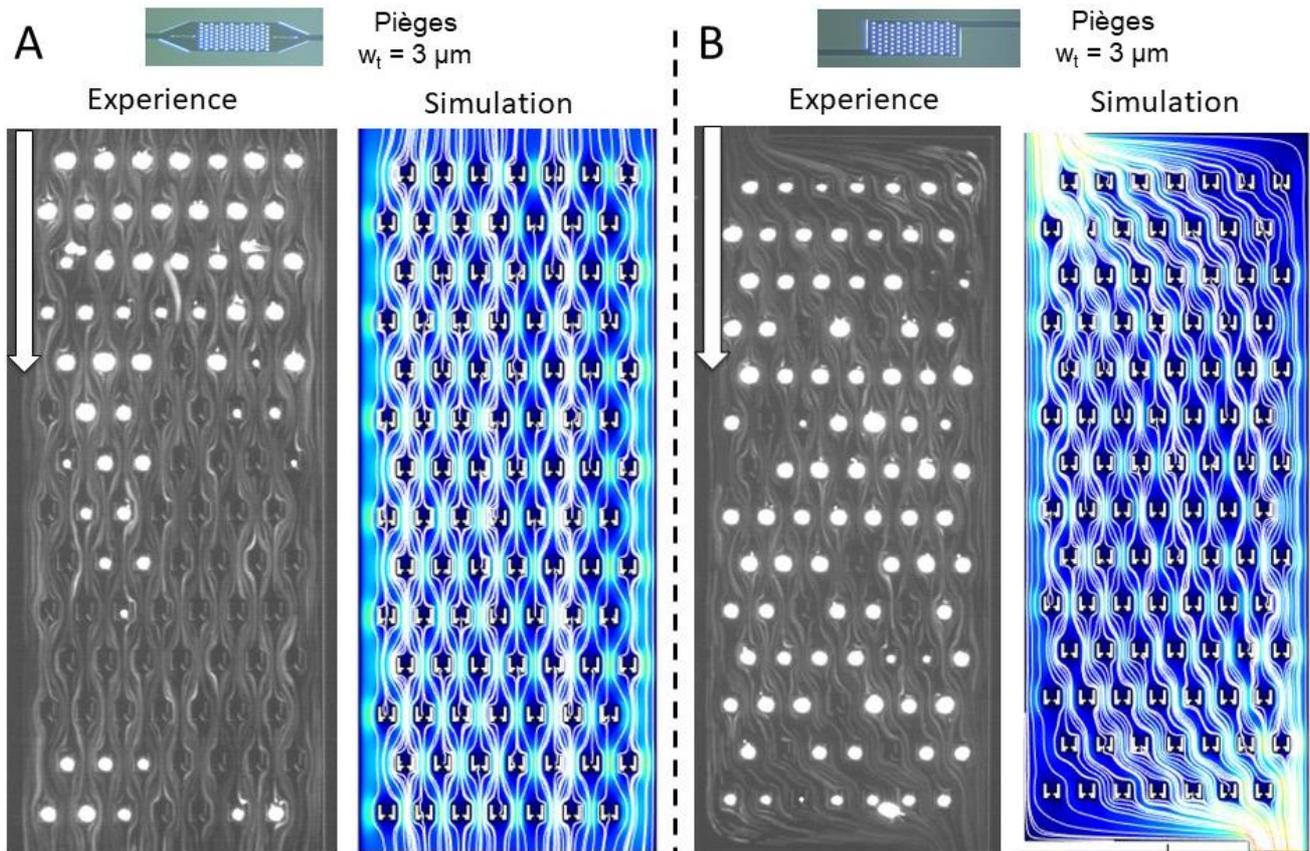


Figure 60. Lignes de courant expérimentales et issues de la simulation numérique 2D, dans le cas de la chambre droite (A) et de la chambre décalée (B). Les billes de polystyrène fluorescentes sont injectées selon le protocole indiqué plus haut ($\Delta P = 50$ mbar, concentration en billes de 2 millions par millilitre). Pour obtenir les lignes de courant expérimentales, les images enregistrées à intervalle de temps régulier sont sommées. Le contraste de l'image obtenue est réglé de manière à faire apparaître les billes en mouvement. Les lignes de courant obtenues par simulation numériques 2D ont été tracées avec Comsol 5.2 en reproduisant la géométrie de la puce microfluidique. La différence de pression est fixée à 50 mbar et l'approximation du canal « peu profond » (« shallow channel approximation ») est appliquée. La direction du flux est indiquée par la flèche blanche (de bas en haut). Les pièges du premier type (espacement central de $w_t = 3 \mu\text{m}$) ont été pris pour les expériences et les simulations.

Les lignes de courant des billes de $5 \mu\text{m}$ ont été obtenues en sommant chaque valeur d'intensité des images enregistrées lors d'une expérience. Le contraste de l'image résultante a été ensuite ajusté pour faire apparaître les billes en mouvement de faible intensité. Les billes présentes dans les pièges apparaissent alors avec une intensité saturante.

Pour chacune des chambres, on constate la ressemblance des lignes de courant des billes de $5 \mu\text{m}$ avec celles du liquide. On peut en déduire qu'en première approximation, les billes de $5 \mu\text{m}$ suivent majoritairement les lignes de courant du liquide.

A partir de ces images, nous vérifions bien que les lignes de champ sont globalement dirigées suivant l'axe principale de la puce dans le cas de la chambre droite, ce qui était notre objectif lors de la conception de cette chambre. Dans le cas de la chambre décalée, les lignes de champ sont globalement dirigées suivant la diagonale liant l'entrée et la sortie, comme nous le voulions également au départ. On note que les lignes de champ au centre de la chambre décalée ne sont

pas totalement dirigées suivant la diagonale et ressemblent à celles de la chambre droite. Nous reviendrons sur ce point important dans la partie Interprétation.

9) Observations à la caméra rapide

9.1) Présentation

De manière à comprendre l'origine de la différence de remplissage entre la chambre droite et la chambre décalée, nous avons voulu observer la trajectoire des billes lors d'une injection. La vitesse maximale des billes étant de l'ordre de 2 mm.s^{-1} et l'écart entre deux pièges de $50 \mu\text{m}$, le temps typique de déplacement d'une bille entre deux pièges est de 20 ms. De manière à avoir une excellente résolution temporelle, nous avons choisi d'acquérir des images avec un intervalle de temps de 0,2 ms, à l'aide d'une caméra rapide.

Le temps de déplacement d'une bille sur une échelle de l'ordre de sa taille ($5 \mu\text{m}$) pour une vitesse de 2 mm.s^{-1} est de 2 ms. Le temps d'exposition de la caméra étant de 0.01 ms, la position de la bille sera parfaitement définie.

9.2) Protocole expérimental

Le protocole expérimental d'injection des billes de polystyrène de $5 \mu\text{m}$ est le même que celui indiqué plus haut. La différence de pression imposée est de $\Delta P = 50 \text{ mbar}$, et la concentration en billes de 1 million par millilitre. La chambre microfluidique utilisée est la chambre décalée.

L'observation est faite grâce à un microscope optique équipé d'une caméra rapide (Photron FASTCAM SA3 model 120K-M2). Les images sont prises en lumière blanche. Suivant la surface de l'image sélectionnée, la fréquence d'acquisition va de 1000 à 5000 images par seconde. Le temps d'exposition est de 0.01 ms. Plusieurs séquences d'images sont enregistrées lors de l'injection des billes, d'environ 15000 images chacune. Nous remercions Joshua Ricouvier du laboratoire MMN qui nous a prêté cette caméra.

9.3) Résultats

Le fait de suivre la trajectoire des billes nous permet de comparer leurs vitesses à celles obtenues avec la simulation numérique, et surtout à voir la manière dont elles sont piégées, pour tenter d'identifier un mécanisme qui rationalise la différence entre la chambre droite et la chambre décalée.

La Figure 61 montre une suite d'images enregistrées avec la caméra rapide et tirées d'une séquence de 2680 images au total. La chambre utilisée est la chambre décalée représentée sur la Figure 61 avec son entrée et sa sortie dans le sens correspondant aux images. Les pièges du premier type (espacement central de $w_t = 3 \mu\text{m}$) ont été utilisés. La direction du flux est indiquée par une flèche blanche (du haut vers le bas). Nous avons entouré une bille (rond blanc) qui suit

d'abord une trajectoire en « zig-zag » entre les pièges, puis qui est capturée par le piège en bas à droite. La ligne en pointillés est un repère fixe : la bille passe d'un côté puis de l'autre.

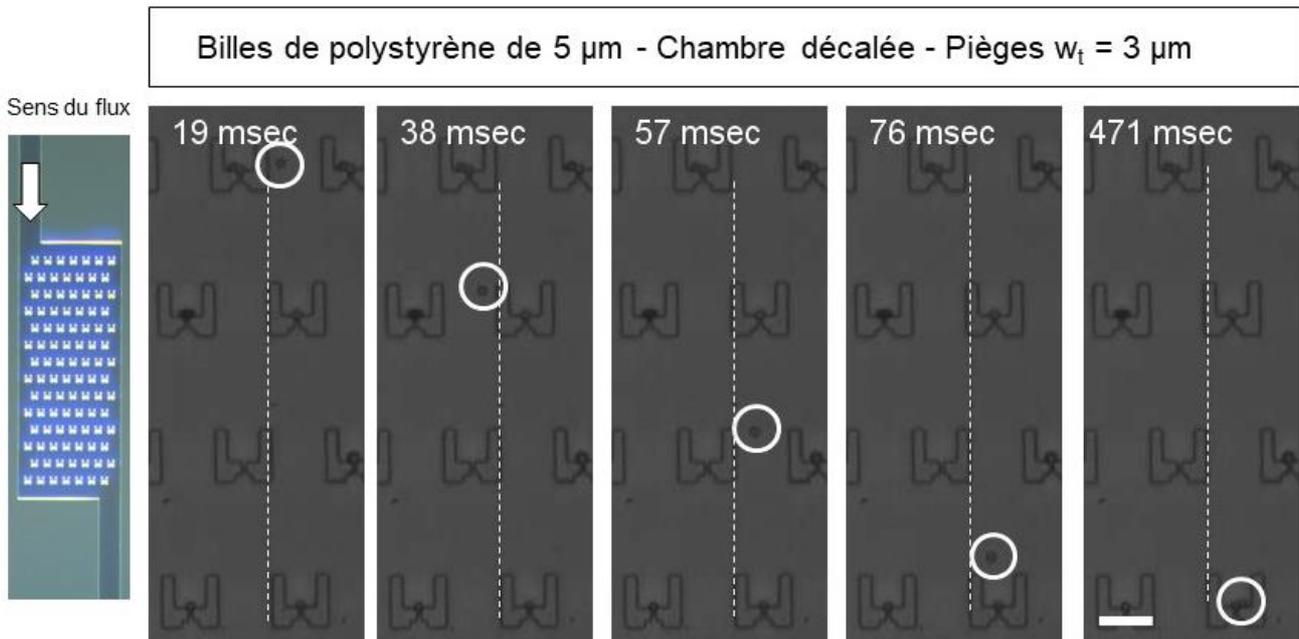


Figure 61. Images enregistrées avec une caméra rapide lors du remplissage des pièges par des billes de polystyrène de $5\ \mu\text{m}$ (fréquence d'acquisition de 5000 images par secondes). Le protocole d'injection des billes est celui détaillé plus haut (différence de pression de $\Delta P = 50\text{mbar}$, concentration en billes de 1 million par millilitre). La chambre utilisée est la chambre décalée. Les pièges du premier type (espacement central de $w_t = 3\ \mu\text{m}$) ont été utilisés. Nous avons entouré en blanc une particule suivant une trajectoire en « zig-zag » entre 19 et 57 ms, puis qui est piégée après 76 msec. La barre d'échelle vaut $30\ \mu\text{m}$. La ligne en pointillés est un repère fixe : la bille passe d'un côté puis de l'autre.

Lors de sa trajectoire en zig-zag (entre 19 et 57 ms), la mesure de la vitesse moyenne de la bille donne $3,4\ \text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Cette valeur est du même ordre de grandeur que la vitesse issue de la simulation numérique entre deux pièges ($2,5\ \text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, voir le paragraphe « Simulations numériques » plus haut). On peut expliquer la plus faible valeur de la vitesse simulée (écart de 30 %) par le fait que nous avons choisi comme hauteur de canal $H = 10\ \mu\text{m}$ lors de l'approximation du canal « peu profond », alors que la hauteur réelle est plus grande (la mesure au profilomètre optique donne entre 13 et $14,4\ \mu\text{m}$), induisant ainsi une vitesse mesurée plus grande. Le logiciel Comsol ne donne en fait la possibilité de choisir que des hauteurs H avec des pas de $5\ \mu\text{m}$ ($5, 10, 15, 20\ \mu\text{m}$) et nous avons choisi $10\ \mu\text{m}$ car $15\ \mu\text{m}$ donnait des valeurs pour la vitesse entre deux pièges trop grandes par rapport à celles observées.

Lors de la phase de capture (entre 76 et 471 ms), une mesure de vitesse moyenne de la bille donne $0,06\ \text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, ce qui est 4 fois plus faible que la vitesse donnée par la simulation numérique, mais il faut noter qu'une autre bille est déjà présente dans le piège, ce qui augmente la résistance hydrodynamique à l'intérieur du piège, et donc réduit la vitesse du flux dans cette zone.

IV) Interprétation

Dans cette partie, nous donnons les éléments théoriques, basés sur des observations expérimentales, permettant de comprendre l'origine de la différence de remplissage entre la chambre droite et la chambre décalée.

Nous nous assurons tout d'abord que les effets inertiels ont un rôle négligeable dans la trajectoire des billes en calculant les nombres de Reynolds associés à au canal et aux billes. De fait, les billes suivent les lignes de champ de la vitesse du liquide (pas de migration entre lignes de champ). L'observation des lignes de champ du liquide nous montre alors que les billes suivent une trajectoire « en zig-zag » dans la chambre droite. Cette trajectoire est déviée dans le cas de la chambre décalée, et conduit à la capture des billes. Ces observations sont rationalisées en définissant des zones de dites « de capture » et d'autres de « passage », qui sont symétriques dans le cas de la chambre droite, et déviées dans le cas de la chambre décalée.

1) Présentation et hypothèses

1.1) Bases théoriques

Des particules suspendues dans un liquide subissent des forces de trainée et de portance. De manière à connaître l'influence de ces forces, on définit deux nombres sans dimensions : le nombre de Reynolds du canal (R_c), qui décrit l'écoulement dans le canal, et le nombre de Reynolds des particules (R_p), qui inclut la taille des particules [55][56][57]:

$$R_c = \frac{V_M D_h}{\nu}$$
$$R_p = R_c \frac{a^2}{D_h^2} = \frac{V_M a^2}{\nu D_h}$$

Faisant intervenir la vitesse maximale du liquide dans le canal V_M , la viscosité cinématique $\nu = \mu/\rho$ (μ et ρ étant la viscosité dynamique et la densité du liquide respectivement), le diamètre hydraulique du canal $D_h = 2wh/(w + h)$ (w et h étant la largeur et la hauteur du canal) et le diamètre des particules a . On note également $\lambda = a/D_h$ le rapport de confinement des particules dans le canal.

Pour $R_p \ll 1$, l'écoulement de particules est dominé par les forces visqueuses. Les particules suivent les lignes de champ du liquide et il n'y a pas de migration des particules entre des lignes de champ différentes.

Les forces de portance inertielles commencent à jouer un rôle dans la trajectoire des particules pour un nombre de Reynolds des particules $R_p \geq 1$ et un rapport de confinement $\lambda > 0,07$. Dans ce régime, la migration de particules entre les lignes de champ du liquide a été observée dans des systèmes macroscopiques. Par exemple, dans un tube cylindrique soumis à une différence de pression les particules ont tendance à quitter le centre du tube et à être repoussées par les bords, se concentrant ainsi dans la section du tube en un anneau [58]. Ces

phénomènes de migration entre lignes de champ ont pour origine des gradients de vitesses à l'échelle de la particule, induisant des gradients de pressions transversaux à l'écoulement [56][59].

1.2) Applications numériques

Nous prenons comme hauteur de canal $h = 15 \mu m$ et comme largeur la distance entre deux pièges voisins sur une même ligne de pièges, à savoir $w = 30 \mu m$, ce qui donne comme valeur de diamètre hydraulique $D_h = 22 \mu m$. En prenant pour valeurs numériques $V_M = 3 mm/s$, $\nu = 1.10^{-6} m^2/s$ et $a = 5 \mu m$, on arrive à $\lambda = 0,2$, $R_c = 0,06$ et $R_p = 3.10^{-3}$.

Nous constatons que le nombre de Reynolds des particules est très inférieur à 1 (environ 300 fois). Ceci nous indique que les forces inertielles de portances ont un rôle négligeable dans la trajectoire des billes, et que celles-ci sont soumises principalement à la force de traînée visqueuse. Les billes suivent les lignes de champ du liquide. Les billes ne migrent pas entre différentes lignes de champ. L'observation de ces lignes de champ va nous donner des indications sur les mécanismes mis en jeu.

2) Observation des lignes de champ du liquide

Le nombre de Reynolds des billes étant 300 fois inférieur à 1, nous en déduisons que la trajectoire des billes suit les lignes de champ du liquide. Nous basons nos observations sur la simulation numérique des vitesses du liquide exposée plus haut.

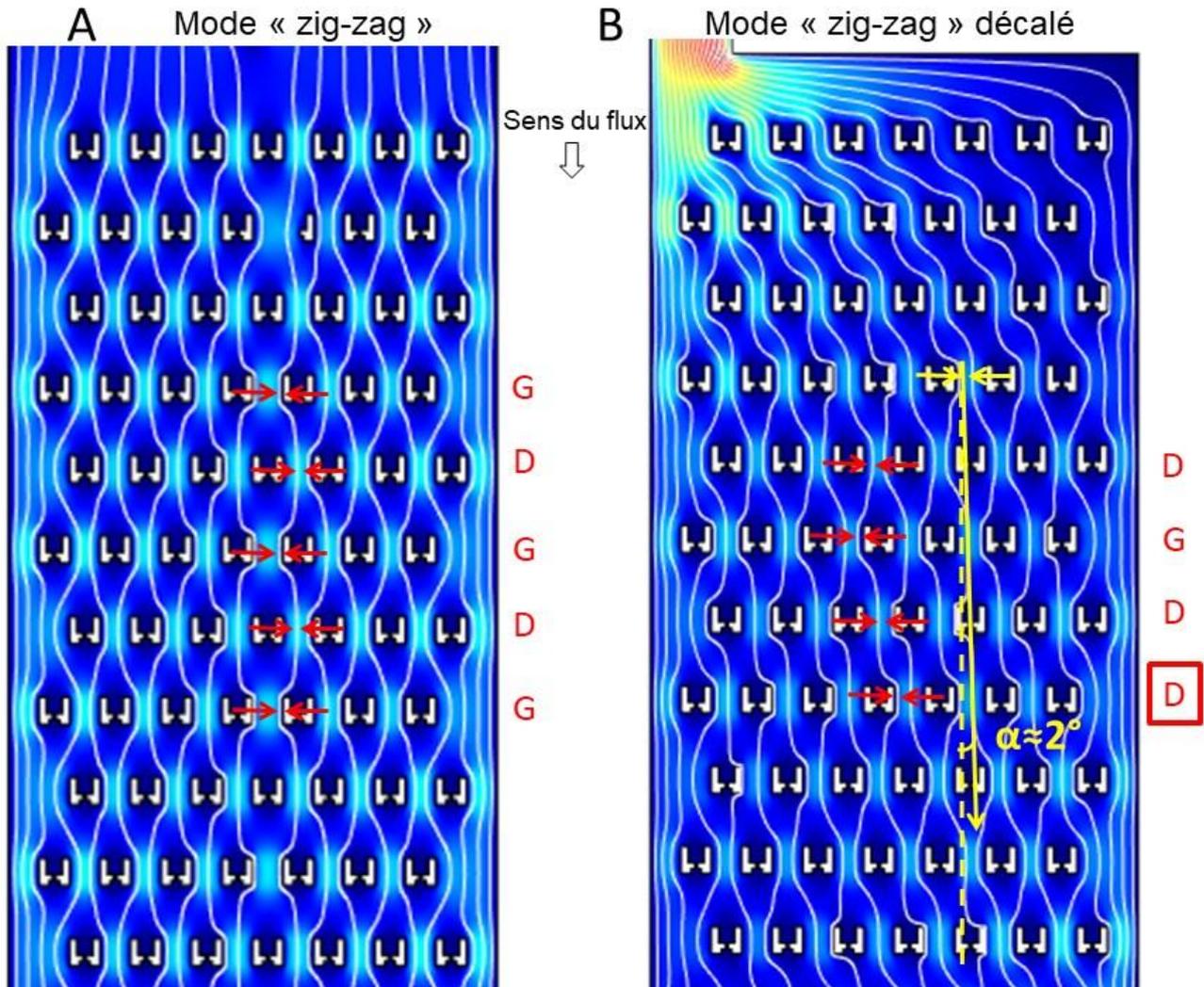


Figure 62. (A) Dans le cas de la chambre droite, ligne de champ (indiquée par des flèches rouges) ayant une trajectoire en « zig-zag » dans la chambre droite. Les lignes passent alternativement à gauche (G) puis à droite (D) des pièges. Les lignes de champ sont issues de la simulation numérique des vitesses du liquide dans la chambre. Le flux est dirigé vers le bas. (B) Dans le cas de la chambre décalée, ligne de champ (indiquée par des flèches jaunes et rouges) ayant une trajectoire en « zig-zag » qui se décale progressivement vers la droite, en direction du canal de sortie, jusqu'à ce que la ligne passe deux fois de suite à droite d'un piège (D entouré). Les flèches jaunes indiquent le décalage de la ligne de champ au niveau d'une ligne de pièges de même type (décalés vers la droite). On note un décalage correspondant à un angle de $\alpha \approx 2^\circ$ au niveau de cette ligne, correspondant à un décalage de $5 \mu\text{m}$ de la ligne de champ entre deux flèches jaunes consécutives.

La Figure 62A montre les lignes de champ du liquide issues de la simulation numérique dans la chambre droite. Il s'agit de la zone centrale du réseau de pièges, encadrée sur l'image de la chambre à gauche. On remarque que toutes les lignes de champ ont une forme de « zig-zag ». L'une d'entre elles est indiquée par des flèches rouges sur l'image. La ligne passe alternativement sur la gauche d'un piège décalé vers la droite, puis sur la droite du piège de la ligne suivante décalé vers la gauche, et ainsi de suite.

La Figure 62B montre les lignes de champ du liquide issues de la simulation numérique dans la chambre décalée. Il s'agit ici aussi de la zone centrale du réseau de pièges, encadrée sur l'image

de la chambre à gauche. Les lignes de champ suivent également une forme de « zig-zag », mais qui se décale progressivement vers la droite. L'une de ces lignes est indiquée par des flèches rouges et jaunes sur l'image. A chaque fois que la ligne passe entre deux pièges décalés de la même manière (vers la droite par exemple, comme indiqué par les flèches jaunes), elle se décale d'environ $5 \mu\text{m}$ vers la droite, correspondant à un angle de déviation de $\alpha \approx 2^\circ$ (voir l'image de droite). Ce décalage est constant à chaque passage de la ligne entre deux pièges, jusqu'à ce que la trajectoire soit perturbée, et qu'au lieu de passer sur la gauche, la ligne passe sur la droite du piège suivant, comme indiqué par la lettre D entourée.

Dans la chambre décalée, ce décalage des lignes de champ a pour origine le décalage de l'entrée de la chambre par rapport à la sortie, et donc est simplement dû à une conservation du flux dans la chambre. Notons que l'angle de déviation α est plus ou moins prononcé suivant la zone du réseau considéré. Au début et à la fin du réseau, α est compris entre 20° et 80° , comme le montre les lignes de champ de l'ensemble de la chambre décalée plus haut. Nous nous focalisons sur la zone centrale de la chambre décalée (avec $\alpha \approx 2^\circ$) car nous avons remarqué que c'est la zone où la capture est la plus efficace (remplissage plus rapide en général).

3) Zone de capture et zone de passage

3.1) Définitions

En nous basant sur les observations faites des lignes de champ du liquide dans les deux chambres, nous proposons une explication de la meilleure efficacité de capture des billes dans les pièges de la chambre décalée plutôt que dans la chambre droite. Cette explication est basée sur une méthode de division du flux du liquide dans un réseau d'obstacles, inspirée par exemple des analyses de Huang *et al.* [60], ou encore de Inglis *et al.* [61] dans le cas du déplacement latéral de particules dans un réseau de piliers.

La Figure 63A montre les frontières des différentes zones d'intérêt. Le réseau de pièges dans la zone centrale de la chambre droite est représenté. Le flux entre deux pièges adjacents d'une même ligne peut être divisé en trois zones :

- Zone 1 : le liquide passe sur la gauche du piège de la ligne suivante. On appelle cette zone une « zone de passage ».
- Zone 2 : le liquide passe dans le piège de la ligne suivante. On appelle cette zone une « zone de capture ».
- Zone 3 : le liquide passe sur la droite du piège de la ligne suivante. Il s'agit d'une « zone de passage » également.

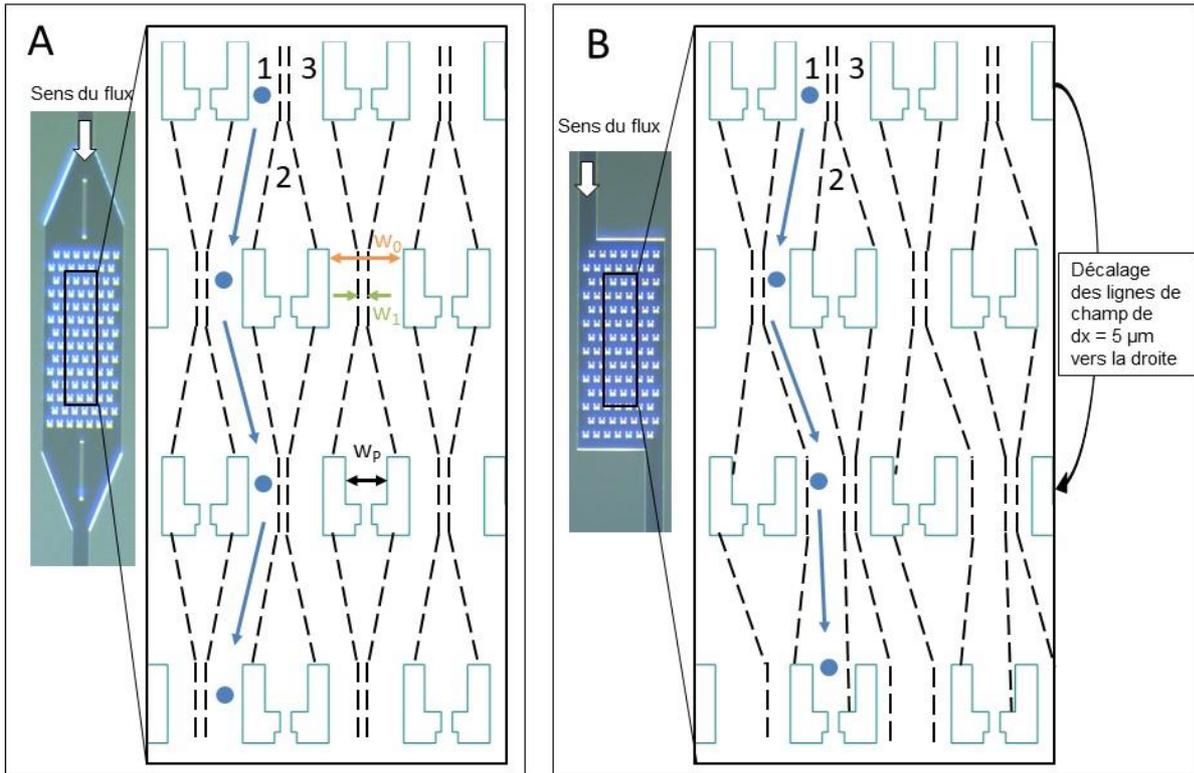


Figure 63. (A) Dans la chambre droite, division du flux du liquide au niveau de deux pièges adjacents en trois zones : la partie du fluide allant à gauche du piège suivant (1) (zone de passage), la partie du fluide allant dans le piège suivant (2) (zone de capture), et la partie du fluide allant à droite du piège suivant (3) (zone de passage). La largeur entre deux pièges adjacents est $w = 30 \mu\text{m}$, et la largeur w_0 de la zone de capture, au niveau de deux pièges adjacents, vaut $w_0 = 2 \mu\text{m}$. Dans la chambre droite, la bille présente dans la zone 1 a une trajectoire en « zig-zag ». (B) Décalage des zones dans la chambre décalée. Ce décalage est de l'ordre de $5 \mu\text{m}$ entre la première ligne et la troisième ligne (pièges décalés de la même manière). La zone 1 est une zone « de passage » pour la première ligne de piège, puis devient zone de capture pour la quatrième ligne de piège. De la même manière, la zone 2 initialement « de capture » devient zone de passage.

En généralisant ces trois zones entre chaque piège, on peut alors décrire la trajectoire d'une bille. Lorsqu'une bille appartient à une zone, elle ne peut pas en sortir puisqu'elle suit les lignes de champ du liquide. Si la bille appartient à la zone 1 comme sur la Figure 63A, elle adoptera alors une trajectoire en « zig-zag », de même nature que les lignes de champ du liquide observées plus haut dans le cas de la chambre droite. Si par contre la bille est initialement dans la zone 2 « de capture », elle sera capturée par le piège suivant.

La largeur w_1 de la zone de capture au niveau de deux pièges adjacents peut être évaluée par un calcul basé sur la conservation du flux. Le flux total φ_0 du liquide entre deux pièges s'écrit :

$$\varphi_0 = V_0 w_0 h$$

avec V_0 la vitesse moyenne du liquide entre deux pièges, w_0 la largeur entre deux pièges et h la hauteur de la chambre. Le flux du liquide passant dans un piège s'écrit :

$$\varphi_P = V_P w_P h$$

avec V_P la vitesse moyenne du liquide entre dans un piège, w_P la largeur du piège et h la hauteur de la chambre. Le rapport de φ_P sur φ_0 s'écrit donc :

$$\varepsilon = \frac{\varphi_P}{\varphi_0} = \frac{V_P w_P}{V_0 w_0}$$

À partir des profils de vitesses issus de la simulation numérique (voir plus haut), on prend $V_0 = 2,5 \text{ mm/s}$, $V_P = 0,3 \text{ mm/s}$. En prenant $w_0 = 30 \text{ }\mu\text{m}$ et $w_P = 17 \text{ }\mu\text{m}$, on calcule un rapport $\varepsilon = 0,07$ soit 7 %. En supposant que le profil de vitesse entre deux pièges adjacents est plat (largeur w_0 du canal plus grande que la hauteur h), et que donc le flux est constant entre deux pièges, on déduit que la largeur w_1 de la zone de capture a pour ordre de grandeur $w_1 \approx \varepsilon w_0$, soit $2 \text{ }\mu\text{m}$. Cette largeur est faible devant la largeur w_0 entre deux pièges ($30 \text{ }\mu\text{m}$). De plus, w_1 est inférieure (de moitié environ) au diamètre des billes ($5 \text{ }\mu\text{m}$). On en déduit que la probabilité pour qu'une bille soit initialement dans une zone de capture est faible, ce qui explique la faible efficacité de remplissage de la chambre droite.

3.2) Déviation des zones

La Figure 63B montre les limites des zones de passage et de capture dans la chambre décalée. Ces limites ont la même forme globalement que dans la chambre droite, à la différence qu'elles sont translatées d'une distance $dx \approx 5 \text{ }\mu\text{m}$ vers la droite toutes les deux lignes de pièges. Cette déviation est déduite de l'angle de déviation des lignes de champ $\alpha \approx 2^\circ$ observé précédemment.

Du fait de cette déviation, on constate que les zones définies comme étant « de passage » au niveau de la première ligne de piège deviennent des zones de capture au niveau de la quatrième ligne. En effet, si l'on suit une bille initialement dans la zone 1 « de passage », on constate qu'elle suit d'abord une trajectoire en « zig-zag » avant d'être finalement capturée dans un piège. Cette trajectoire est en accord avec les observations à la caméra rapide des billes dans la chambre décalée (voir plus haut). Ce mécanisme de « transformation » d'une zone de passage en une zone de capture est à l'origine de la plus grande efficacité de remplissage de la chambre décalée.

3.3) Remarque sur la valeur de α

On note que α a une valeur limite à ne pas dépasser pour conserver un bon remplissage des pièges. En effet, si α est trop grand, une zone de passage à gauche du piège suivant peut devenir directement une zone de passage à droite du piège suivant, sans passer par l'étape de la zone de capture. Au début et à la fin du réseau de piège de la chambre décalée où α est compris entre 20 et 80° , on observe expérimentalement un remplissage moins efficace des pièges (plus long et moins de billes piégées), ce qui confirme notre interprétation.

Il n'y a pas vraiment de valeur minimale de α . Plus α est faible, plus le nombre de lignes de pièges nécessaires pour qu'une zone de passage devienne une zone de capture sera grand.

4) Difficultés du remplissage du milieu de la chambre droite

Dans notre analyse, nous avons donné des éléments de réponse pour expliquer le fait que la chambre décalée était plus efficace que la chambre droite. Il reste des interrogations néanmoins. Nous faisons part ici d'une observation liée à la chambre droite.

Il a été noté plus haut que le début et la fin du réseau de pièges de la chambre droite se remplissaient plus vite que le milieu dans le cas des billes de 5 μm . Dans le cas des gouttes de 14,4 μm , le début de la chambre droite se remplit toujours plus efficacement que le milieu et la fin (voir les images de remplissage). Cette observation est selon notre point de vue difficilement interprétable avec les zones de passage et de capture. En effet, selon cette explication, tous les pièges dans la chambre droite ont une faible probabilité de capture, y compris ceux situés au début et à la fin du réseau.

On peut penser que le fait que les lignes de courant soient réparties aléatoirement au début de la chambre droite permet un bon remplissage au début, alors que les objets adoptent une trajectoire en « zig-zag » lorsqu'ils sont dans le réseau, qui les oblige à éviter les pièges. Une étude plus poussée des phénomènes hydrodynamiques serait sûrement nécessaire pour répondre à cette question.

Partie 2.3. Etude du contact entre des gouttes fonctionnalisées par des anticorps et des cellules B

Dans la partie précédente, nous avons exposé les caractéristiques des pièges microfluidiques que nous avons fabriqués au laboratoire. Ces pièges permettent d'isoler en des endroits précis des objets de taille comprise entre 5 et 15 μm . Notre objectif, comme exposé dans la partie I), est d'étudier le contact entre une cellule B et une goutte fonctionnalisée par des anticorps. Nous allons voir que ces pièges vont nous permettre de mettre en contact, de manière parallèle et contrôlée, un grand nombre de cellules B et de gouttes, et de pouvoir observer en temps réel les phénomènes d'adhésion entre ces deux objets.

Dans une première partie, nous présentons la nature du lien chimique permettant d'attacher des anticorps à une goutte d'huile. Puis, nous présentons le protocole de fonctionnalisation, ainsi que la préparation des cellules B avant chaque expérience. Enfin, après avoir présenté le dispositif et les méthodes expérimentales, nous exposons nos résultats.

I) Présentation de la fonctionnalisation

Les gouttes d'huile d'émulsion de la taille de quelques micromètres peuvent être assez facilement recouvertes (ou fonctionnalisées) par des molécules biologiques comme la streptavidine ou la biotine. En général, ces molécules sont soit des ligands, soit des récepteurs, rendant ainsi les gouttes adhésives entre elles [42], à des substrats solides [38], ou encore avec des cellules du système immunitaire [39]. Après une présentation des constituants principaux de la liaison goutte-anticorps, nous donnons une représentation du lien chimique final.

1) Phospholipides biotinylés

Le lien du côté de la goutte d'huile est assuré grâce à la dissolution dans l'huile de phospholipides fonctionnalisés, caractérisés par une partie lipophile (ayant une affinité avec l'huile) et une partie hydrophile (ayant une affinité avec l'eau). La Figure 64A montre la formule chimique et la représentation de ces molécules.

Le phospholipide utilisé se compose de trois parties : le phospholipide DSPE (masse molaire de 748 g/mol) avec sa tête hydrophile et ses deux queues aliphatiques lipophiles, le polymère PEG (polyéthylène glycol, masse molaire de 2000 g/mol) représenté par une pelote enchevêtrée, et la biotine (masse molaire de 244 g/mol).

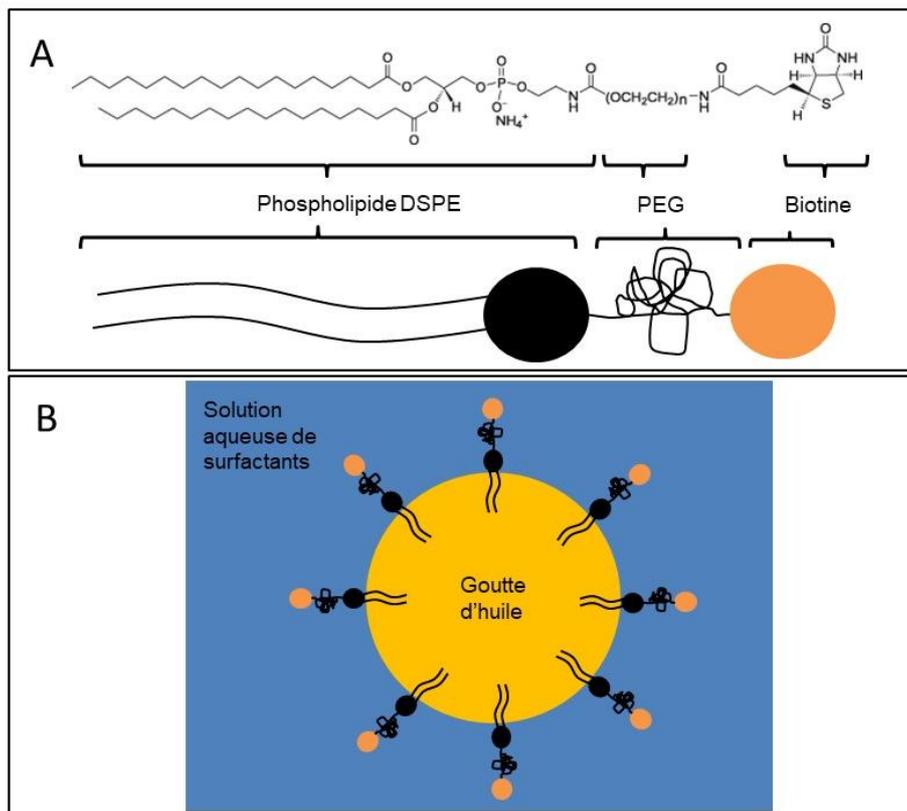


Figure 64. (A) Formule chimique du phospholipide DSPE-PEG biotinyllé utilisé dans la fonctionnalisation des gouttes d'huile de soja. Elle est constituée de trois entités chimiques : (i) le phospholipide DSPE représenté par une tête hydrophile et deux longues chaînes carbonées hydrophobes, (ii) le polymère PEG (polyéthylène glycol) représenté par une chaîne sous forme de « pelote » enchevêtrée, (iii) la biotine. (B) Représentation de la position des phospholipides DSPE-PEG biotinyllés dissous dans une goutte d'huile dispersée dans une solution aqueuse de surfactants. La tête hydrophile des phospholipides est en contact avec la phase aqueuse tandis que leurs chaînes carbonées hydrophobes sont dans l'huile. La goutte est alors recouverte de biotine en surface.

La Figure 64B montre la position des phospholipides dissous dans une goutte d'huile d'émulsion. Du fait de leur caractère amphiphile, ils migrent à l'interface huile/eau. En effet, pour chaque phospholipide, les deux chaînes aliphatiques sont du côté de la phase huileuse, alors que la partie polaire composée de la partie polaire du DSPE, du PEG et de la biotine, sont du côté de la phase aqueuse. La goutte est donc finalement recouverte de molécules de biotines, qui elles-mêmes peuvent réagir avec d'autres molécules, comme la streptavidine par exemple.

2) Lien entre la goutte d'huile et la cellule B

Nous avons présenté les molécules pouvant être liées à la surface d'une goutte d'huile d'émulsion d'un côté, et la structure des récepteurs membranaire à la surface d'une cellule B (voir partie 2.1) de l'autre. Nous allons décrire à présent le lien entre ces deux parties, réalisé grâce à l'affinité forte de deux protéines, la streptavidine et la biotine.

Le schéma de ce lien chimique entre la goutte et la cellule B est représenté sur la Figure 65. Comme expliqué plus haut, la dissolution de phospholipides biotinyllés permet de couvrir la

surface de la goutte en biotine. En effet, la chaîne carbonée d'un phospholipide reste préférentiellement du côté de l'huile car elle est hydrophobe, tandis que la tête polaire du phospholipide et la biotine, groupe hydrophile, restent du côté de la solution aqueuse.

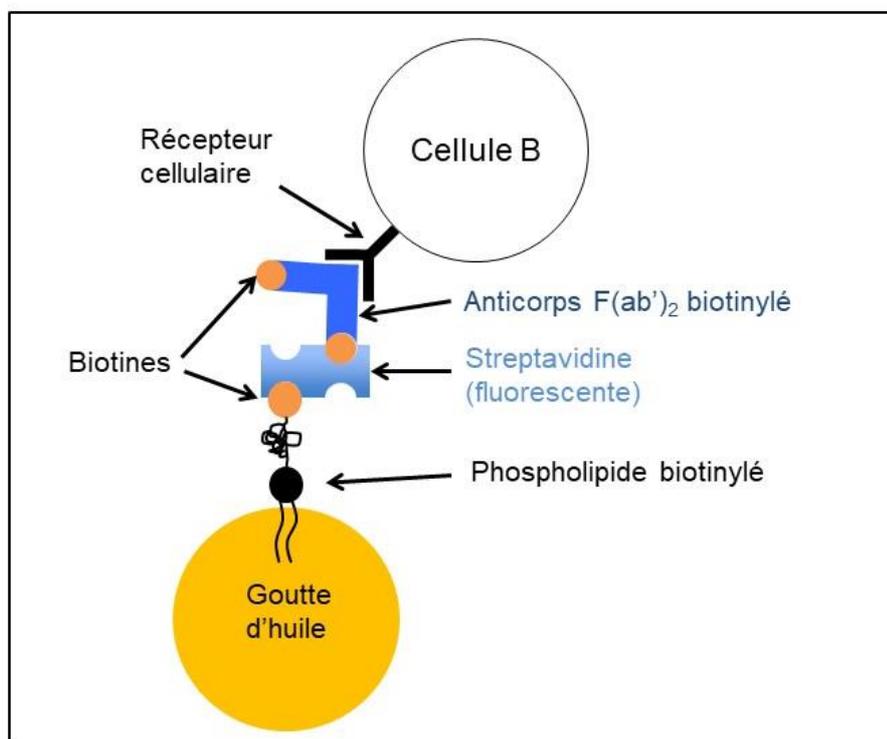


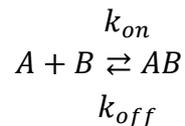
Figure 65. Schéma du lien entre une cellule B et une goutte d'huile. Le récepteur membranaire de la cellule B reconnaît l'anticorps F(ab')₂ biotinylé. La biotine liée à celui-ci s'attache à la streptavidine de manière forte (constante de dissociation $K_d \approx 10^{-14}$ mol/L). La biotine liée au phospholipide DSPE-PEG s'attache également à la streptavidine. Ce phospholipide est attaché à la goutte d'huile grâce au caractère hydrophobe de ses chaînes carbonées. Dans notre expérience, la streptavidine est fluorescente.

La streptavidine (représentée en bleu clair sur la Figure 65) se lie à la biotine avec une grande affinité (constante de dissociation $K_D \approx 10^{-14}$ mol/L). A ce stade, il nous faut un intermédiaire entre la streptavidine et le récepteur membranaire de la cellule B. Nous avons choisi d'utiliser un anticorps F(ab')₂ fonctionnalisé avec de la biotine. Un anticorps F(ab')₂ est un anticorps dont la partie Fc a été fragmentée sous l'action de la pepsine (voir Figure 13). Cet anticorps F(ab')₂ réagit avec les chaînes légères de l'anticorps membranaire de la cellule B (source : « Jackson ImmunoResearch »), tandis que la biotine liée à cet anticorps F(ab')₂ réagit avec la streptavidine.

Dans notre expérience, la streptavidine est liée à un fluorophore qui permet sa visualisation au microscope à épi-fluorescence. C'est la streptavidine qui est fluorescente dans notre expérience, et pas les anticorps F(ab')₂, car, à notre connaissance, il n'existe pas d'anticorps F(ab')₂ liés à un fluorophore dans le commerce.

3) Affinité des différents liens

Nous avons décrit les différentes composantes du lien entre une goutte d'huile d'émulsion et une cellule B. Dans le modèle d'une association entre un ligand et un récepteur, la force de liaison entre deux protéines peut être mesurée par la constante de dissociation K_D . Notons que ce lien repose sur des interactions de type van der Waals (dipôle-dipôle) entre les différentes protéines impliquées. La réaction entre un ligand A et un récepteur B a pour équation :



avec k_{on} (respectivement k_{off}) la constante cinétique de réaction vers la droite (respectivement vers la gauche). A l'équilibre, la constante de dissociation est alors définie par :

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[A]_{eq}[B]_{eq}}{[AB]_{eq}}$$

Plus K_D est faible, plus l'affinité est grande entre un ligand et un récepteur. Dans le cas de la streptavidine et de la biotine, il a été mesuré un $K_D \approx 10^{-14}$ mol/L. Cette forte affinité est principalement due à la complémentarité de structure des sites d'interaction des deux molécules, et à l'implication de liaisons hydrogène. Dans le cas du lien entre un anticorps et un antigène, les constantes de dissociation vont typiquement de $K_D \approx 10^{-6}$ mol/L pour les plus faibles interactions, à $K_D \approx 10^{-9} - 10^{-11}$ mol/L pour les plus fortes (source : « abcam »).

II) Protocoles et instrumentation

Dans cette partie, nous détaillons les protocoles mis en œuvre pour la fonctionnalisation des gouttes d'huile d'émulsion par des anticorps F(ab')₂. Nous donnons également les conditions de culture des cellules B utilisées ainsi que leur préparation avant l'expérience. Enfin, nous détaillons le dispositif expérimental pour la mise en contact des gouttes fonctionnalisées avec les cellules B, ainsi que les méthodes expérimentales mises en œuvre.

1) Fonctionnalisation des gouttes d'émulsion

Les gouttes d'huile d'émulsion ont été fabriquées avec de l'huile contenant des phospholipides. Les autres molécules composant la liaison goutte-cellule décrite sur la Figure 65 sont ajoutées ensuite, dans une solution aqueuse de surfactants à pH contrôlé. Les étapes du protocole sont résumées sur la Figure 66A.

1.1) Fabrication des gouttes d'émulsion à partir d'huile contenant des phospholipides

L'huile contenant les phospholipides biotinylés DSPE-PEG(2000) biotine (Avanti Polar Lipids, référence 880129, concentration finale de 0,05 mg/mL) est obtenue en diluant 100 μL d'une solution de DSPE-PEG biotine contenue dans du chloroforme (concentration initiale de 10 mg/mL) dans 20 g d'huile de soja. Un mélange composé de 15 g d'huile de soja contenant les phospholipides, de 2,5 g d'une solution d'alginate de sodium (Sigma-Aldrich, proportion initiale massique de 2 % dans l'eau) et de 2,5 g d'une solution de Poloxamer F-68 (Croda France SAS, proportion initiale massique de 30 %) est mélangé dans un bécher à l'aide d'une spatule. Suivant la méthode développée par Mason *et al.* [14], le mélange est soumis à un cisaillement constant dans une cellule de Couette (2000 s^{-1}), affinant ainsi la distribution en taille des gouttes d'émulsion, centrée à $7,2 \pm 1,9 \mu\text{m}$. Avant décantation, l'émulsion est diluée de manière à avoir une proportion massique de 1 % de Poloxamer F-68 dans la phase aqueuse et de 5 % en huile au total. Après plusieurs étapes de décantation et rinçage avec une solution de Poloxamer F-68 à 1 % pour enlever les très petites gouttes, l'émulsion est stockée dans une chambre à température régulée à 12 °C.

1.2) Fonctionnalisation par des anticorps F(ab')_2

A partir des gouttes d'émulsion contenant des phospholipides biotinylés, on ajoute d'abord la streptavidine, puis l'anticorps F(ab')_2 biotinylé, suivant le schéma de la Figure 66A. Les quantités de streptavidine et de F(ab')_2 ont été adaptées de manière à être introduites en excès par rapport à la quantité de biotine totale à la surface des gouttes. Les lavages avec une solution tampon contenant des surfactants ont leur importance puisqu'ils permettent d'enlever la streptavidine et les F(ab')_2 en excès de la phase aqueuse.

Etape 1 : Après homogénéisation, 20 μL de l'émulsion obtenue sont introduits dans 200 μL d'une solution phosphate tampon contenant du Tween 20, un surfactant (tampon phosphate, pH = 7,2, 20 mM, proportion massique initiale en Tween 20 de 0,2 %). 40 μL de cette solution intermédiaire sont introduits dans 200 μL de solution tampon phosphate - Tween 20 (appelée PB-Tween dans la suite). L'émulsion est lavée 3 fois avec la solution de PB-Tween (centrifugeuse à 4000 tr/min pendant 30 sec, aspiration à la micropipette de 180 μL du surnageant et ajout de 200 μL de la solution de PB-Tween).

Etape 2 : À l'aide d'une micropipette, 5 μL d'une solution de streptavidine fluorescente (Alexa Fluor, longueur d'onde d'excitation $\lambda_{\text{exc}} = 647 \text{ nm}$, longueur d'onde d'émission $\lambda_{\text{exc}} = 670 \text{ nm}$, concentration initiale de 1 mg/mL) sont ajoutés au tube contenant l'émulsion préalablement lavée. Après environ 30 minutes d'agitation au rotor (60 tr/min) à température ambiante et protégée de la lumière, la solution est lavée 4 fois suivant la même méthode que précédemment.

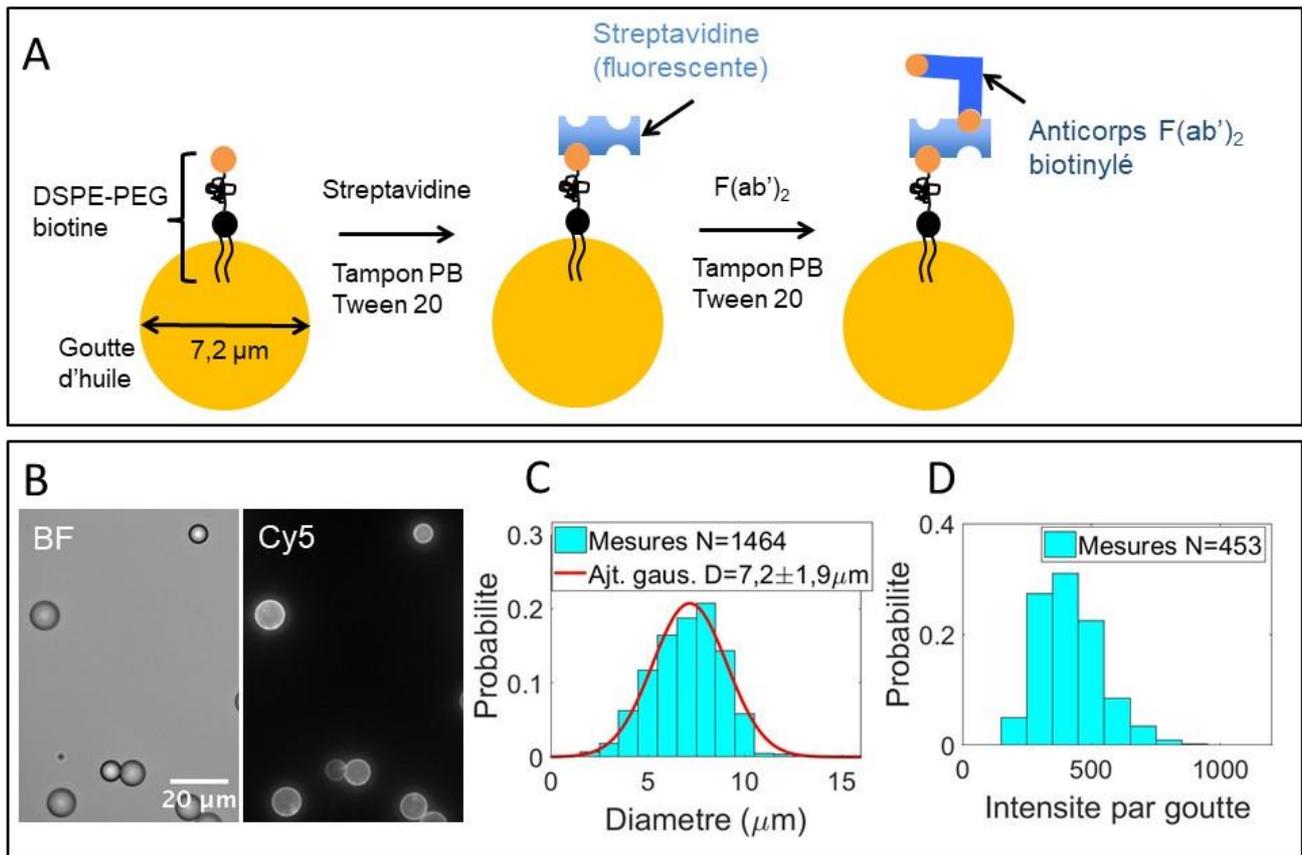


Figure 66. (A) Principales étapes du protocole de fonctionnalisation d'une goutte d'huile d'émulsion par un anticorps $F(ab')_2$. Les gouttes d'huile d'émulsion de $7,2 \mu\text{m}$ de diamètre portent à leur surface des biotines attachées au DSPE-PEG. Puis une solution de streptavidine (tampon phosphate pH = 7,2, Tween 20 à 0,2 % en masse) est ajoutée. Enfin, après lavage dans la même solution tampon, une solution de $F(ab')_2$ est ajoutée. (B) Images au microscope des gouttes fonctionnalisées par des $F(ab')_2$ en lumière blanche (à gauche) et en fluorescence (à droite). La fluorescence est plus forte en surface des gouttes qu'en volume, signe que la fonctionnalisation en streptavidine a fonctionné. (C) Distribution du diamètre des gouttes d'émulsion, réalisée à partir de $N = 1464$ gouttes. La courbe rouge est un ajustement de type gaussien d'espérance $7,2 \mu\text{m}$ et d'écart type $1,9 \mu\text{m}$. (D) Distribution de l'intensité moyenne par goutte, réalisée à partir de $N = 453$ gouttes.

Etape 3: A l'aide d'une micropipette, $3 \mu\text{L}$ d'une solution d'anticorps $F(ab')_2$ (Jackson ImmunoResearch, code 115-066-072, chèvre anti-souris biotine, concentration initiale de $1,6 \text{ mg/mL}$) sont ajoutés au tube contenant l'émulsion préalablement fonctionnalisée par la streptavidine. Après environ 30 minutes d'agitation au rotor (60 tr/min) à température ambiante et protégée de la lumière, la solution est lavée 3 fois avec du milieu cellulaire suivant la même méthode que précédemment.

De manière à avoir un volume de liquide adapté aux réservoirs des générateurs de pression, $200 \mu\text{L}$ de milieu cellulaire sont ajoutés à la solution.

1.3) Fonctionnalisation par de la BSA

De manière à réaliser une expérience dite « contrôle », nous avons préparé un lot de gouttes fonctionnalisées avec de la BSA biotinylée (albumine de sérum bovin). Les étapes de fonctionnalisation 1 et 2 sont identiques à celles décrites précédemment, seule l'étape 3 change.

Etape 3' : A l'aide d'une micropipette, 5 μL d'une solution de BSA-biotine (Sigma-Aldrich, concentration initiale de 1 mg/mL) sont ajoutés au tube contenant l'émulsion préalablement fonctionnalisée par la streptavidine. Après environ 30 minutes d'agitation au rotor (60 tr/min) à température ambiante et protégée de la lumière, la solution est lavée 3 fois avec du milieu cellulaire suivant la même méthode que précédemment.

De manière à avoir un volume de liquide adapté aux réservoirs des générateurs de pression, 200 μL de milieu cellulaire sont ajoutés à la solution.

1.4) Ajout d'anticorps secondaires fluorescents

Nous avons voulu mettre en évidence la présence des anticorps F(ab')_2 à la surface des gouttes après fonctionnalisation. Pour cela, nous avons fait intervenir des anticorps secondaires fluorescents se liant aux F(ab')_2 . Nous indiquons ici le protocole mis en œuvre pour effectuer cette caractérisation.

Nous avons d'abord suivi le protocole de fonctionnalisation décrit plus haut pour la fonctionnalisation des gouttes d'huile par des anticorps F(ab')_2 . A la fin de l'étape 3, les gouttes fonctionnalisées par les F(ab')_2 sont re-suspendues dans 200 μL de la solution de PB-Tween et lavées 4 fois suivant la méthode décrite plus haut. Puis 1 μL d'une solution d'anticorps secondaire (Alexa Fluor, âne anti-chèvre, concentration initiale de 2 mg/mL, longueur d'onde d'excitation $\lambda_{\text{exc}} = 647 \text{ nm}$, longueur d'onde d'émission $\lambda_{\text{exc}} = 670 \text{ nm}$) est ajoutée. Après homogénéisation au rotor à l'abri de la lumière, les gouttes sont lavées avec la solution tampon PB-Tween 3 fois selon la méthode décrite plus haut. Pour cette expérience de caractérisation, la streptavidine utilisée est fluorescente dans le vert ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$).

2) Cellules B

2.1) Culture

Les cellules B sont issues de lignées dite Ila1.6, issue de la lignée A20 de souris. Elles ont été cultivées par Pablo Saez à l'institut Curie (équipe « Biologie cellulaire systémique de la polarité et de la division », Institut Pierre-Gilles de Gennes). La proximité du laboratoire de Pablo Saez a grandement facilité la réalisation des expériences (il travaille au même étage que notre équipe). Nous le remercions pour son apport important au projet.

Le milieu de culture est constitué de RPMI 1640 (Gibco) avec 10 % de FBS (sérum de bovin fœtal), 1 % de pénicilline-streptomycine, 0,1 % de β -mercaptoéthanol et 2 % de pyruvate de sodium. Pour la culture de cellules, celles-ci sont placées dans un incubateur à 37°C et une atmosphère régulée contenant 5,0 % en CO_2 .

Il est à noter que la culture de ces cellules B demande une certaine expérience. Pour être adaptées à notre expérience, les cellules doivent avoir une forme ronde et régulière. Si ce n'est pas le cas, les cellules ne sont pas dans leur état normal et les observations issues de notre expérience risquent d'être erronées.

2.2) Transfection avec un plasmide d'ADN

Nous indiquons ici le principe de la transfection des cellules B conduisant au marquage en fluorescence des lysosomes, de l'actine, ou des myosine 1E et 1C. Nous donnons également les protocoles utilisés.

a) Principe d'une transfection transitoire et application à notre expérience

Une transfection de cellule eucaryote consiste à introduire dans celle-ci des acides nucléiques (ADN ou ARN) de manière à obtenir une cellule génétiquement modifiée. Dans le cas des transfusions dites « stables », le matériel génétique introduit est intégré au génome hôte, assurant l'expression des gènes après plusieurs réplifications cellulaires. Dans le cas de transfusions transitoires, comme celles utilisées dans ce travail, les gènes transfectés sont seulement exprimés pour une durée limitée, et ne sont pas intégrés au génome [62].

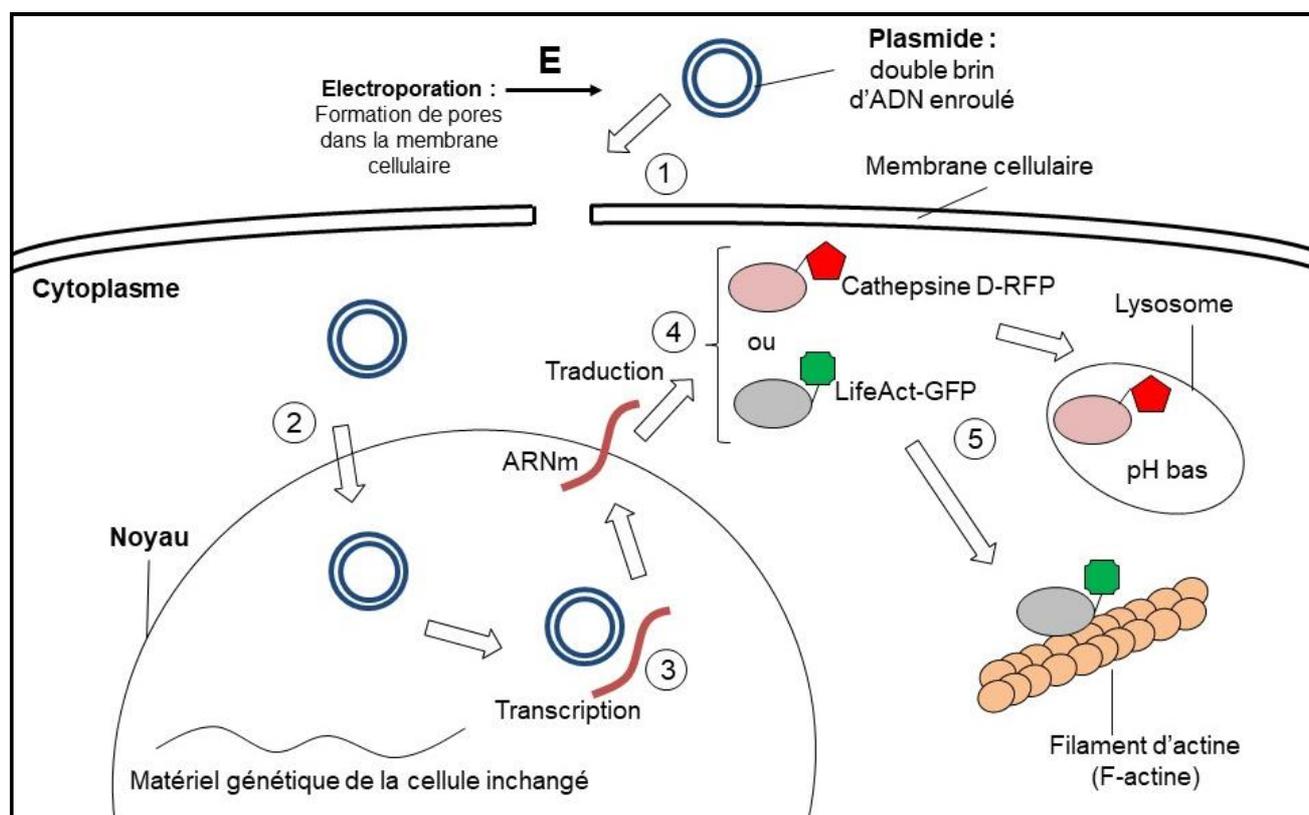


Figure 67. Schéma montrant les différentes étapes conduisant à l'expression de cathepsine D-RFP pour le marquage du lysosome, ou de LifeAct-GFP pour le marquage des filaments d'actine de la cellule B. (1) Le plasmide (molécule d'ADN enroulée) est introduit dans le cytoplasme de la cellule par électroporation. (2) Le plasmide entre dans le noyau où il est transcrit en ARN messager (3). L'ARN messager est ensuite traduit en cathepsine D-RFP ou en LifeAct-GFP dans le cytoplasme (4). La cathepsine D est une enzyme

activée dans le lysosome, tandis que la LifeAct est un peptide qui se lie aux filaments d'actine (5). Schéma reproduit d'après Kim *et al.* [62].

La Figure 67 schématise les différentes étapes d'une transfection transitoire. Un plasmide est un double brin d'ADN de forme circulaire et distinct de l'ADN chromosomique des cellules. Les plasmides sont naturellement présents dans les bactéries. Lorsqu'ils sont utilisés pour des transfections, ils sont également appelés « vecteurs ».

L'introduction de plasmides dans la cellule nécessite le passage de l'ADN, molécule polaire soluble dans l'eau, au travers la membrane cellulaire qui est hydrophobe. Cela peut être réalisé selon différentes méthodes : en liant l'ADN à transférer à la surface de précipités de phosphate de calcium incorporés par la cellule [63], ou en introduisant l'ADN dans des liposomes pouvant fusionner avec la membrane cellulaire [64], ou encore par électroporation en appliquant un champ électrique aux cellules [65]. Nous avons opté pour cette dernière méthode qui présente une bonne efficacité (étape 1 de la Figure 67). Pour plus de détails sur l'électroporation, se reporter au paragraphe suivant.

Puis l'ADN introduite entre dans le noyau où elle est transcrite en ARN messager (étapes 2 et 3). L'ARN messager rejoint le cytoplasme où la traduction a lieu (étape 4).

Pour la visualisation des lysosomes, un plasmide exprimant la protéine cathepsine D-RFP est introduit. Les cathepsines sont une famille de protéases, enzymes dégradant les protéines. Elles sont principalement localisées dans les lysosomes des cellules, là où le pH est assez bas pour les activer. Les cathepsines D exprimées par le plasmide sont liées à un fluorophore, la protéine RFP (pour *Red Fluorescent protein* en anglais), permettant leur visualisation par microscopie de fluorescence.

Pour la visualisation de l'actine, un plasmide exprimant le complexe protéique LifeAct-GFP est introduit. La protéine LifeAct est un peptide formé de 17 amino-acides et pouvant de lier aux filaments d'actines de la cellule, en perturbant le moins possible l'activité de celle-ci [66]. La LifeAct est liée à une protéine fluorescente, la GFP (pour *Green Fluorescent Protein* en anglais), permettant ainsi des observations en fluorescence au microscope optique.

Pour la visualisation en fluorescence des myosines 1E (respectivement 1C), un plasmide exprimant la myosine 1E (respectivement 1C) liée à un fluorophore est introduit dans la cellule. Ce fluorophore est la RFP dans le cas de la myosine 1E, et la GFP dans le cas de la myosine 1C.

b) Principe de l'électroporation des cellules

L'électroporation est la méthode que nous avons choisi pour l'introduction des plasmides et des ARN interférents. Un champ électrique est appliqué aux cellules suspendues dans un milieu contenant les plasmides ou les petits ARN interférents (schéma de la Figure 68A [65]). L'amplitude de ce champ est typiquement de quelques kV/cm et la durée d'application de l'ordre de 20 ms. Sous l'action du champ, des pores hydrophiles sont formés dans la membrane cellulaire, permettant l'introduction des plasmides ou des petits ARN interférents dans le cytoplasme. Ces pores sont formés suite à une réorientation et une réorganisation spatiale des lipides au sein de la bicouche lipidique constituant la membrane cellulaire (schéma de la Figure 68B). En effet, ces lipides peuvent porter des charges ou se comportent comme des dipôles électriques, ce qui les rend sensibles à un champ électrique [67].

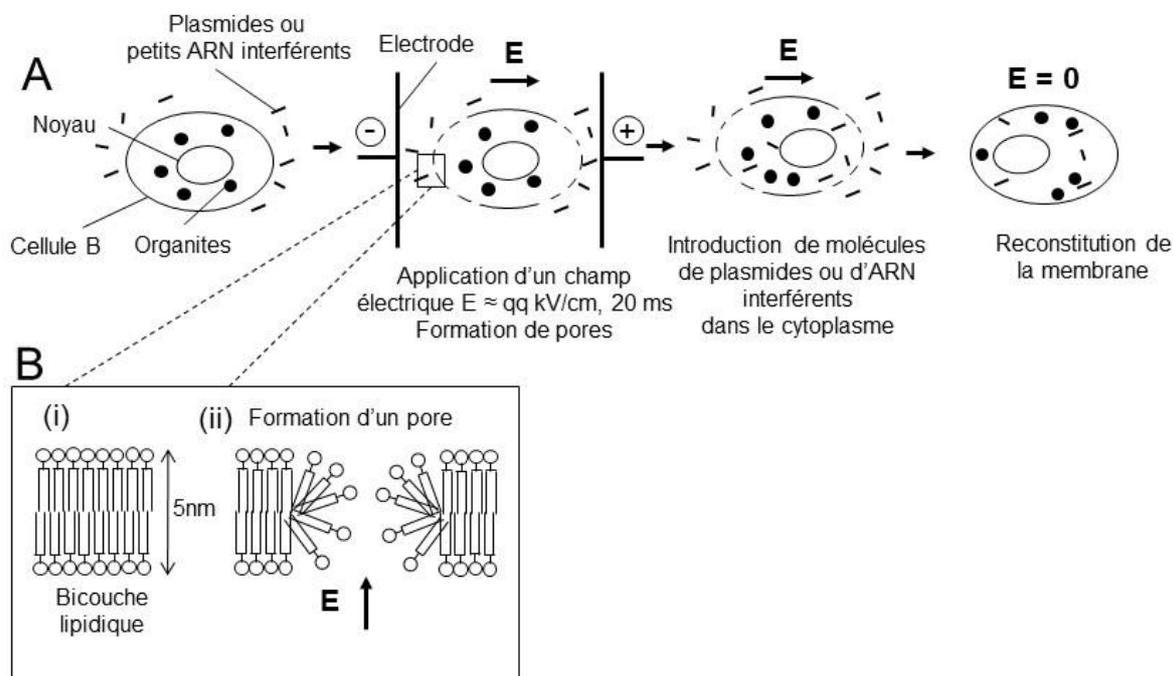


Figure 68. Description du phénomène d'électroporation des cellules B. (A) Les cellules B sont suspendues dans un milieu contenant les plasmides ou les petits ARN interférents. Un champ électrique de quelques kV/cm est appliqué pendant une durée de l'ordre de 20 ms, induisant des pores dans les membranes cellulaires, et l'introduction des ARN interférents dans le cytoplasme. Lorsque le champ est arrêté, la membrane se reconstitue. Schéma reproduit selon Tsong [65]. (B) Schéma d'une bicouche lipidique constituant la membrane cellulaire (i). Sous l'action du champ électrique, les lipides changent d'orientation au sein de la bicouche et un pore hydrophile est formé, laissant passer les petits ARN interférents. Schéma reproduit d'après Weaver *et al.* [67].

c) Protocole pour la visualisation des lysosomes en fluorescence

Les lysosomes sont visualisés en utilisant des plasmides d'ADN codant pour la protéine cathepsine D-RFP. Le protocole suivi est le même que celui utilisé dans [26] (voir les informations supplémentaires de cet article pour des informations complémentaires sur l'origine et la nature du plasmide d'ADN utilisé). Pour la transfection, les cellules B (2,5 millions) subissent une électroporation (Lonza) en présence de 4 µg de plasmide d'ADN. Les cellules B sont ensuite cultivées 24 à 48 heures avant utilisation pour les expériences.

2.3) Transfection pour l'interférence par ARN

L'extinction de gène (ou « *gene silencing* » en anglais) consiste à bloquer la production de protéine par ce gène, soit en agissant au niveau de la transcription du gène même (TGS pour « *transcriptional gene silencing* »), soit en empêchant sa traduction en affectant l'ARN messager (PTGS pour « *post transcriptional gene silencing* »). Dans notre cas, la seconde méthode (PTGS) a été choisie de manière à bloquer la production des myosines de classe 1 : les myosines de classe 1C pour un lot de cellules B, et les myosines de classe 1E pour un autre lot de cellules B. Cette

méthode est appelée également « interférence par ARN », découverte initialement dans le cas des plantes, et qui a fait l'objet du prix Nobel de physiologie et de médecine en 2006.

a) Principe de l'interférence par ARN

Les différentes étapes résumant l'interférence par ARN sont schématisées sur la Figure 69, d'après Rutz *et al.* [68].

Les petits ARN interférents sont issus du clivage d'une molécule d'ARN double brin par une enzyme appelée Dicer (non représentée sur le schéma de la Figure 69) [68]. Le petit ARN interférent est introduit dans le cytoplasme de la cellule B par la méthode d'électroporation (étape 1). Il s'associe à un complexe protéique appelé RISC (en anglais *RNA-induced silencing complex*) qui rend l'ARN interférent simple brin [69] (étapes 2 et 3). Puis, l'ARN interférent simple brin associée au RISC se lie à une séquence d'ARN messenger spécifique (étape 4) et la clive (étape 5), inhibant ainsi le processus de traduction de l'ARN messenger en une protéine spécifique (étape 6). Dans notre cas, il s'agit de la myosine 1E ou de la myosine 1C suivant le type d'ARN interférent introduit.

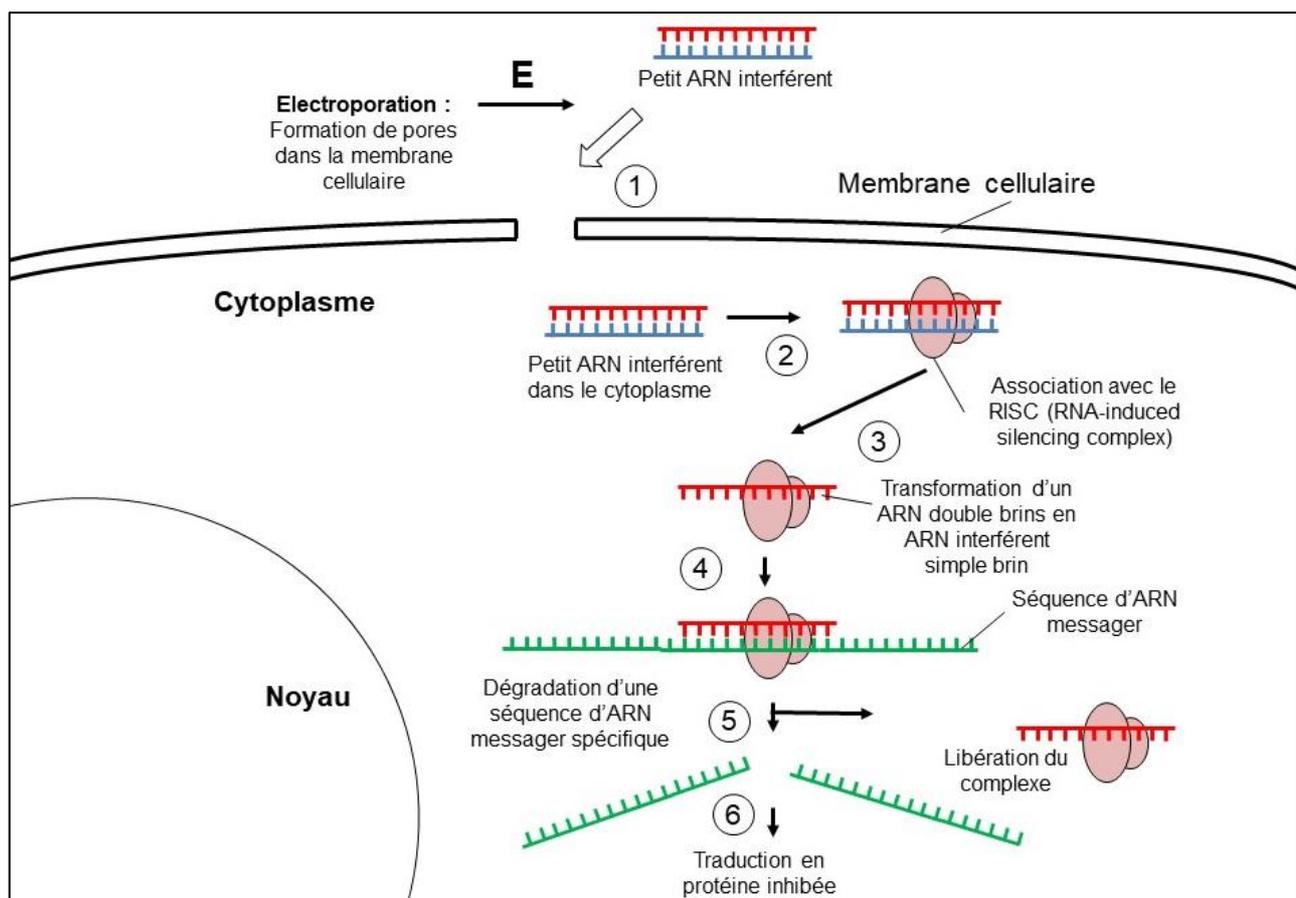


Figure 69. Schéma montrant les différentes étapes conduisant à la dégradation d'un ARN messenger par un petit ARN interférent dans le cytoplasme. (1) Le petit ARN interférent entre dans le cytoplasme de la cellule par un pore induit par l'électroporation. (2) -(3) L'ARN interférent double brin se lie à un complexe protéique appelé RISC (pour *RNA-induced silencing complex* en anglais) qui le rend simple brin. Puis l'ARN interférent se lie à une séquence spécifique d'un ARN messenger (4) et le coupe (5), empêchant ainsi la traduction en protéine (6). Schéma reproduit d'après Rutz *et al.* [68].

Notons enfin que ce procédé d'interférence par ARN est aujourd'hui largement utilisé en biologie cellulaire et est une technique bien maîtrisée pour des lignées cellulaires, comme c'est notre cas ici, mais moins bien dans le cas de cellules primaires. Ce dernier point fait l'objet de recherches actuelles [68].

b) Protocole pour l'interférence par ARN

L'extinction de gènes pour la production de Myosine 1E et 1C (« Silencing ») a été faite par électroporation et introduction de petits ARN interférents pouvant se lier spécifiquement à une séquence d'ARN messagers et empêcher l'expression de gènes en clivant cet ARN. Les cellules dites « Contrôle » ont subi l'électroporation mais l'ARN interférent n'a pas été introduit. Le protocole suivi est le même que celui utilisé dans [70]. Les cellules B sont d'abord resuspendues dans un milieu contenant les petits ARN interférents (concentration des cellules de 50 millions par millilitre). Puis, les cellules subissent l'électroporation (1300 V, 2 pulses, 20 ms, électroporation utilisée : Amaxa Lonza). Les cellules sont ensuite incubées dans leur milieu durant 48 heures avant d'être utilisées pour une expérience.

2.4) Préparation des cellules B avant l'expérience

Quelques heures avant l'expérience, les cellules B dans leur milieu (concentration d'environ 1 million par millilitre, volume total de 5 mL environ) sont réparties dans une plaque multi-puit et stockées dans un incubateur à 37 °C et conservant une atmosphère avec 5,0 % de CO₂. Environ 15 minutes avant l'injection des cellules B dans les pièges, 1,5 mL de cellules B est prélevé à la micropipette et placé dans un eppendorf. La dispersion est centrifugée (800 tr/min, 4 minutes) puis le surnageant est aspiré à la micropipette et remplacé par 0,5 mL de milieu cellulaire non utilisé. Ce changement de milieu permet d'enlever des cellules mortes restant en suspension dans le milieu surnageant après centrifugation. Les cellules dans leur milieu sont alors placées dans un réservoir adapté au régulateur de pression permettant l'injection dans la puce.

3) Pièges microfluidiques

De manière à optimiser les chances de capture, nous avons choisi d'utiliser les pièges contenus dans la chambre décalée plutôt que dans la chambre droite (voir étude faite plus haut). De plus, nous avons choisi d'utiliser les pièges avec des trous centraux de largeur 7 µm (au lieu de 3 µm) car ils permettent le passage d'un plus grand flux à l'intérieur du piège (donc la probabilité de capture est plus grande) tout en bloquant les gouttes d'huile de diamètre 7,2 µm.

Les puces en PDMS sont fabriquées selon les techniques standards de lithographie « douce » [15]. Le PDMS liquide (Polydiméthylsiloxane, RTV, proportion 1 : 10 d'agent réticulant) est versé sur le moule en résine. La puce est placée pendant une nuit à 70°C puis le PDMS est démoulé, découpé et collé sur une lame de verre circulaire (diamètre de 30 mm) avec un plasma à dioxygène. Une fois scellée, la puce est remplie de milieu cellulaire des cellules B à l'aide d'une seringue connectée à un tuyau, puis immergée dans un bain d'eau pour éviter toute évaporation.

L'entrée de la puce en PDMS est connectée avec un tube à un réservoir contenant la solution à injecter. Ce réservoir est placé sur la platine du microscope durant l'expérience, et est lui-même connecté à un régulateur de pression.

4) Régulateur de pression

La suspension de gouttes fonctionnalisées et celle de cellules B sont injectées dans la puce microfluidique à l'aide d'un régulateur de pression (MFCS Fluigent) relié à une sortie d'air comprimé. Ce régulateur, contrôlable par ordinateur via un logiciel intégré, peut délivrer une pression allant de 0 à 1 bar avec une précision à 0,1 mbar.

5) Microscopie

La visualisation des gouttes fonctionnalisées et des cellules B a été réalisée avec deux types de microscope : un microscope optique à fluorescence (Leica) et un *spinning disk* (Leica). Pour le microscope optique, la source de lumière est une diode, et pour le *spinning*, la source de lumière est un laser. Pour les deux appareils, la caméra utilisée est une caméra sCMOS (Hamamatsu). Les microscopes sont contrôlés par ordinateur via le logiciel MetaMorph. Les images sont enregistrées dans l'ordinateur sous la forme d'une liste d'images au format .TIFF. Pour la visualisation de la streptavidine à la surface des gouttes, le filtre utilisé est le filtre Cy5. Pour le *spinning*, le temps d'exposition est fixé à 40 ms et la puissance du laser est fixée à 5 %, et pour le microscope, le temps d'exposition est fixé à 50 ms et la puissance de la diode à 20 %. Pour les deux appareils, l'objectif utilisé possède un grossissement de 40X et est à huile. La hauteur de l'objectif peut être ajustée à l'aide d'un piezo (résolution de 200 nm).

6) Analyse d'image

Toutes les analyses d'images pour les expériences de contact entre gouttes et cellules ont été faites avec le logiciel Matlab MathWorks.

7) Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental mis en place pour l'étude du contact entre des gouttes fonctionnalisées et des cellules B est représenté sur la Figure 70.

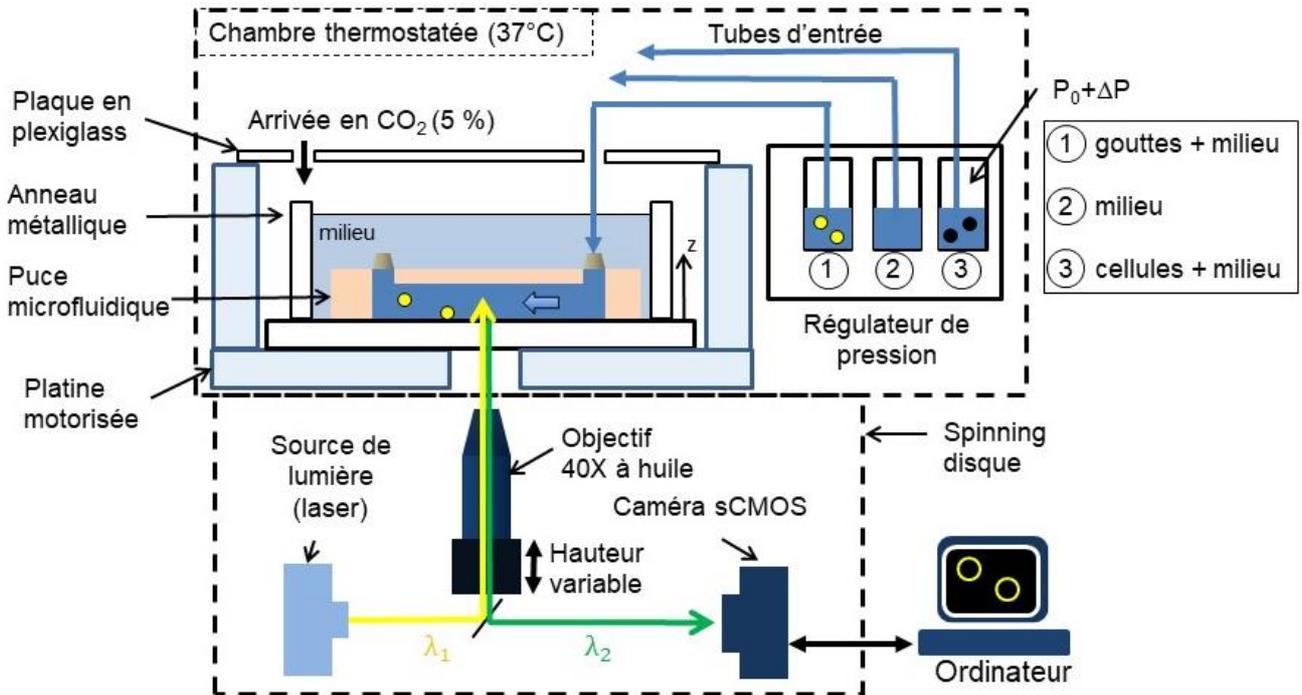


Figure 70. Schéma représentant le dispositif expérimental d'une expérience de mise en contact de gouttes fonctionnalisées avec des cellules B. La puce microfluidique (chambre décalée) est posée sur la platine d'un *spinning disk* avec une chambre thermostagée (37°C avec un taux en CO₂ de 5 %). L'entrée de la puce est reliée par un tube soit à un réservoir contenant les gouttes fonctionnalisées dispersées dans du milieu cellulaire (1), soit à un réservoir contenant du milieu cellulaire (2), soit à un réservoir contenant la suspension de cellules dans leur milieu (3). La puce est immergée dans un bain d'eau. Une différence de pression ΔP peut être imposée dans chacun de ces réservoirs avec un régulateur de pression. La source de lumière utilisée est un laser. Les gouttes fluorescentes en surface reçoivent une lumière de longueur d'onde λ_1 et émettent une lumière à une longueur d'onde plus élevée λ_2 qui est détectée par une caméra sCMOS. La hauteur de l'objectif (à huile, 40X) peut être ajustée à l'aide d'un piezo (résolution de 200 nm). Les images sont enregistrées par un ordinateur.

La puce microfluidique (pièges avec une chambre décalée) est posée sur la platine d'un *spinning disk* à l'aide d'un anneau en métal. L'entrée de la puce est connectée soit à un réservoir contenant les gouttes fonctionnalisées de 7,2 μm dispersées dans du milieu cellulaire (réservoir 1), soit à un réservoir contenant du milieu cellulaire (réservoir 2), soit à un réservoir contenant les cellules B dans leur milieu (réservoir 3). Chacun de ces trois réservoirs possède son tuyau de sortie propre. La sortie de la puce est laissée libre. La puce en PDMS est recouverte de milieu cellulaire dans l'espace défini par l'anneau métallique pour éviter toute évaporation à l'intérieur de la puce durant l'expérience. L'ensemble est dans une chambre thermostagée (37°C avec un taux en CO₂ de 5 %). Une différence de pression ΔP peut être imposée dans les réservoirs 1, 2 et 3 avec un régulateur de pression. La résistance hydrodynamique des tubes est négligeable devant celle de la puce microfluidique.

Le laser émet un rayonnement qui est filtré à la longueur d'onde λ_1 et qui est reçu par les gouttes présentes dans les pièges. Les gouttes émettent alors une lumière à une longueur d'onde plus élevée λ_2 qui est sélectionnée par un filtre et détectée par une caméra sCMOS. Les images

sont enregistrées par un ordinateur. L'objectif utilisé (à huile, grossissement de 40X) permet à la fois d'avoir une assez bonne résolution au niveau d'une goutte de 7,2 μm , et à la fois de visualiser 4 ou 5 pièges dans le champ de la caméra.

Dans le cas des expériences réalisées avec le microscope optique à épi-fluorescence, le dispositif est le même, à la différence que :

- Il n'y a pas de chambre à CO₂, donc l'atmosphère ne contient pas 5 % de CO₂.
- La puce microfluidique est remplie d'une solution de tampon PB – Tween20 à 0,2 % en masse initialement, au lieu de milieu cellulaire.
- Il y a deux réservoirs au lieu de trois : le réservoir 1 contient les gouttes dans la solution tampon PB-tween (pH = 7,4, proportion en masse en Tween20 de 0,2 %), et le réservoir 2 contient les cellules B dans leur milieu.

8) Méthode expérimentale

La méthode expérimentale permettant la mise en contact des gouttes d'huile fonctionnalisées avec les cellules B repose sur l'injection de trois liquides différents représentés sur la Figure 70 : la suspension de gouttes (réservoir 1), le milieu cellulaire (réservoir 2) et la suspension de cellules (réservoir 3).

Le thermostat et le régulateur en CO₂ de la chambre du *spinning disk* sont allumés environ une heure avant le début de l'expérience. Les 2 tuyaux d'arrivée en CO₂ sont branchés au niveau du portoir de la platine motorisée. La puce microfluidique est posée sur le porte échantillon du *spinning disk* comme indiqué plus haut. La suspension de gouttes fonctionnalisées préparée comme indiqué plus haut est placée dans le réservoir 1 et est injectée dans la chambre microfluidique à l'aide du régulateur de pression avec une différence de pression $\Delta P \approx 20$ mbar. La pression ΔP est maintenue pendant un temps assez long pour avoir assez de pièges occupés par une seule goutte, et assez court pour qu'il y ait un minimum de pièges occupés par deux gouttes ou plus (typiquement ce temps est de une à trois minutes). Puis la pression du réservoir 1 est mise à 0, le tuyau du réservoir 1 est retiré de la puce, et le tuyau du réservoir contenant du milieu cellulaire (réservoir 2) est branché en entrée de la puce. Une pression de $\Delta P \approx 20$ mbar est alors appliquée dans le réservoir 2 pendant 15 minutes, de manière à éliminer les éventuelles traces de streptavidine ou de surfactants issus de la fonctionnalisation dans le milieu. Puis la pression du réservoir 2 est mise à 0, le tuyau du réservoir 2 est débranché de la puce, et le tuyau du réservoir contenant les cellules B (réservoir 3) est branché en entrée de la puce. La plaque de plexiglass est placée sur le portoir de la platine de manière à conserver une atmosphère avec 5 % en CO₂ autour de la puce.

Des positions faisant apparaître une seule goutte par piège sont alors choisies en utilisant la platine motorisée en XY. Elles sont enregistrées par le logiciel MetaMorph (de 3 à 10 positions selon l'acquisition). Une acquisition d'une séquence d'images à plusieurs couleurs, plusieurs positions, et plusieurs Z est lancée via le logiciel MetaMorph. Pour chaque position XY, une série d'images de plusieurs Z est faite pour chaque couleur (lumière blanche, filtre Cy5 pour les gouttes, ...). Il y a 4 ou 6 plans en Z espacés de 1 μm . L'intervalle de temps entre deux passages à une même position de la platine est de l'ordre d'une minute pour un total de 5 ou 6 positions. Le temps total d'acquisition est typiquement entre 30 et 40 minutes.

Une fois l'acquisition lancée, une pression $\Delta P \approx 10$ mbar dans le réservoir 3 est appliquée le temps d'observer l'entrée des cellules dans la chambre et l'obtention de paires goutte-cellule (entre 5 et 15 selon les expériences). On appelle couple « goutte-cellule » l'obtention dans un piège d'une seule goutte en contact avec une seule cellule. Puis la pression est mise à 0 pour le reste de l'acquisition. Notons qu'il reste néanmoins un flux faible dans le sens d'injection (vitesse maximum de l'ordre de $5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), dû à la différence de hauteur (environ 5 cm) entre le réservoir contenant les cellules et la puce microfluidique. La Figure 71A montre une image prise au microscope optique des pièges remplis par les gouttes, puis par des cellules B, dans une chambre décalée. On dénombre un total de 15 couples goutte-cellule B. La Figure 71B est un zoom au niveau d'une assemblée de pièges.

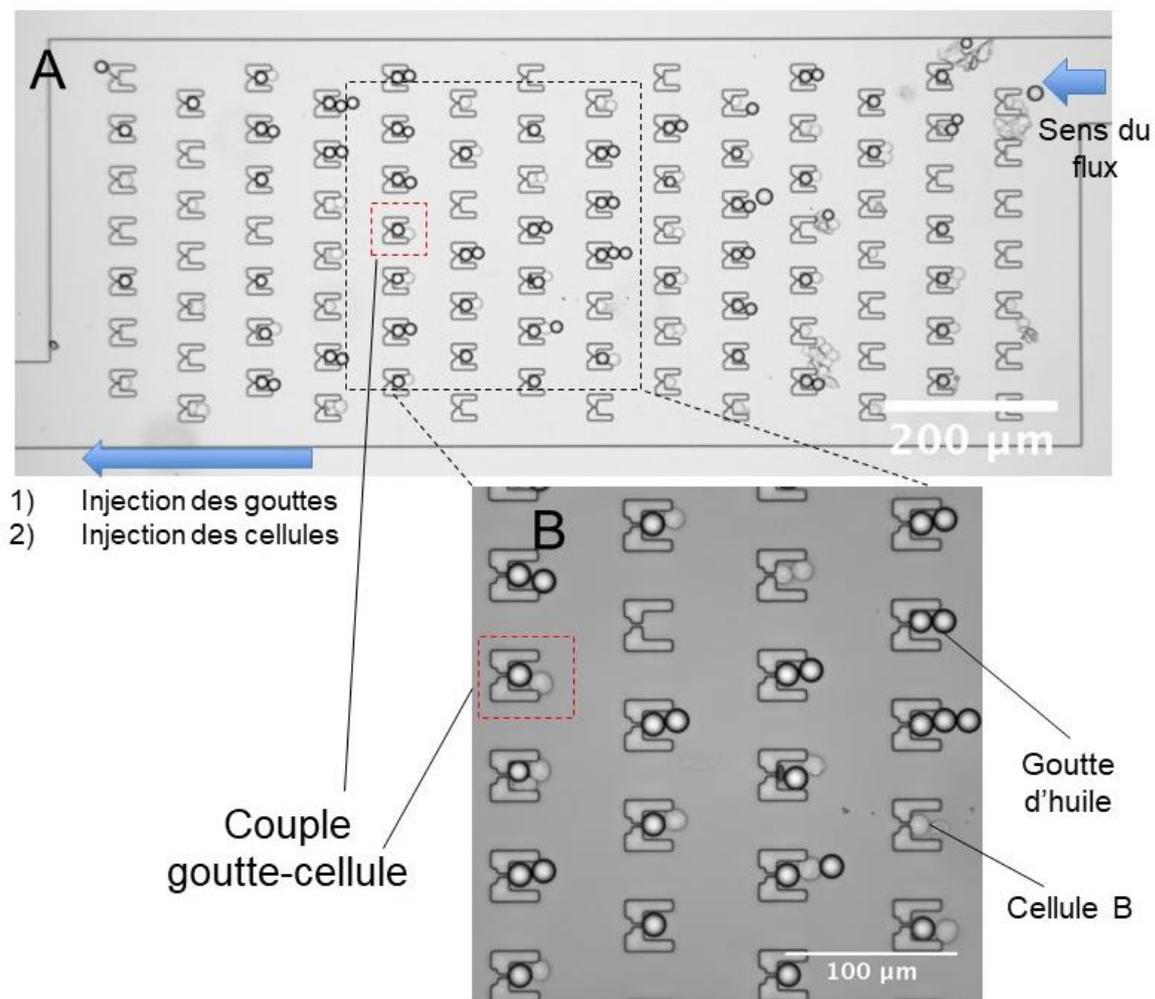


Figure 71. (A) Image prise au microscope optique de la chambre décalée après injection des gouttes d'huile, puis des cellules B, suivant le protocole indiqué plus haut. On dénombre en tout 15 couples goutte-cellule dans les pièges. Les gouttes ont été fabriquées en microfluidique. (B) Zoom sur une assemblée de pièges, montrant quelques couples goutte-cellule.

Pour chaque condition (type de gouttes et type de cellules donnés), l'expérience est répétée 3 fois. Puis une expérience avec une autre condition est faite. En moyenne, 3 ou 4 conditions peuvent être testées lors d'une séquence d'expériences. A la fin d'une séquence d'expériences, le matériel ayant été mis en contact avec le milieu cellulaire (portoir du régulateur de pression, anneau portant la lame de verre, ...) est nettoyé à l'éthanol.

Dans le cas des expériences réalisées avec le microscope optique, la méthode expérimentale est la même à la différence que les cellules B sont injectées juste après les gouttes, sans rinçage intermédiaire avec du milieu. Les expériences au microscope optique ont été réalisées entre octobre 2016 et décembre 2016. Les expériences au *spinning disk* ont été réalisées entre avril 2017 et juillet 2017. Le choix du passage au *spinning* a été motivé par la volonté d'obtenir des images précises en fluorescence au niveau de la cellule.

III) Résultats

Nous avons exposé précédemment les protocoles mis au point pour fonctionnaliser les gouttes d'huile de soja avec de la streptavidine et des anticorps $F(ab')_2$, ainsi que les méthodes d'injection des gouttes et des cellules B dans les pièges microfluidique afin d'obtenir des paires goutte-cellule dans le maximum de pièges. Dans cette partie, nous montrons premièrement que la fonctionnalisation a bien fonctionné, c'est-à-dire que les gouttes portent bien à leur surface de la streptavidine et des $F(ab')_2$. Puis nous observons les phénomènes associés à l'adhésion des cellules B avec les gouttes fonctionnalisées. Principalement, nous observons une accumulation de $F(ab')_2$ au niveau de la surface de contact entre la goutte et la cellule. Après avoir présenté notre méthode d'analyse, nous quantifions cette accumulation et donnons ses principales dépendances.

1) Résultats de la fonctionnalisation des gouttes

Nous nous assurons ici que la fonctionnalisation des gouttes d'huile de soja par la streptavidine et les anticorps $F(ab')_2$ a bien fonctionné. Une manière directe est d'observer au microscope la fluorescence associée à chaque protéine : la fluorescence associée à la streptavidine d'une part, et celle associée aux anticorps secondaires liés spécifiquement aux $F(ab')_2$ d'autre part.

1.1) Fonctionnalisation par la streptavidine

Nous avons fait réagir de la streptavidine sur des phospholipides biotinylés présents de manière homogène à la surface de gouttes d'huile d'émulsion (voir protocole ci-dessus). La Figure 66B montre les images prises au microscope en lumière blanche (à gauche) et en fluorescence (à droite) des gouttes fonctionnalisées. On remarque que la fluorescence des gouttes est plus importante en surface qu'en volume, signe que la fonctionnalisation en streptavidine a fonctionné.

La Figure 66C montre la distribution en diamètre des gouttes. D'après l'ajustement par une gaussienne, cette distribution est centrée à $7,2 \mu\text{m}$, avec un écart type de $1,9 \mu\text{m}$. La taille du trou central des pièges étant de $7 \mu\text{m}$, les gouttes dont le diamètre est supérieur à $7 \mu\text{m}$ seront piégées, tandis que celles dont le diamètre est inférieur à $7 \mu\text{m}$ passeront à travers le piège sans être piégées. Il y a donc une sélection de la taille des gouttes piégées par la taille du trou des

pièges. Les gouttes piégées ont donc un diamètre compris entre 7 et 10 μm , diamètre comparable en moyenne à celui des cellules B.

La Figure 66D montre la distribution de la moyenne en intensité par goutte. L'intensité en abscisse apparaît en niveau de gris moyen. On constate que cette intensité varie de 250 à 1000, soit d'un facteur 4. La quantité de streptavidine par goutte, et donc la quantité de F(ab')_2 par goutte varie de manière non négligeable au sein d'un même lot de gouttes fonctionnalisées.

1.2) Fonctionnalisation par les F(ab')_2

De manière à savoir si les anticorps F(ab')_2 sont bien liés à la streptavidine autour des gouttes d'huile, nous avons introduit dans le milieu des anticorps secondaires pouvant se lier spécifiquement aux F(ab')_2 et ayant la particularité d'être fluorescents (voir protocole détaillé plus haut et le schéma de la Figure 72B).

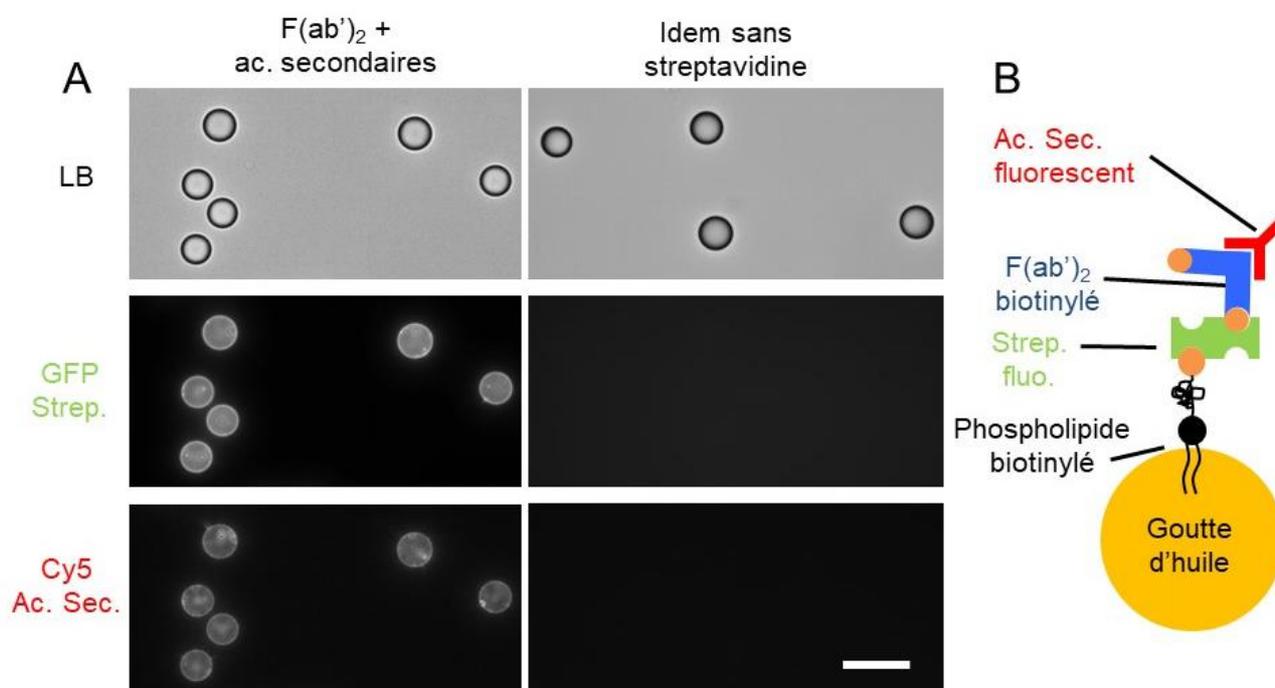


Figure 72. (A) Images des gouttes fonctionnalisées par des anticorps F(ab')_2 après ajout d'anticorps secondaires fluorescents (colonne de gauche), en lumière blanche (première ligne) et en fluorescence avec le filtre GFP (streptavidine) et Cy5 (anticorps secondaire) (respectivement deuxième et troisième ligne). On constate la fluorescence des anticorps secondaires à la surface des gouttes. Dans le cas où la streptavidine n'a pas été ajoutée lors de la fonctionnalisation (deuxième colonne), la fluorescence des anticorps secondaires n'apparaît pas, montrant ainsi que le lien entre l'anticorps F(ab')_2 et la goutte ne peut pas se faire par adsorption de l'anticorps à la surface de la goutte, et qu'une liaison streptavidine-biotine est nécessaire. La barre d'échelle vaut 30 μm . (B) Schéma des molécules impliquées dans la fonctionnalisation. La streptavidine, liée au phospholipide biotinylé, est fluorescente (filtre GFP). L'anticorps secondaire fluorescent (filtre Cy5), est attaché à l'anticorps F(ab')_2 biotinylé, lui-même attaché à la streptavidine.

La Figure 72A montre les images des gouttes fonctionnalisées par des $F(ab')_2$ après ajout des anticorps secondaires fluorescents (colonne de gauche), en lumière blanche (première ligne) et en fluorescence avec le filtre GFP correspondant à la fluorescence de la streptavidine (deuxième ligne), et le filtre Cy5 correspondant à la fluorescence des anticorps secondaires (troisième ligne). On constate que les gouttes sont fluorescentes en surface, montrant ainsi la présence des anticorps $F(ab')_2$. Les points fluorescents au centre des gouttes sont dus à des phénomènes d'adhésion entre les anticorps et la lame de verre.

Dans le cas où la streptavidine n'a pas été ajoutée lors de la fonctionnalisation (colonne de droite), les gouttes ne sont pas fluorescentes, montrant ainsi que le lien entre l'anticorps $F(ab')_2$ et la goutte ne peut pas se faire par adsorption de l'anticorps à la surface de la goutte, et qu'une liaison streptavidine-biotine est nécessaire.

2) Premières observations

2.1) Avec le *spinning disk*

Nous donnons ici les premiers résultats obtenus en suivant le protocole de mise en contact des gouttes fonctionnalisées avec des cellules B. La Figure 73 montre une séquence d'images prises au *spinning disk* pour une goutte fonctionnalisée par des $F(ab')_2$ (dite goutte « $F(ab')_2$ ») (A) et une goutte fonctionnalisée par de la BSA (dite goutte « BSA ») (B).

On constate l'apparition d'une zone d'accroissement de la fluorescence au contact goutte-cellule. Cette zone, appelée « patch » fluorescent dans la suite, apparaît après 3 minutes de mise en contact dans le cas de la goutte $F(ab')_2$ mais n'apparaît pas dans le cas de la goutte BSA. Il s'agit d'une accumulation d'anticorps $F(ab')_2$ au contact goutte-cellule, due à la formation de liens entre les $F(ab')_2$ et les récepteurs membranaires de la cellule B. On note que la fluorescence du patch n'est pas homogène, présentant une certaine granulosité qui reste stable dans le temps.

La BSA étant une molécule passivante, elle ne réagit pas avec les récepteurs membranaires de la cellule B, d'où l'absence de patch dans le cas de la goutte BSA.

Notons que ce patch fluorescent a déjà été observé pour un contact entre des cellules T et des gouttes fonctionnalisées [44].

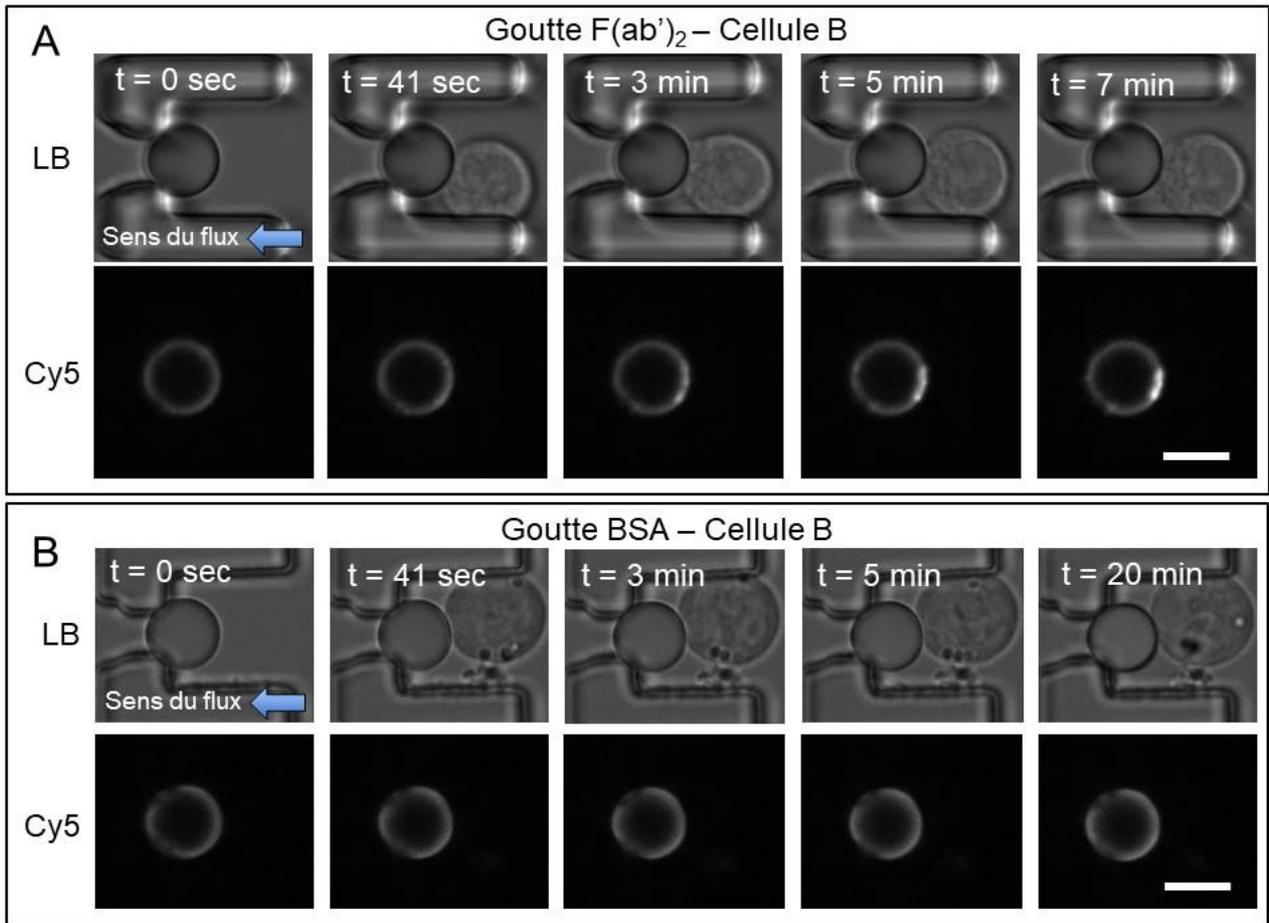


Figure 73. Séquence d'images prises au *spinning disk* d'une cellule B mise en contact avec une goutte fonctionnalisée par des anticorps $F(ab')_2$ (A) ou une goutte fonctionnalisée avec de la BSA (B), en lumière blanche (en haut) et en fluorescence (filtre Cy5 correspondant à la fluorescence de la streptavidine, en bas). On constate l'apparition d'un patch fluorescent au contact goutte -cellule à partir de $t = 3$ min pour la goutte fonctionnalisée avec les $F(ab')_2$. L'intensité de la fluorescence en surface reste cependant homogène dans le cas de la goutte fonctionnalisée par la BSA. Le sens du flux est indiqué par la flèche bleue (de droite à gauche). Barre d'échelle : 10 μm .

2.2) Avec le microscope optique

Nous avons réalisé la même expérience mais avec une observation au microscope optique. Le protocole de mise en contact est identique à celui décrit avec le *spinning disk*, mis à part que la puce n'est pas dans une atmosphère contenant 5 % de CO_2 . La Figure 74 montre les images obtenues dans le cas d'une goutte $F(ab')_2$ (A) et d'une goutte BSA (B). De même qu'au *spinning disk*, on constate l'apparition d'un patch fluorescent au contact goutte-cellule dans le cas de la goutte $F(ab')_2$ et pas de patch dans le cas de la goutte BSA. On remarque que l'intérieur des gouttes fonctionnalisées est légèrement fluorescent contrairement aux images au *spinning disk* où l'intérieur apparaît « noir ». Ceci est dû au fait que le *spinning disk* réalise une image sur une coupe en z très fine (inférieure au micron), alors que le microscope optique réalise une intégration d'intensité sur une certaine épaisseur en Z.

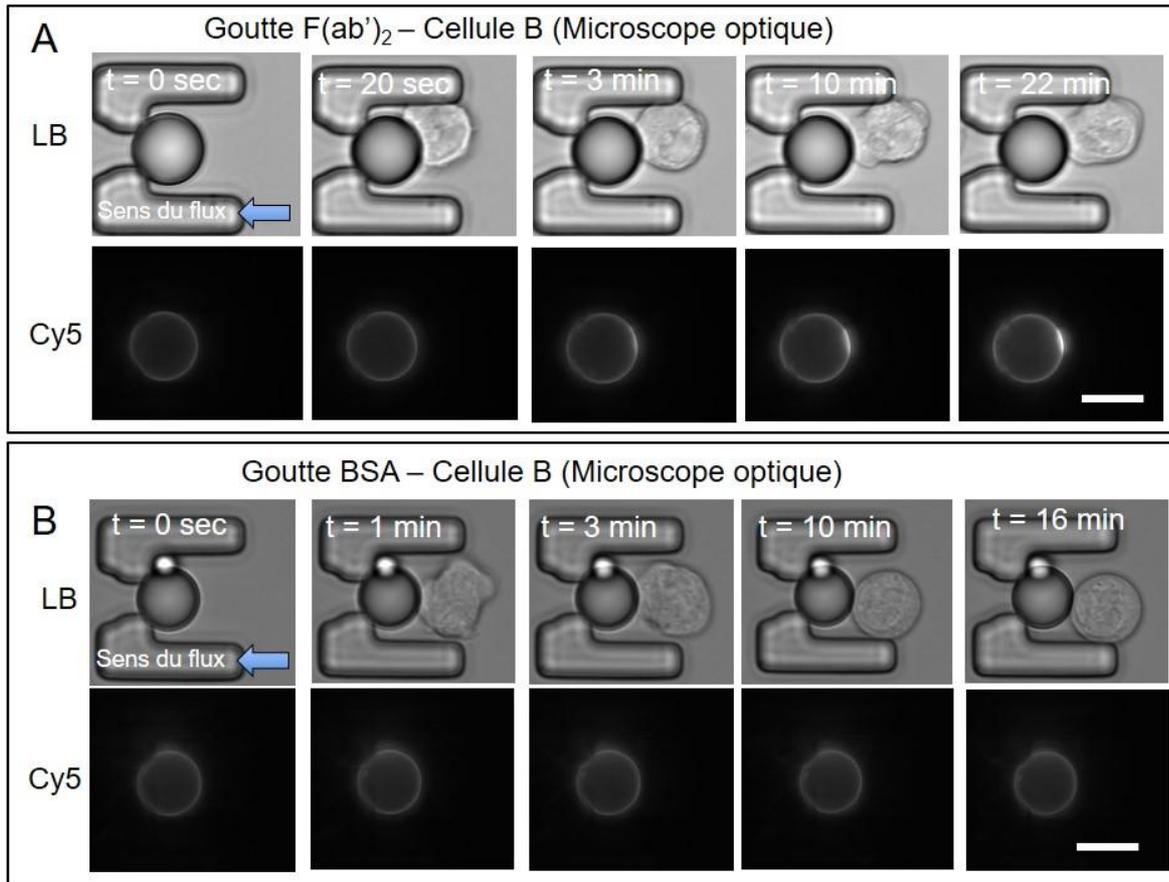


Figure 74. Séquence d'images prises au microscope optique d'une cellule B mise en contact avec une goutte fonctionnalisée par des anticorps F(ab')₂ (A) ou une goutte fonctionnalisée avec de la BSA (B), en lumière blanche (en haut) et en fluorescence (filtre Cy5 correspondant à la fluorescence de la streptavidine, en bas). On constate l'apparition d'un patch fluorescent au contact goutte -cellule à partir de t = 3 min pour la goutte fonctionnalisée avec les F(ab')₂. L'intensité de la fluorescence en surface reste cependant homogène dans le cas de la goutte fonctionnalisée par la BSA. Le sens du flux est indiqué par la flèche bleue (de droite à gauche). Barre d'échelle : 10 μ m.

3) Méthodes d'analyse

Nous avons voulu caractériser quantitativement le degré d'accumulation de F(ab')₂ au contact goutte-cellule. Nous exposons dans ce paragraphe deux types de méthodes d'analyse pouvant être utilisées, et donnant des informations complémentaires.

3.1) Méthode dite « des pics »

La méthode « des pics » nous semble être la plus directe et la plus intuitive. Nous l'illustrons à partir d'images prises au *spinning disk* (Figure 75) et au microscope optique (Figure 76). Elle consiste à analyser les pics d'un profil d'intensité de la goutte.

La Figure 75A montre la ligne suivant laquelle le profil en intensité est tracé. Cette ligne passe par le centre du patch fluorescent et le côté opposé à ce patch, coupant la goutte en deux.

Les profils en intensité sont tracés à différents temps sur la Figure 75B. On constate que le pic en intensité du côté de la cellule croît, alors que le profil en intensité du côté opposé reste constant. On appelle alors l'intensité du pic du côté de la cellule I_{\max} et celui du côté opposé I_{\min} . Nous avons tracé I_{\max} et I_{\min} en fonction du temps sur la Figure 75C. On constate que I_{\max} et I_{\min} sont égales à $t = 0$ min, puis que I_{\max} augmente alors que I_{\min} reste constant. Le fait que I_{\min} reste constante montre que la quantité de $F(ab')_2$ est grande devant le nombre de liens ligand/récepteur au niveau de la zone de contact. Nous sommes dans une configuration où le nombre de $F(ab')_2$ sur la goutte n'est pas limitant.

Sur la Figure 75D, nous avons tracé la différence $I_{\max} - I_{\min}$ en fonction du temps pour une goutte $F(ab')_2$ (cercles bleus) et une goutte BSA (croix noires). Dans le cas de la goutte $F(ab')_2$, cette différence vaut 0 à $t = 0$ min, puis augmente en fonction du temps. Dans le cas de la goutte BSA, le rapport reste égal à 0, montrant que les deux pics restent égaux en fonction du temps.

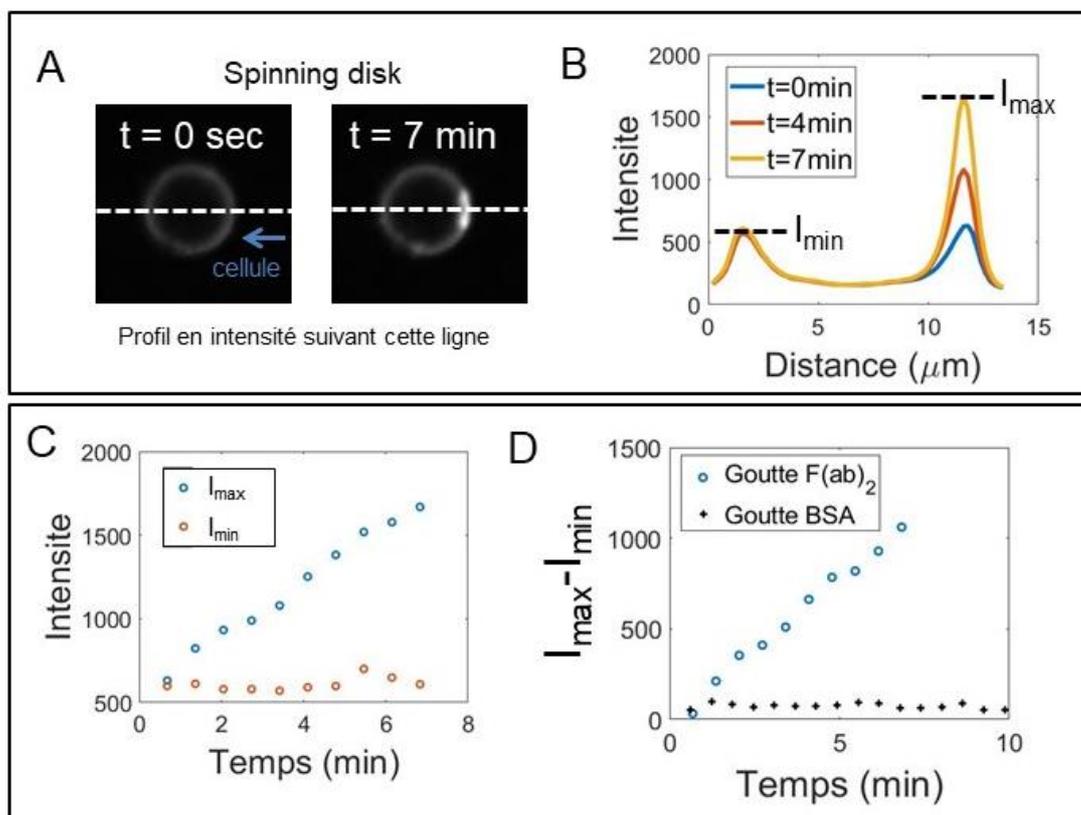


Figure 75. (A) Schéma de la ligne suivant laquelle le profil en intensité est tracé. La ligne passe par le centre du patch et le côté opposé au patch. (B) Profils en intensité suivant la ligne coupant la goutte à $t = 0$ min, $t = 4$ min et $t = 7$ min. L'intensité du côté de la cellule augmente au cours du temps alors que celle du côté opposé reste constante. On appelle I_{\max} (respectivement I_{\min}) l'intensité du pic du côté de la cellule (respectivement du côté opposé). (C) Courbes de I_{\max} et de I_{\min} en fonction du temps. I_{\max} augmente alors que I_{\min} reste constante. (D) Différence de I_{\max} moins I_{\min} en fonction du temps, dans le cas d'une goutte $F(ab')_2$ et d'une goutte BSA. Pour la goutte $F(ab')_2$, cette différence vaut 0 à $t = 0$ min, puis augmente en fonction du temps. Pour la goutte BSA, la différence reste constante et égale à 0.

Cette méthode des pics a été également appliquée aux images prises au microscope optique. L'analyse résultante est présentée sur la Figure 76. De même que pour le *spinning disk*, une ligne est tracée, passant par le patch fluorescent. Les profils d'intensité sont tracés suivant

cette ligne à différents temps pour une goutte $F(ab')_2$ et une goutte BSA sur la Figure 76B. Les intensités des deux pics dans le cas de la goutte $F(ab')_2$ sont tracées en fonction du temps sur la Figure 76C. La quantité $I_{\max}-I_{\min}$, normalisée par le temps d'exposition et la puissance de la diode, est tracée en fonction du temps dans le cas d'une goutte $F(ab')_2$ (cercles bleus) et d'une goutte BSA (croix noires) (Figure 76D). Dans le cas de la goutte $F(ab')_2$, on constate une augmentation puis l'atteinte d'un plateau. Les points expérimentaux sont ajustés par une fonction de type $a*(1-\exp(t/\tau))$ avec a la valeur du plateau et τ celle du temps caractéristique.

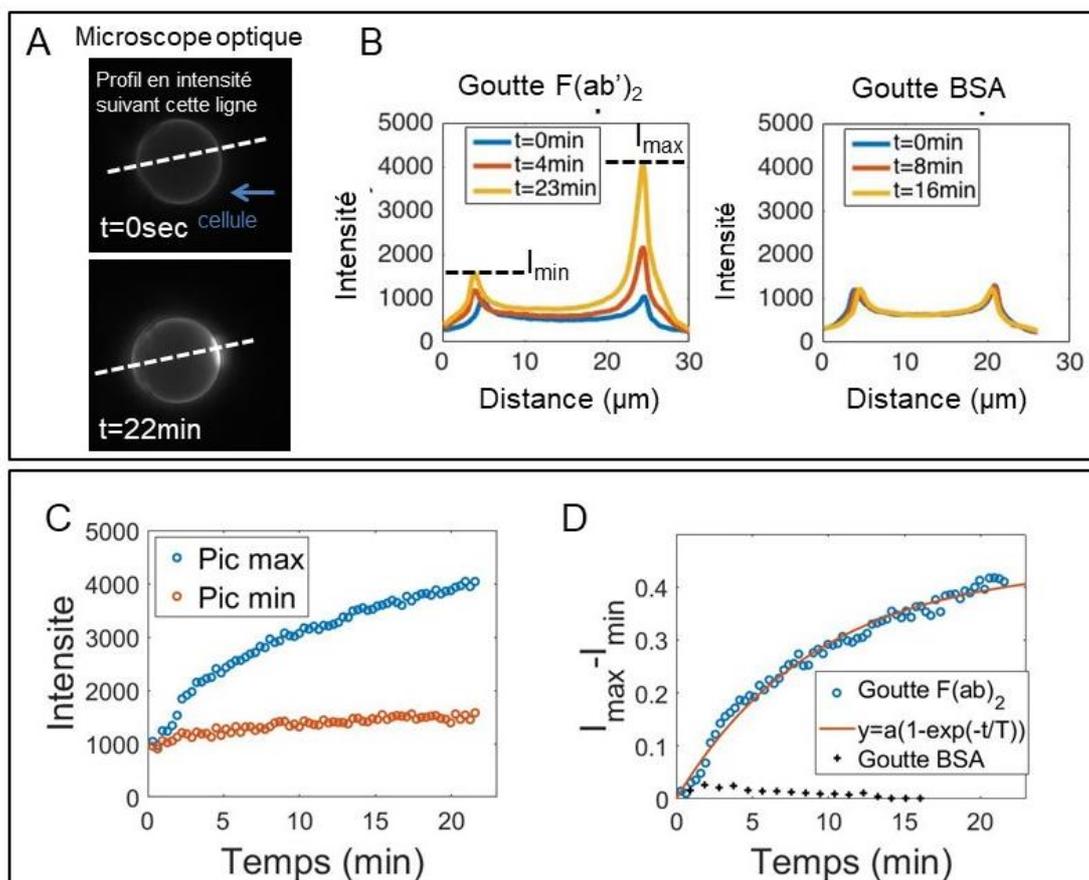


Figure 76. Méthode des pics appliquée à une mesure au microscope optique à fluorescence. (A) Schéma de la ligne suivant laquelle le profil en intensité est tracé. La ligne passe par le centre du patch et le côté opposé au patch. (B) Profils en intensité suivant la ligne coupant la goutte à différents temps, dans le cas d'une goutte $F(ab')_2$ et dans le cas d'une goutte BSA. On appelle I_{\max} (respectivement I_{\min}) l'intensité du pic du côté de la cellule (respectivement du côté opposé). (C) Courbes de I_{\max} et de I_{\min} en fonction du temps. I_{\max} augmente alors que I_{\min} reste constante. (D) Courbes de $(I_{\max}-I_{\min})$ en fonction du temps, dans le cas d'une goutte $F(ab')_2$ (cercles bleus) et dans le cas d'une goutte BSA (croix noires). La courbe correspondant à la goutte $F(ab')_2$ est ajustée par une fonction de type $a*(1-\exp(t/\tau))$ avec a la valeur du plateau et τ celle du temps caractéristique. Pour la goutte BSA, la courbe reste constante et égale à 0.

3.2) Méthode dite « droite-gauche »

La méthode dite « droite-gauche », illustrée sur la Figure 77A, consiste à couper une goutte en deux de manière à ce que la somme des intensités soit la même pour les deux moitiés d'image à $t = 0$ sec (lorsque la cellule n'est pas encore en contact avec la goutte). Nous verrons que cette méthode permet d'avoir une mesure du nombre de $F(ab')_2$ dans la zone de contact dans

le cas du *spinning disk*, et également que, combinée à la méthode des pics, cette méthode permet de déduire la taille du patch.

Nous appelons alors I_d la somme des intensités de la moitié droite de l'image et I_g la somme des intensités de la moitié gauche de l'image. Ces sommes sont calculées pour chaque temps. Les courbes de I_d et I_g en fonction du temps sont données sur la Figure 77B. On constate que I_g reste constante en fonction du temps, alors que I_d croit et atteint un plateau.

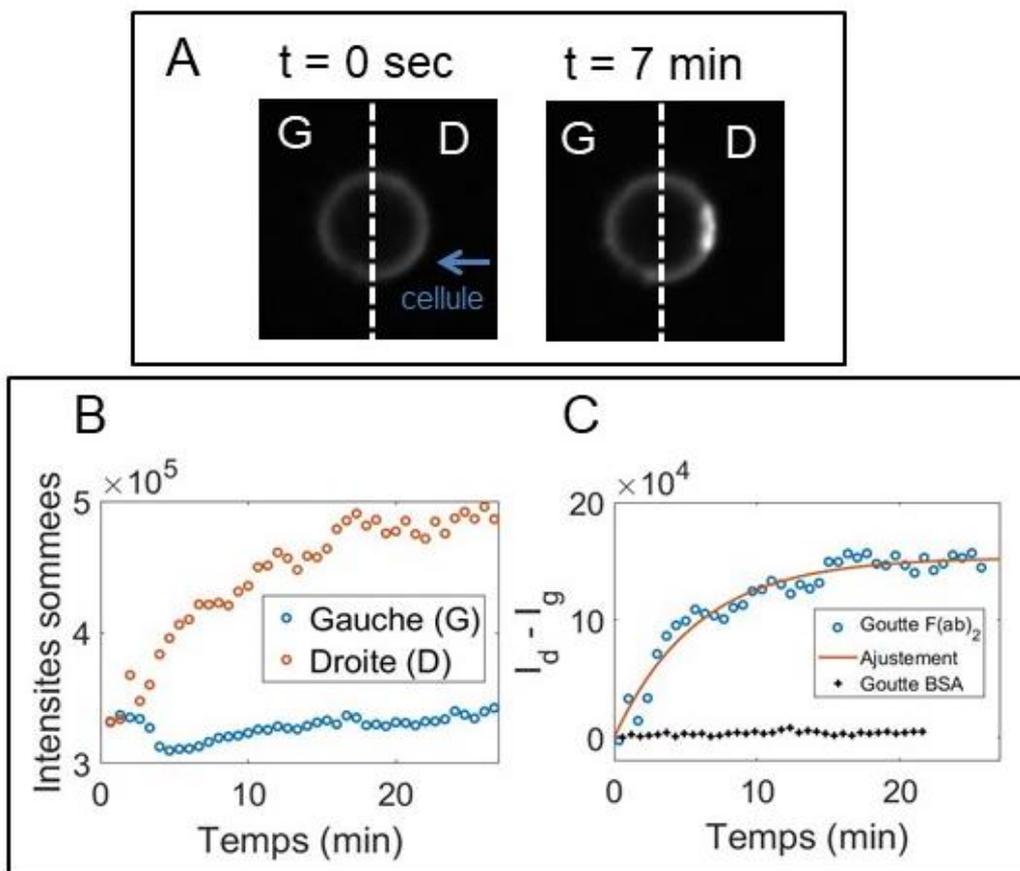


Figure 77. Méthode dite « droite - gauche ». (A) Schéma de la séparation d'une goutte en une partie gauche (G), et une partie droite (D). La cellule vient en contact sur la partie droite de la goutte. La position du trait pointillé de séparation est déterminée de manière à ce qu'au temps $t = 0$ sec, la somme des intensités de la partie droite de l'image soit égale à la somme des intensités de la partie de gauche. (B) Somme des intensités de la partie droite de l'image (cercles oranges) et de la partie gauche de l'image (cercles bleus) en fonction du temps. Alors que la somme reste constante pour la partie gauche, elle augmente pour atteindre un plateau pour la partie droite. (C) Différence de la somme des intensités de droite et de gauche en fonction du temps, pour une goutte $F(ab')_2$ (ronds bleus) et une goutte BSA (croix noires). La courbe correspondant à la goutte $F(ab')_2$ est ajustée par une fonction de type $a \cdot (1 - \exp(-t/\tau))$ avec a la valeur du plateau et τ celle du temps caractéristique. La courbe correspondant à la goutte BSA reste constante et égale à 0.

De manière à obtenir seulement l'excédent d'intensité du patch, nous avons ensuite tracé la différence $I_d - I_g$ en fonction du temps (Figure 77C), dans le cas d'une goutte $F(ab')_2$ (cercles bleus) et dans le cas d'une goutte BSA (croix noires). On constate que la différence pour la goutte $F(ab')_2$ augmente rapidement au début, puis de moins en moins, jusqu'à atteindre un plateau. Nous avons choisi d'ajuster cette courbe par une fonction de type $a \cdot (1 - \exp(-t/\tau))$ avec a la valeur

du plateau et τ celle du temps caractéristique. La différence $I_d - I_g$ concernant la goutte BSA reste en revanche égale à 0, montrant que l'intensité de la partie droite de la goutte reste égale à la partie gauche malgré la présence de la cellule.

3.3) Comparaison des deux méthodes et des instruments de mesure

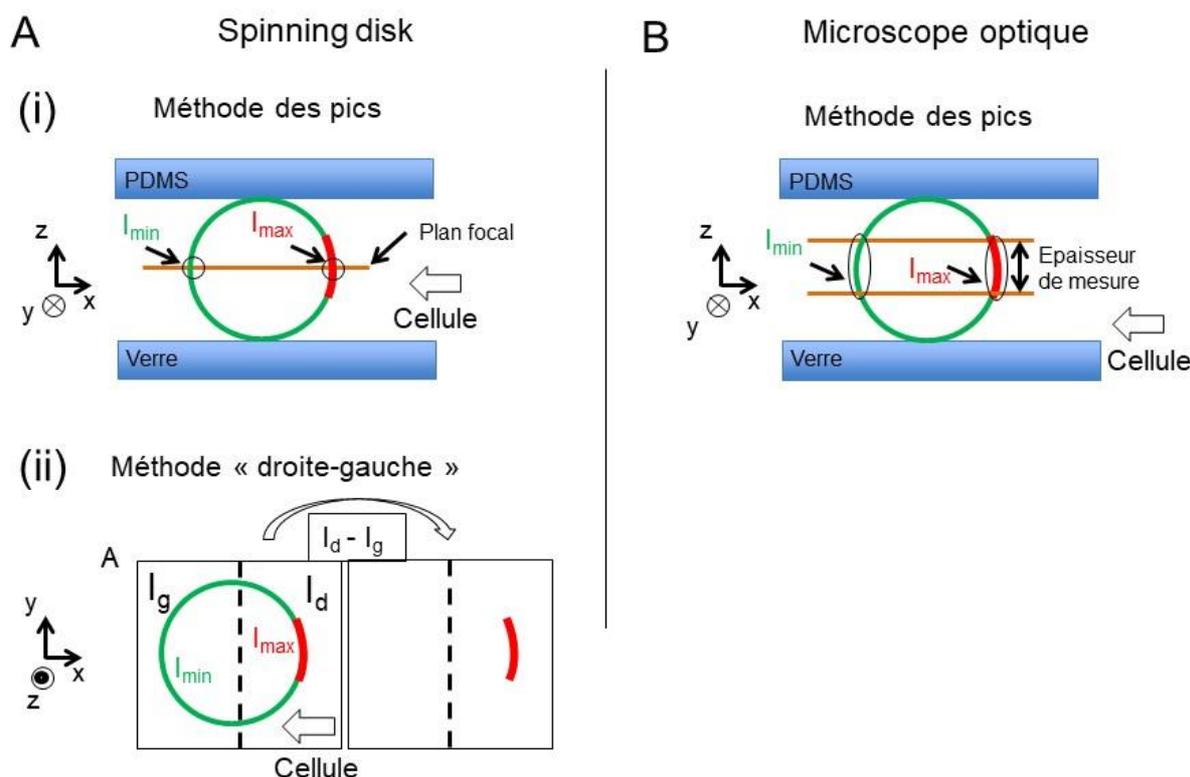
Ces deux méthodes permettent de quantifier le degré d'accumulation des anticorps $F(ab')_2$, mais apportent des informations différentes.

Pour la mesure au *spinning disk*, la méthode des pics est une mesure locale d'intensité au niveau du centre du patch fluorescent. La Figure 78A(i) schématise la goutte vue de profil, entre le verre en bas et le PDMS en haut. La surface en vert de la goutte possède une intensité de fluorescence I_{min} , et la partie rouge représente le surplus en intensité I_{max} au niveau du patch. Avec le *spinning*, l'épaisseur du plan focal est largement inférieure à la taille du patch. La quantité $(I_{max}-I_{min})$ est proportionnelle à la concentration en anticorps $F(ab')_2$ dans le patch.

En revanche, dans le cas du microscope optique, une intégration de la fluorescence mesurée est faite sur une assez grande épaisseur (appelée « épaisseur de mesure » sur le schéma de la Figure 78B) pour considérer que $(I_{max}-I_{min})$ est proportionnelle à un nombre total d'anticorps (Figure 78B). Cette épaisseur de mesure est plus grande que la profondeur de champ (inférieure à 1 μm dans notre cas). En effet, la profondeur de champ est définie comme la distance suivant l'axe optique entre le plan objet le plus proche apparaissant net dans le plan image et le plan objet le plus éloigné apparaissant net dans le plan image. Or le système optique récolte également de la lumière provenant de plans objets plus éloignés, qui n'apparaîtront pas forcément nets dans le plan image, mais qui auront malgré tout une certaine contribution dans l'intensité totale récoltée dans le plan image (là où est le détecteur de la caméra).

La méthode dite « droite-gauche » mesure l'excédent total d'intensité du patch entier par rapport au reste de la goutte. La Figure 78A(ii) schématise la goutte vue de haut. Le trait en pointillés est la séparation entre les deux parties de la goutte. I_d et I_g sont la somme des intensités de la partie droite et de la partie gauche respectivement. La position en x de cette séparation est déterminée par le barycentre des intensités avant contact avec la cellule. La différence (I_d-I_g) est donc proportionnelle au nombre total d'anticorps $F(ab')_2$ recrutés au contact goutte-cellule.

Le paramètre liant la concentration en anticorps et leur nombre est la surface du patch, suivant la relation Nombre = Concentration*Surface. On voit ici que la mesure du nombre et de la concentration permet de déduire une surface de patch, qui peut être comparée à une mesure de surface directe. Nous reviendrons sur ce point dans la suite.



I_d (resp. I_g): intégration des intensités de la partie droite D (resp. gauche G)
 I_{max} : surplus en intensité du patch (en rouge)
 I_{min} : intensité de la goutte (en vert)

Figure 78. Comparaison des méthodes d'analyse et des instruments de mesure utilisés. (A)(i) Schéma illustrant la mesure de $(I_{max}-I_{min})$ au *spinning*. L'épaisseur du plan focal est largement inférieure à la longueur du patch. $I_{max}-I_{min}$ est proportionnel à la concentration en $F(ab')_2$ dans le patch. (ii) Schéma illustrant la mesure de (I_d-I_g) au *spinning*. On obtient bien l'intégration des intensités sur le patch entier. (B) Schéma illustrant la mesure de $(I_{max}-I_{min})$ au microscope optique. La profondeur de champ est du même ordre que la longueur du patch. $I_{max}-I_{min}$ est proportionnel au nombre de $F(ab')_2$ dans le patch.

4) Résultats des analyses « des pics »

Nous avons appliqué la méthode « des pics » à des mesures faites au microscope optique et à d'autres faites au *spinning disk*.

4.1) Cas du microscope optique

La Figure 79 montre les résultats de l'analyse des « pics » dans le cas de gouttes $F(ab')_2$ (A) et dans le cas de gouttes BSA (B). L'observation a été faite au microscope optique. Dans chaque cas, la quantité $(I_{max}-I_{min})$ normalisée par le temps d'exposition et la puissance de la diode, est tracée en fonction du temps. Il y a en tout $N = 12$ gouttes analysées pour les gouttes $F(ab')_2$ et $N = 7$ pour les gouttes BSA.

Dans le cas des gouttes $F(ab')_2$, les courbes commencent à 0 puis augmentent jusqu'à l'atteinte d'un plateau. La valeur de ce plateau peut varier d'un facteur 8 suivant la goutte analysée. Ces courbes correspondent aux expériences réalisées le 7 décembre 2016 (07/12/2016). Dans le cas des gouttes BSA, les courbes restent centrées en 0.

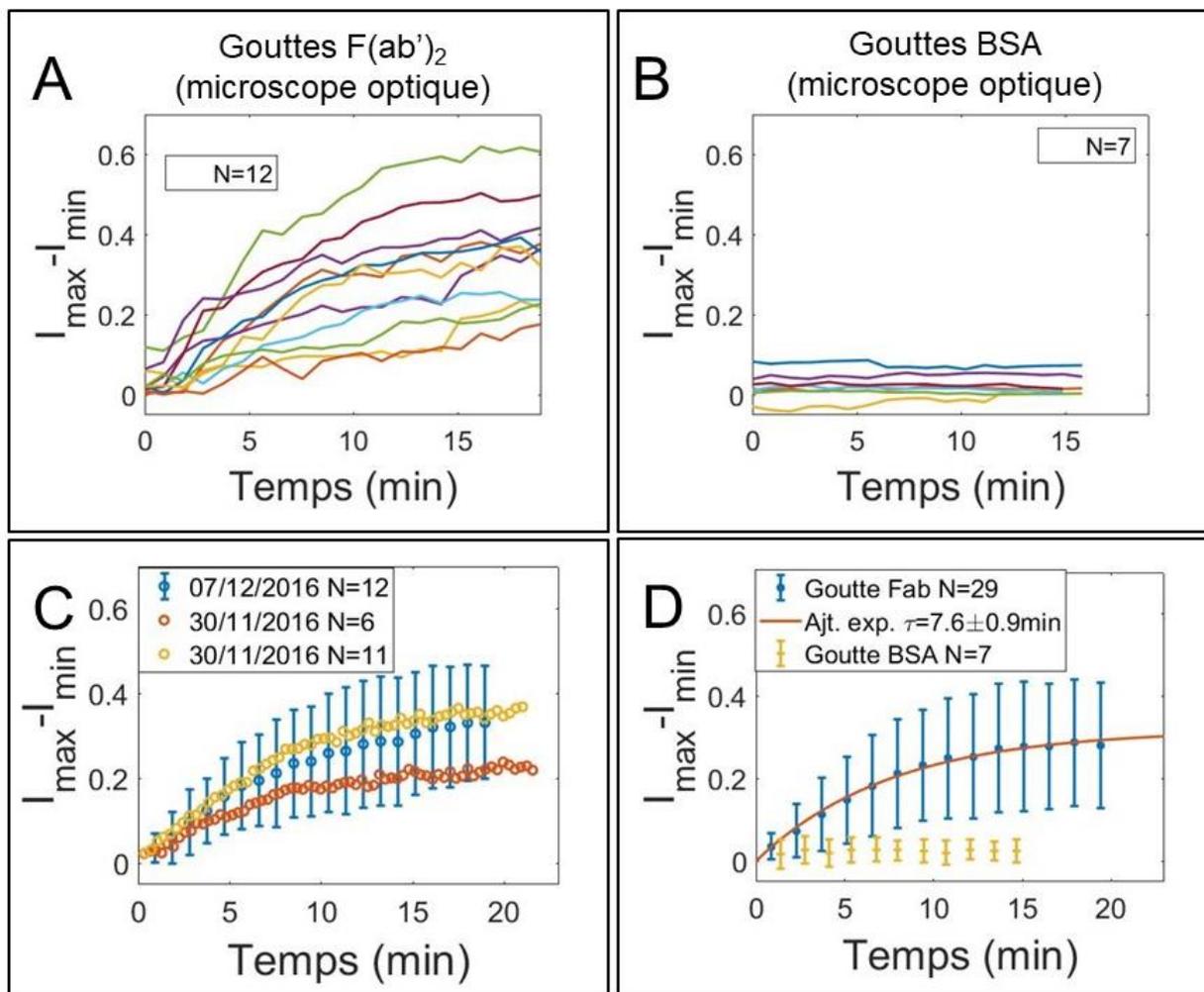


Figure 79. Quantité $I_{\max}-I_{\min}$ tracée en fonction du temps (méthode dite « des pics ») pour des gouttes $F(ab')_2$ (A) et des gouttes BSA (B). L'observation a été faite avec le microscope optique. L'analyse est faite pour des cellules B « Wild Type » (sans transfection). Il y a en tout $N = 12$ gouttes analysées pour (A), et $N = 7$ pour (B). Dans le cas des gouttes BSA, les courbes restent centrées en 0. (C) Moyenne de $I_{\max}-I_{\min}$ en fonction du temps pour trois expériences indépendantes, réalisées dans les mêmes conditions. Pour plus de clarté, nous avons indiqué les barres d'erreur seulement sur une des courbes, mais elles sont du même ordre de grandeur. (D) Moyenne de $I_{\max}-I_{\min}$ en fonction du temps prenant en compte les trois expériences indépendantes (en bleu). La courbe pour les gouttes BSA est indiquée en jaune. La courbe en orange est un ajustement exponentiel du type $a*(1-\exp(-t/\tau))$ avec $\tau = 7,6 \pm 0,9$ min.

La Figure 79C montre trois moyennes de $I_{\max}-I_{\min}$ en fonction du temps, correspondant à 3 expériences indépendantes. Les dates des expériences Figurent dans la légende. Chaque point correspond à une moyenne prise sur les points expérimentaux, et les barres d'erreur sont égales à la déviation standard de ces points. Les barres d'erreur étant semblables pour les trois expériences, nous en avons fait figurer seulement pour une seule courbe.

La Figure 79D montre une moyenne de $(I_{\max}-I_{\min})$ en fonction du temps (points bleus), correspondant à la moyenne des trois expériences de la Figure 79C. On constate que cette courbe atteint bien un plateau aux temps longs. La courbe orange correspond à un ajustement exponentiel de la forme $a(1-\exp(-t/\tau))$, avec τ le temps caractéristique. L'ajustement donne un temps caractéristique $\tau = 7,6 \pm 0,9$ min. Les points jaunes correspondent aux moyennes de $(I_{\max}-I_{\min})$ dans le cas des gouttes BSA de la Figure 79B.

4.2) Cas du *spinning disk*

La Figure 80 montre les résultats de l'analyse des « pics » dans le cas de gouttes $F(ab')_2$ (A) et dans le cas de gouttes BSA (B). L'observation a été faite au microscope optique. Dans chaque cas, la quantité $I_{\max}-I_{\min}$ est tracée en fonction du temps. Il y a en tout $N = 9$ gouttes analysées pour les gouttes $F(ab')_2$ et $N = 5$ pour les gouttes BSA. Dans le cas des gouttes $F(ab')_2$, les courbes ont pour valeur 0 à $t = 0$ min, puis augmentent jusqu'à des valeurs maximales différentes suivant les gouttes. Dans le cas des gouttes BSA, les courbes restent centrées en 0.

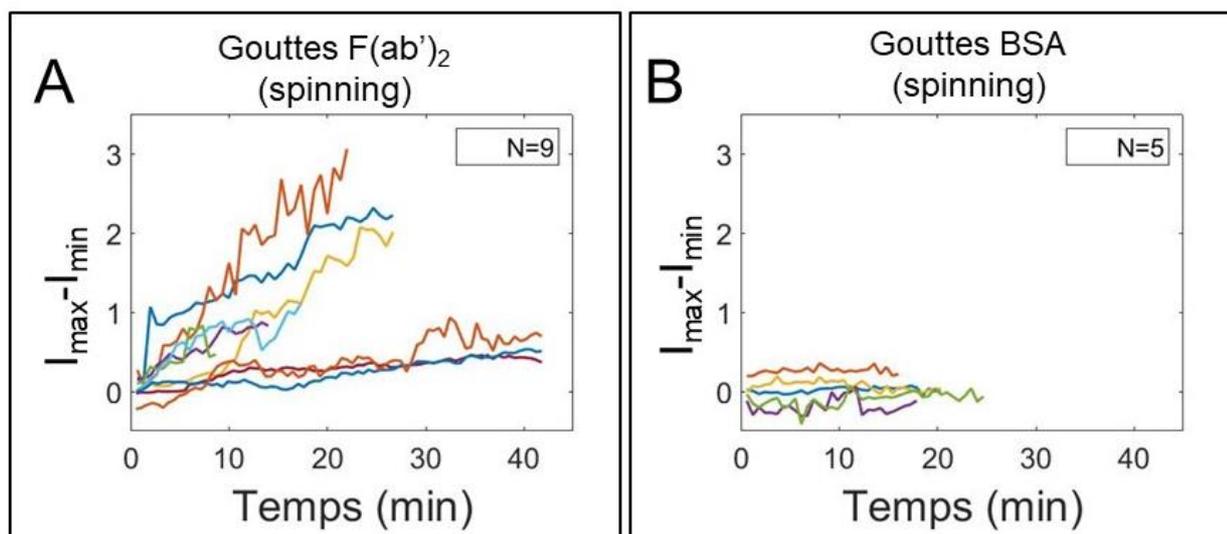


Figure 80. Quantité $I_{\max} - I_{\min}$ tracée en fonction du temps (méthode dite « des pics ») pour des gouttes $F(ab')_2$ (A) et des gouttes BSA (B). L'observation a été faite avec le *spinning disk*. L'analyse est faite pour des cellules B « Wild Type » (sans transfection). Il y a en tout $N = 9$ gouttes analysées pour (A), et $N = 5$ pour (B). Dans le cas des gouttes $F(ab')_2$, les courbes ont pour valeur 0 à $t = 0$ min, puis augmentent jusqu'à des valeurs maximales différentes suivant les gouttes. Dans le cas des gouttes BSA, les courbes restent centrées en 0.

$N=9$ dans le cas des gouttes $F(ab')_2$ peut paraître faible, mais nous avons préféré privilégier les expériences avec les cellules transfectées avec le *spinning disk* (voir la partie sur les cellules « Silencing RNA ») les cellules non-transfectées ayant été déjà étudiées avec le microscope optique.

On constate que la plupart des cinétiques ($I_{\max}-I_{\min}$) de la Figure 80A n'atteignent pas de plateau, contrairement aux cinétiques ($I_{\max}-I_{\min}$) obtenues avec le microscope optique (voir Figure 79). Nous donnons une explication à cela dans la suite (voir la partie Discussion, Figure 99).

5) Résultat des analyses « droite-gauche »

Dans cette partie nous donnons les résultats de la méthode d'analyse dite « droite-gauche ». Les courbes de la différence des sommes d'intensité des parties droite et gauche en fonction du temps sont données sur la Figure 81 pour des gouttes $F(ab')_2$ (A) et des gouttes BSA (B). L'observation est faite au *spinning disk*. Les intensités sont normalisées par le temps d'exposition et la puissance du laser. Pour ces courbes, les cellules sont des « Wild Type » non transfectées. Il y a en tout $N = 9$ courbes, correspondant à $N = 9$ paires goutte-cellule pour la Figure (A), et $N = 8$ paires pour la Figure (B).

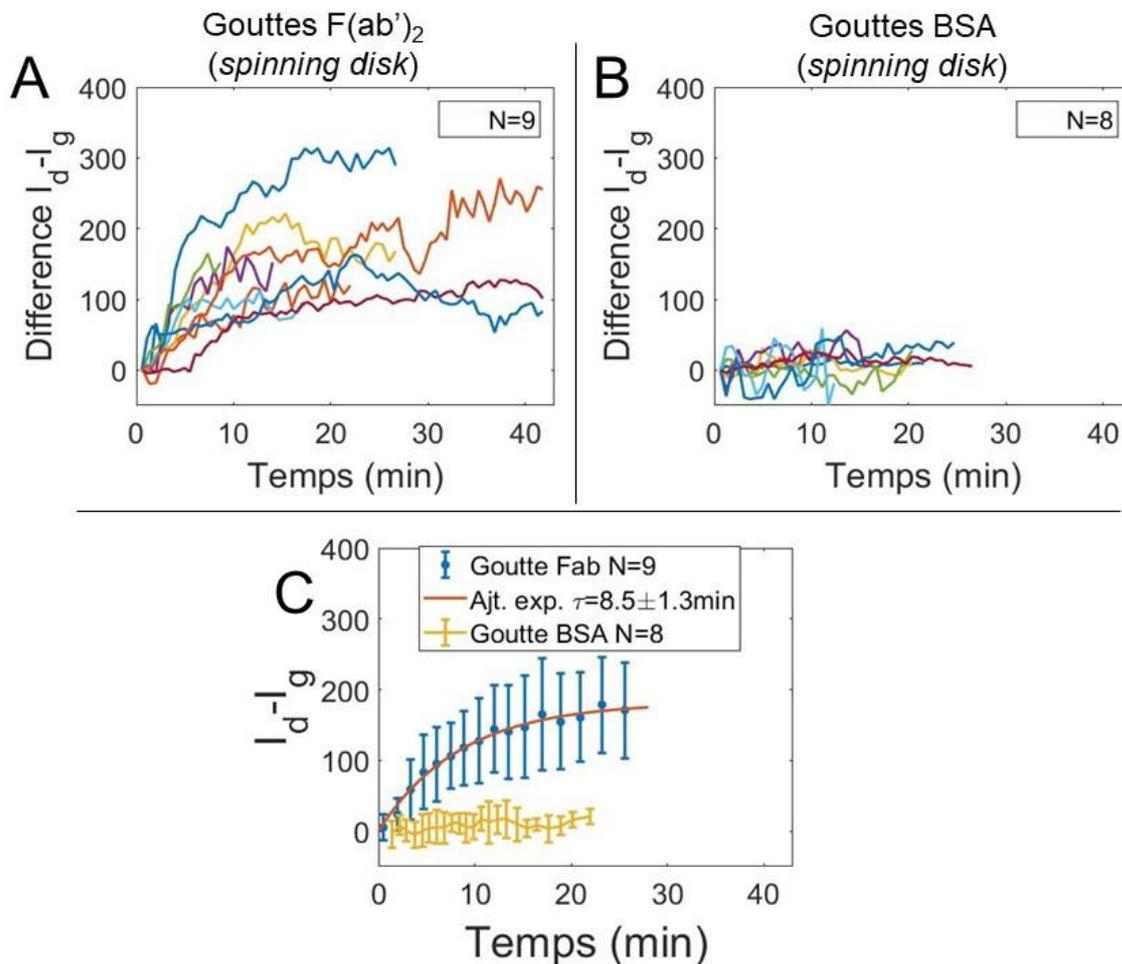


Figure 81. Différence de la somme des intensités de la partie droite et de la partie gauche de la goutte, en fonction du temps (méthode dite « droite-gauche ») pour des gouttes $F(ab')_2$ (A) et des gouttes BSA (B). Les intensités sont normalisées par le temps d'exposition et la puissance du laser. L'analyse est faite pour des cellules B « Wild Type » (sans transfection). Il y a en tout $N = 9$ gouttes analysées pour (A), et $N = 8$ pour (B). Dans le cas des gouttes $F(ab')_2$, les courbes augmentent jusqu'à l'atteinte d'un plateau. La valeur de ce plateau peut varier d'un facteur trois suivant la goutte analysée. Dans le cas des gouttes BSA, les courbes restent centrées en 0. (C) Moyennes des $(I_d - I_g)$ pour les gouttes $F(ab')_2$ (points bleus) et les gouttes BSA (courbe jaune). Les barres d'erreur sont égales à la variation standard. La courbe orange est un ajustement exponentiel du type $a*(1-\exp(-t/\tau))$ avec $\tau = 8,5 \pm 1,3 \text{ min}$ et $a = 180 \pm 10$.

Pour les gouttes $F(ab')_2$, on constate une tendance générale correspondant à une augmentation de la différence à partir de 0 jusqu'à l'atteinte d'un plateau. L'atteinte d'un plateau correspond à une saturation du nombre d'anticorps $F(ab')_2$ recrutés au contact goutte-cellule. Notons que, suivant les courbes, le plateau peut varier jusqu'à un facteur 3.

Pour les gouttes BSA, les courbes restent centrées en 0, montrant qu'il n'y a pas de recrutement au contact goutte-cellule.

La Figure 81C montre une moyenne des courbes ($I_d - I_g$) en fonction du temps, dans le cas des gouttes $F(ab')_2$ (points bleus), et dans le cas des gouttes BSA (points jaunes). Dans le cas des gouttes $F(ab')_2$, on obtient bien un plateau aux temps longs. La courbe orange correspond à un ajustement de type exponentiel de la forme $a(1 - \exp(-t/\tau))$, avec τ le temps caractéristique. L'ajustement donne un temps caractéristique $\tau = 8,5 \pm 1,3$ min.

6) Paramètres d'intérêt

Nous avons réalisé des expériences avec deux types d'appareil : un microscope optique et un *spinning disk*. Deux méthodes d'analyse sont proposées : la méthode dite des pics et celle dite « droite-gauche ». Nous avons appliqué la première aux expériences faites avec le microscope optique, et les deux méthodes pour les expériences faites avec le *spinning*. Les courbes atteignent un plateau dans le cas de la méthode des pics au microscope, et dans le cas de la méthode « droite-gauche » au *spinning*. Notons que nous n'observons pas de plateau dans le cas de la méthode des pics avec le *spinning*. Nous verrons dans la suite que cela est associé à une diminution de la taille du patch.

Nous avons vu que les courbes de ($I_d - I_g$) pour le *spinning*, et de ($I_{\max} - I_{\min}$) pour le microscope optique, pouvaient être ajustées par une courbe de type exponentiel, avec comme paramètres un plateau et un temps caractéristique. Nous nous proposons dans la suite d'étudier la dépendance de ces paramètres avec deux autres paramètres propres à la goutte : 1) la fluorescence initiale (proportionnelle au nombre de $F(ab')_2$ initial sur la goutte) ; 2) le diamètre de la goutte.

6.1) Dépendances des paramètres des courbes de la méthode des pics (microscope optique)

Dans cette partie, nous étudions la dépendance du temps caractéristique et du plateau des courbes de ($I_{\max} - I_{\min}$) obtenues avec le microscope optique, avec deux paramètres : la fluorescence initiale de la goutte, et son diamètre.

La Figure 82 montre les nuages de points obtenus. Le plateau est tracé en fonction de I_{\min} , l'intensité du bord de la goutte qui n'est pas en contact avec la cellule (Figure 82A), et en fonction du diamètre de la goutte (Figure 82B). Le temps caractéristique est tracé en fonction de I_{\min} (Figure 82C) et en fonction du diamètre de la goutte (Figure 82D).

On ne remarque pas de dépendance particulière pour les courbes (B), (C) et (D). On observe que le plateau reste relativement constant en fonction de I_{\min} (A). Dans la suite, on se propose de confirmer cela par une analyse plus poussée.

Microscope optique – Goutte $F(ab')_2$ – Cellules WT

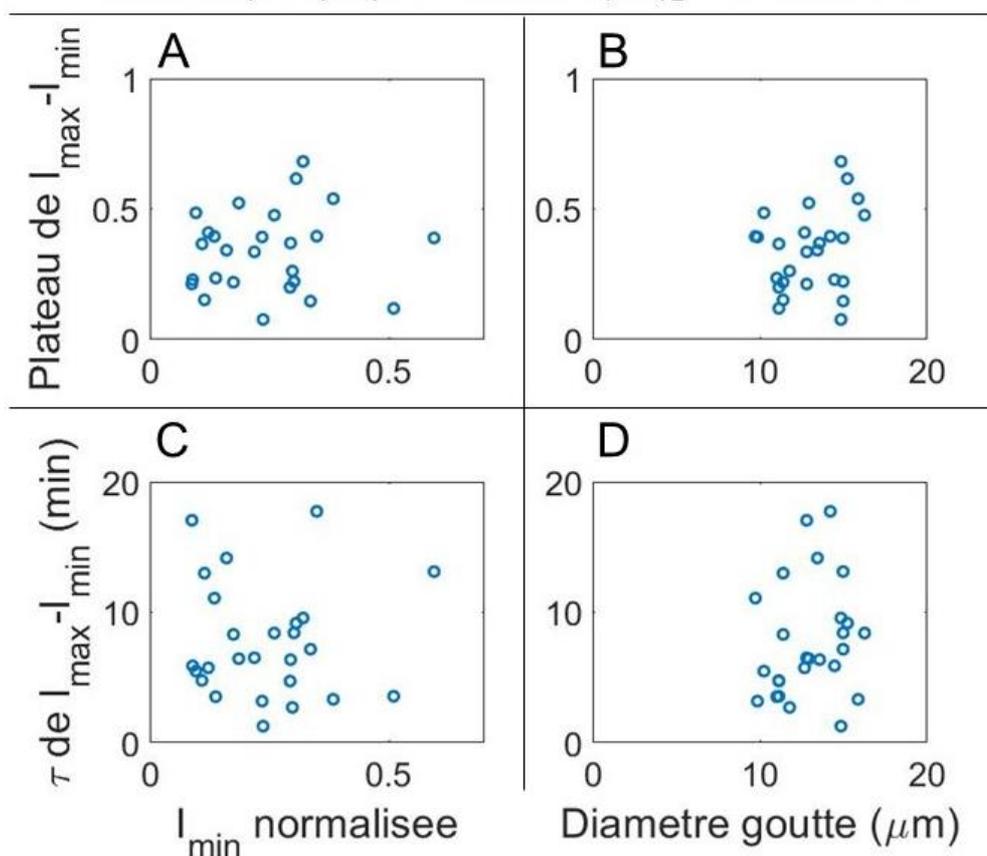


Figure 82. Evolution du plateau de $(I_{\max} - I_{\min})$ (première ligne) et du temps caractéristique τ de $(I_{\max} - I_{\min})$ (deuxième ligne) en fonction de I_{\min} normalisée par le temps d'exposition et la puissance de la diode (colonne de gauche), et en fonction du diamètre de la goutte (colonne de droite). Les expériences ont été faites au microscope optique, avec des gouttes $F(ab')_2$ et des cellules de type « Wild Type » (WT).

6.2) Influence de la fluorescence de départ de la goutte sur $(I_{\max} - I_{\min})$ (microscope optique)

On se propose ici d'étudier la dépendance du plateau de $(I_{\max} - I_{\min})$ en fonction de I_{\min} (Figure 82A), l'intensité du bord de la goutte qui n'est pas en contact avec la cellule. On suppose que cette intensité représente la concentration initiale en $F(ab')_2$ sur la goutte.

La Figure 83A(i) montre I_{\max} , l'intensité finale du patch en fonction de I_{\min} . Les points expérimentaux sont ajustés par une droite affine de type $(ax+b)$. La Figure 83B(i) montre le plateau de la quantité $(I_{\max} - I_{\min})$ en fonction de I_{\min} (même courbe que la Figure 82A). Les points expérimentaux sont ajustés par une droite affine de type $(ax+b)$. Enfin, la Figure 83C montre la valeur finale de la quantité $(I_{\max}/I_{\min} - 1)$ en fonction de I_{\min} .

Les courbes de la deuxième ligne (ii) correspondent aux moyennes des courbes de la première ligne (i). Les ajustements sont du même type mais sont réalisés à partir des moyennes. La quantité $(I_{\max}/I_{\min} - 1)$ est ajustée par une courbe de type $(a/x+b)$. Chaque moyenne est calculée à partir de 8 points expérimentaux, et les barres d'erreur correspondent aux variations standards associées.

Microscope optique – Goutte $F(ab')_2$ – Cellules WT

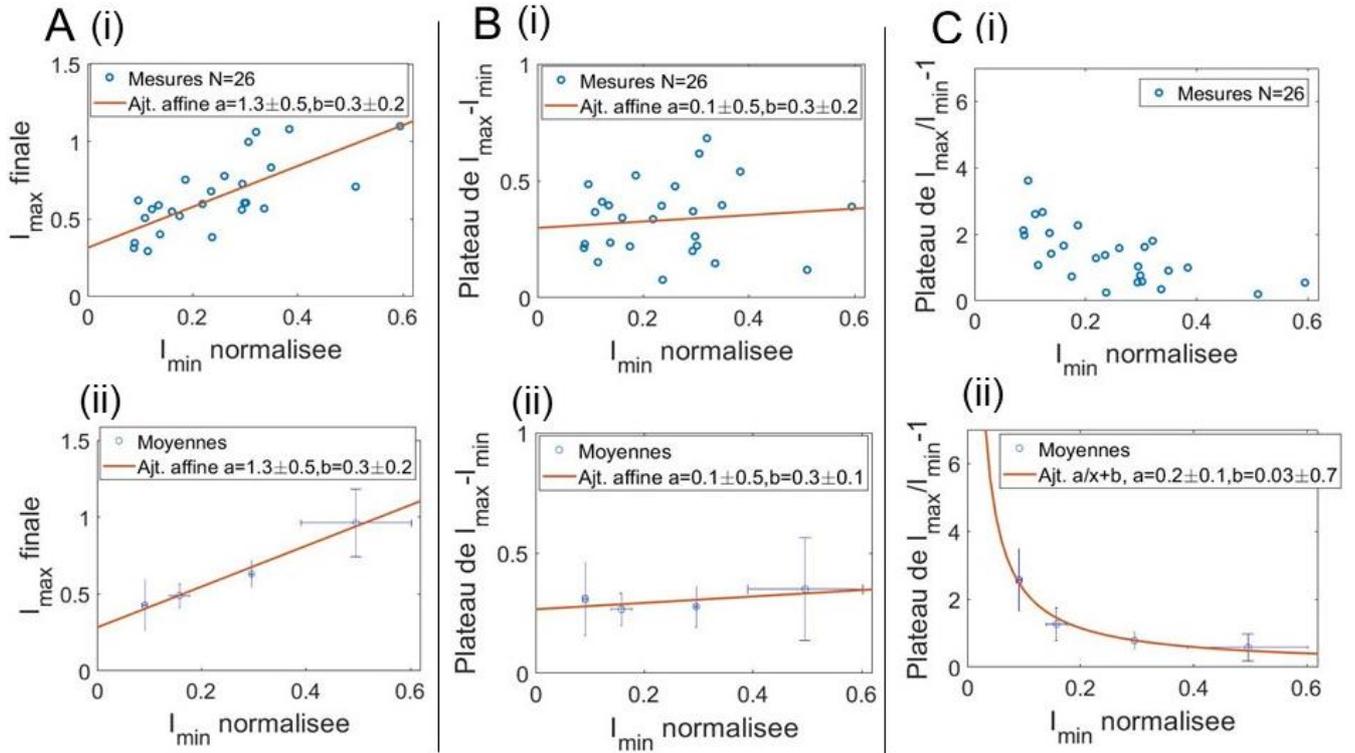


Figure 83. Influence de la fluorescence de départ (I_{\min}) de la goutte $F(ab')_2$ sur la fluorescence finale du patch (I_{\max}) et le plateau de $I_{\max}-I_{\min}$, à partir de la méthode dite “des pics” appliquée aux mesures faites au microscope optique. Les courbes de la première ligne correspondent aux mesures, tandis que les courbes de la deuxième ligne à des moyennes pour lesquelles chaque point correspond à une moyenne de 8 points expérimentaux, et les barres d’erreur correspondent à la variation standard de ces 8 points. Les ajustements sont faits soit directement à partir des points expérimentaux (première ligne), soit à partir des moyennes (deuxième ligne). (A) I_{\max} en fonction de I_{\min} . Les courbes oranges correspondent à un ajustement affine du type $(a \cdot x + b)$. Les valeurs de a et b sont indiquées dans la légende. (B) Plateau de $(I_{\max}-I_{\min})$ en fonction de I_{\min} . Les courbes oranges correspondent à un ajustement affine du type $(a \cdot x + b)$. (C) Plateau de $(I_{\max}-I_{\min})/I_{\min}^{-1}$ en fonction de I_{\min} . La courbe orange correspond à un ajustement du type $(a/x+b)$.

On constate que I_{\max} varie avec I_{\min} suivant une relation affine, de pente $1,3 \pm 0,5$. Le plateau de $(I_{\max}-I_{\min})$ reste constant en moyenne en fonction de I_{\min} , avec une relation affine de pente $0,1 \pm 0,5$. Le fait que $(I_{\max}-I_{\min})$ reste constant est confirmé par le fait que l’ajustement de type $(a/x+b)$ de $(I_{\max}/I_{\min}-1)=(I_{\max}-I_{\min})/I_{\min}$ en fonction de I_{\min} donne un b très proche de 0 ($b = 0,03 \pm 0,7$).

6.3) Influence de la fluorescence de départ de la goutte sur (I_d-I_g) (*spinning disk*)

De la même manière que pour $(I_{\max}-I_{\min})$ dans le cas du microscope optique, nous cherchons à présent la dépendance de (I_d-I_g) en fonction de I_{\min} , dans le cas des mesures faites avec le *spinning disk*.

La Figure 84A montre le plateau de $(I_d - I_g)$ dans le cas du *spinning disk* en fonction de I_{min} (points bleus). La courbe en orange est un ajustement affine de la forme $(ax+b)$. La Figure 84B montre les moyennes des valeurs de $(I_d - I_g)$ en fonction de I_{min} . Chaque point correspond à une moyenne de 4 points expérimentaux, et les barres d'erreurs correspondent aux variations standards associées. La courbe en orange correspond à un ajustement des valeurs des moyennes de la forme $(ax+b)$. On constate que la pente de la droite est très proche de 0 ($a = -16 \pm 200$), indiquant que la quantité $(I_d - I_g)$ reste constante en fonction de I_{min} , de la même manière que la quantité $(I_{max} - I_{min})$ dans le cas du microscope optique.

Spinning disk – Goutte $F(ab')_2$ – Cellules WT

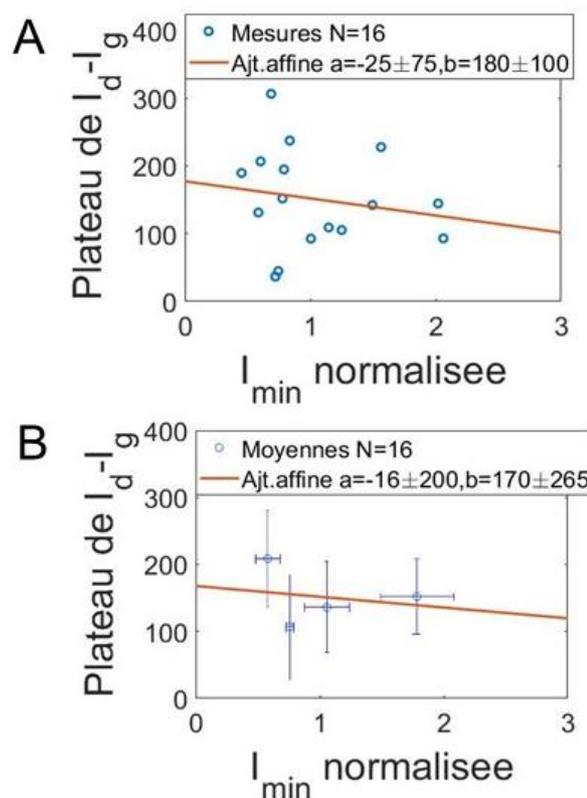


Figure 84. Plateau de $(I_d - I_g)$ obtenu par la méthode droite-gauche avec le *spinning disk*, en fonction de la fluorescence initiale de la goutte I_{min} , normalisée par le temps d'exposition et par la puissance de la source lumineuse. (A) Les ronds bleus correspondent aux mesures expérimentales et la droite à un ajustement par une droite affine de la forme $(a*x+b)$. Les paramètres de l'ajustement sont indiqués dans la légende. (B) Moyennes des mesures de (A) et ajustement de ces moyennes par une droite affine de la forme $(a*x+b)$. Chaque moyenne est calculée à partir de 4 points et les barres d'erreur correspondent aux variations standards associées.

7) Cinétiques de $(I_{max} - I_{min})$ et de $(I_d - I_g)$ normées (microscope optique – *spinning disk*)

Il est intéressant de connaître l'évolution générale des quantités $(I_d - I_g)$ et $(I_{max} - I_{min})$ en fonction du temps. En effet, des temps caractéristiques peuvent être tirées, ou plus simplement on peut savoir si une courbe atteint ou pas un plateau à un temps donné. De manière à obtenir cette tendance générale, nous avons normé chaque cinétique correspondant à un type de mesure, puis en avons fait la moyenne.

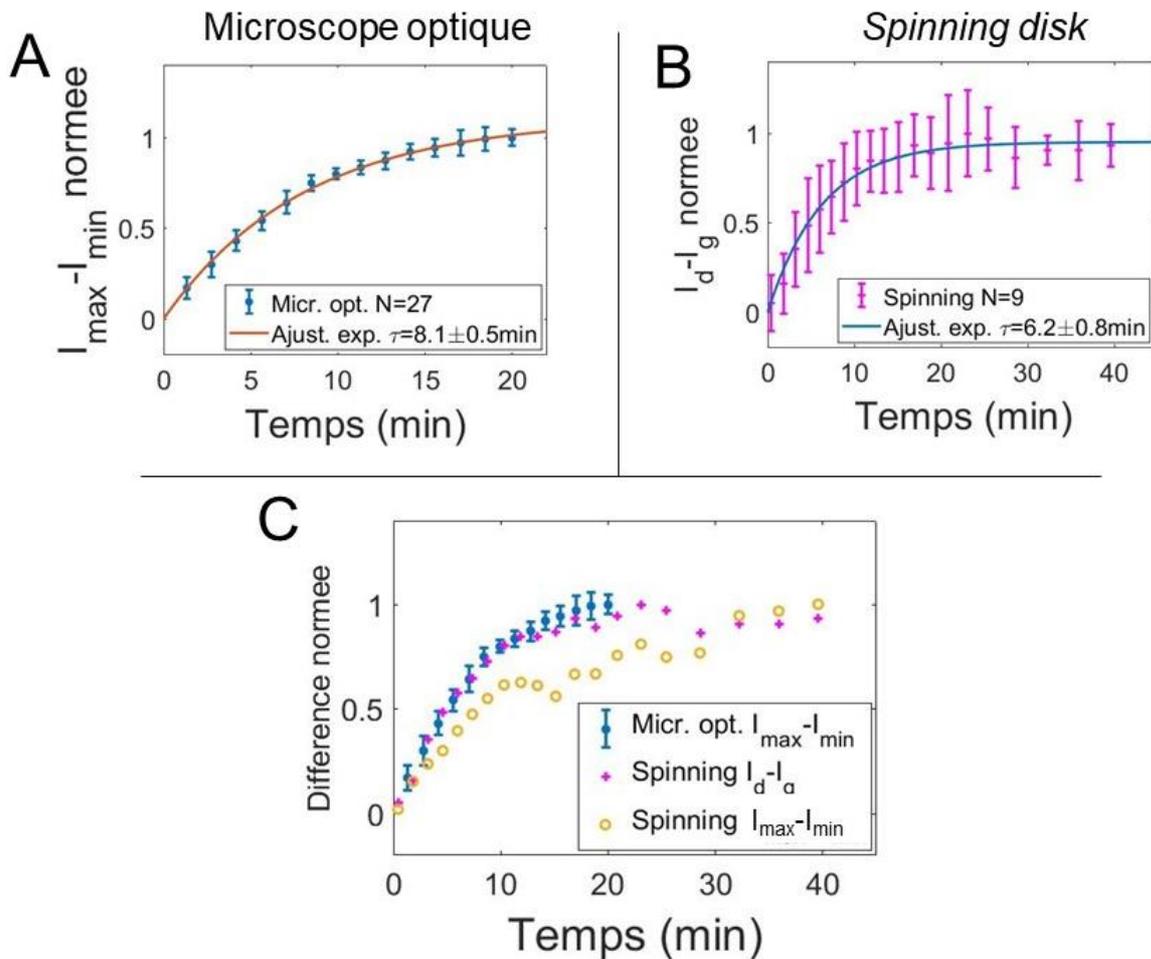


Figure 85. (A) Moyenne des courbes ($I_{\max} - I_{\min}$) normée par la valeur maximum de chaque courbe, dans le cas du microscope optique, et en appliquant la méthode des pics. La courbe orange correspond à un ajustement exponentiel de la forme $a \cdot (1 - \exp(-t/\tau))$ avec $\tau = 8,1 \pm 0,5$ min. (B) Moyenne des courbes ($I_d - I_g$) normées par la valeur maximum de chaque courbe, dans le cas du *spinning*, et en appliquant la méthode droite/gauche. La courbe bleue correspond à un ajustement exponentiel de la forme $a \cdot (1 - \exp(-t/\tau))$ avec $\tau = 7,1 \pm 0,9$ min. (C) Mise sur un même graphique des courbes (A) (en bleu) et (B) (en magenta). Ajout de la moyenne des courbes ($I_{\max} - I_{\min}$) normées, dans le cas du *spinning*, et en appliquant la méthode des pics (ronds jaunes). Pour chaque courbe moyennée, chaque point correspond à une moyenne de 10 points expérimentaux, et les barres d'erreur sont les variations standards associées.

Les Figure 85A et B montrent la moyenne des quantités ($I_{\max} - I_{\min}$) normées en fonction du temps pour les mesures au microscope optique (A), et la moyenne des quantités ($I_d - I_g$) normées en fonction du temps, pour les mesures au *spinning disk*. $N = 27$ couples goutte-cellule B de type « Wild Type » sont analysés pour (A), et $N = 9$ pour (B). Chaque point correspond à une moyenne des points expérimentaux, et les barres d'erreur sont les variations standards associées. Pour (A) et (B), les moyennes sont ajustées par une courbe de type $a(1 - \exp(-t/\tau))$ avec τ le temps caractéristique. Le temps caractéristique obtenu est de $\tau = 8,1 \pm 0,5$ min pour (A), et $\tau = 6,2 \pm 0,8$ min pour (B).

De manière à comparer les courbes de la Figure 85(A) et (B), nous les avons regroupées sur le même graphique (Figure 85C). ($I_{\max} - I_{\min}$) normées en fonction du temps pour les mesures au microscope optique correspond aux points bleus, et ($I_d - I_g$) normées en fonction du temps pour

les mesures au *spinning* correspond aux points magentas. Nous avons ajouté sur le même graphique la moyenne de la quantité $(I_{\max}-I_{\min})$ normée pour le *spinning disk* (ronds jaunes). Les barres d'erreur ne sont pas toujours présentes pour plus de clarté, mais elles sont du même ordre de grandeur que la courbe de la Figure 85B.

On constate que la courbe de $(I_{\max}-I_{\min})$ pour les mesures au microscope optique atteint bien un plateau, tout comme (I_d-I_g) pour les mesures au *spinning disk*. Nous reviendrons sur cette observation dans la partie Discussion.

En revanche, la courbe de $(I_{\max}-I_{\min})$ pour les mesures au *spinning* n'atteint pas de plateau et continue à augmenter aux temps longs. Cette observation a déjà été faite plus haut pour les courbes prises une à une. Ici, nous confirmons cela à partir des courbes moyennées.

Nous verrons dans la suite que le fait que la courbe de $(I_{\max}-I_{\min})$ pour les mesures au *spinning* continue à augmenter, et que la courbe de (I_d-I_g) pour les mesures au *spinning disk* atteigne un plateau implique que la taille du patch diminue aux temps longs.

8) Distribution des temps caractéristiques de $(I_{\max}-I_{\min})$ (microscope optique) et de (I_d-I_g) (*spinning*)

Dans ce paragraphe, nous donnons les caractéristiques des distributions obtenues pour les temps caractéristiques des cinétiques obtenues.

La Figure 86A montre les caractéristiques de la distribution des temps caractéristiques obtenus à partir de $N = 9$ courbes (I_d-I_g) au *spinning disk*. Chaque cinétique (I_d-I_g) est ajustée par une courbe de type $a(1-\exp(-t/\tau))$, comme illustré sur la Figure 77C. Une fois tous les temps caractéristiques obtenus, la boîte à moustache est tracée. Le trait rouge correspond à la médiane de la distribution, et les bords bas et hauts de la boîte à respectivement le premier et troisième quartile. Pour les courbes (I_d-I_g) au *spinning disk*, on obtient une médiane à 5,6 min, et un premier et troisième quartile à respectivement 4,8 et 8,6 min.

En procédant de la même manière pour les cinétiques $(I_{\max}-I_{\min})$ au microscope optique (Figure 86B), on obtient une médiane à 6,5 min, et un premier et troisième quartile à respectivement 4,7 et 10,7 min.

On constate que ces deux distributions se recoupent. Elles sont également en accord avec les temps caractéristiques obtenus par ajustement des courbes normées de la Figure 85.

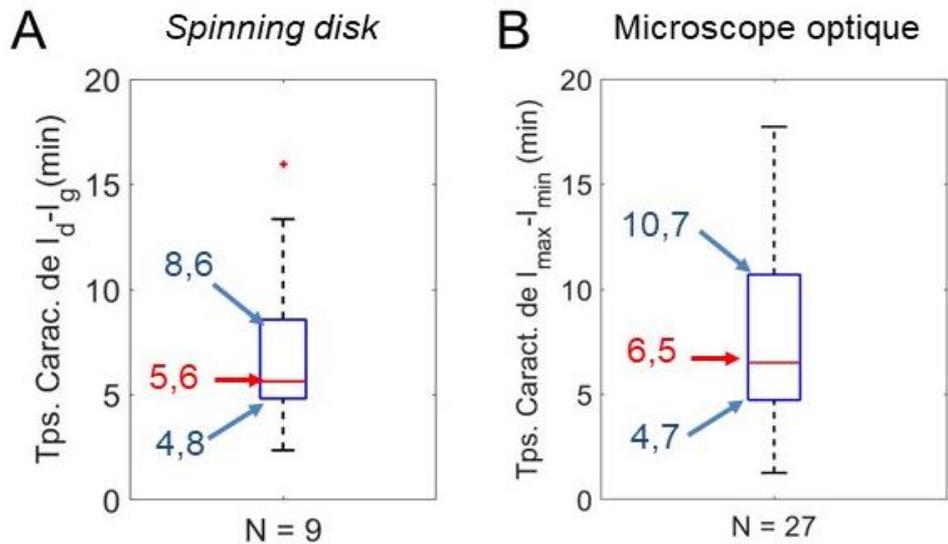


Figure 86. Paramètres des distributions des temps caractéristiques, dans le cas de la méthode droite/gauche avec le *spinning disk* (A), et dans le cas de la méthode des pics avec le microscope optique (B). Les temps caractéristiques sont obtenus par ajustement des courbes par une fonction de la forme $a(1-\exp(-t/\tau))$ avec τ le temps caractéristique. En rouge est indiquée la médiane de la distribution, et en bleu le premier et troisième quartile.

9) Mesures de la taille du patch fluorescent

Un paramètre intéressant à prendre en compte dans l'étude est la longueur du patch fluorescent au cours du temps. En effet, la taille de ce patch nous donne une indication sur la surface de contact d'adhésion de la cellule B sur la goutte. Il a été montré pour des bicouches lipidiques que cette surface de contact augmentait, puis se contractait de manière dynamique [17]. Il nous paraît donc intéressant de voir l'évolution de cette surface pour des gouttes fonctionnalisées. Nous présentons d'abord une méthode de mesure directe de la longueur du patch, puis nous montrons qu'il est possible de calculer cette longueur à partir des mesures d'intensité de fluorescence présentées plus haut.

9.1) Mesure directe

De manière à mesurer directement cette longueur de patch, nous avons adopté une méthode consistant à « déplier » la goutte fictivement de manière à obtenir une ligne droite fluorescente au lieu d'une sphère, ce qui facilite ensuite la mesure de longueur.

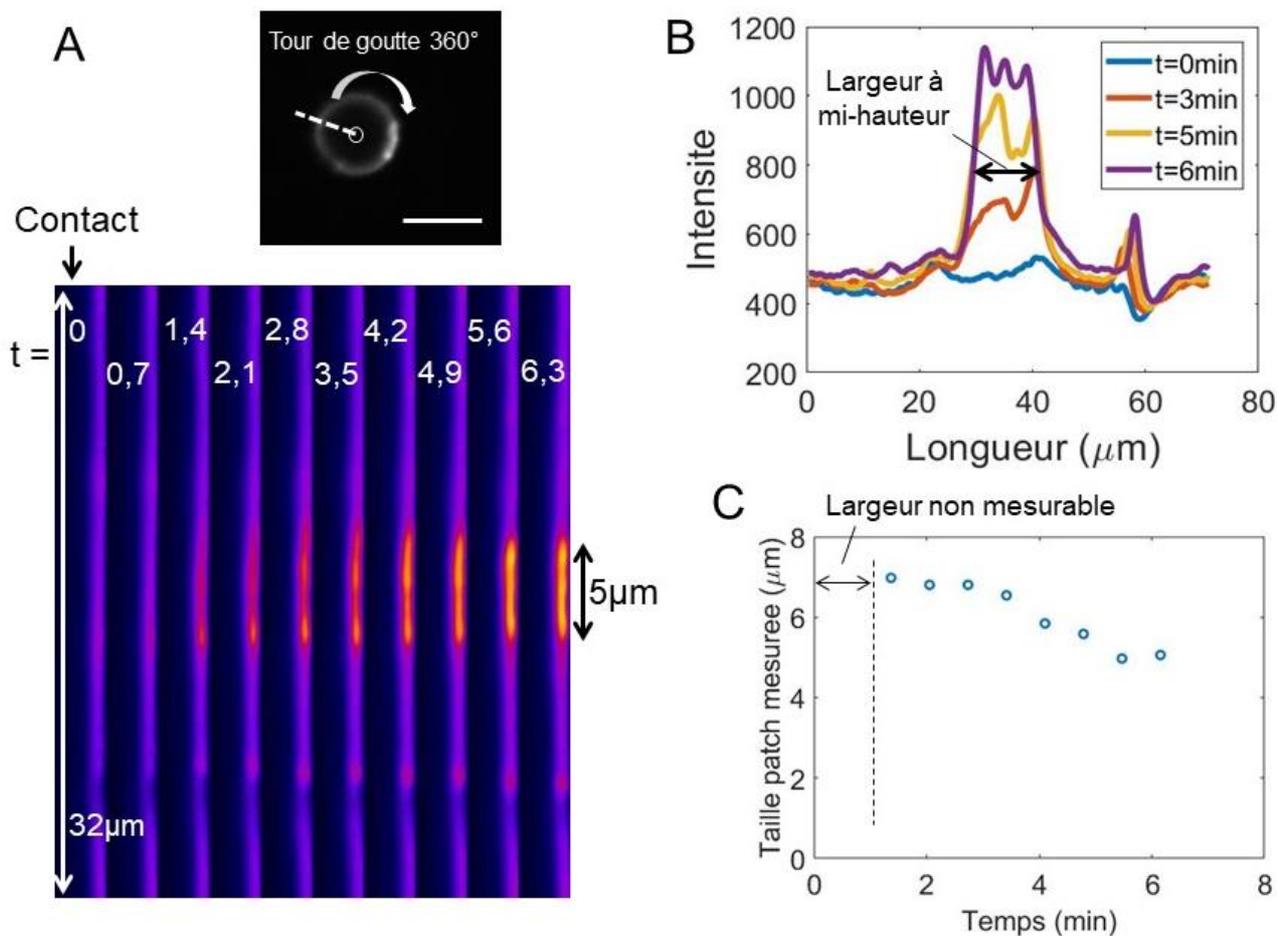


Figure 87. (A) Kymographe des $F(ab')_2$ présents à l'interface de la goutte en contact avec une cellule B. En haut, principe de construction du kymographe : l'intensité est mesurée selon la ligne en pointillé tournant autour du rond central. Ce « dépliement » est réalisé pour chaque temps, puis les images obtenues sont disposées les unes à côté des autres (image du bas). Les chiffres en haut correspondent au temps en minutes. (B) Profils en intensité mesurés selon l'interface huile/eau des kymographes. (C) Largeur à mi-hauteur du patch mesurée à partir des profils d'intensité du kymographe. La largeur du patch n'est pas mesurable dans la première minute de contact.

La Figure 87A montre une image en fluorescence typique d'une goutte en contact avec une cellule B. La ligne en pointillée tourne autour du cercle au centre de la goutte, et l'intensité est enregistrée le long de cette ligne. Cette mesure est réalisée pour chaque temps, et un kymographe est finalement obtenu (Figure 87A, en bas). Le temps est indiqué en minutes. Nous avons corrigé la dilatation des longueurs due à la rotation de la ligne lors de la mesure. La Figure 87B montre le profil en intensité le long de la ligne fluorescente pour différents temps. A partir de ces profils, la largeur à mi-hauteur du patch est mesurée pour chaque temps. La Figure 87C montre cette largeur à mi-hauteur en fonction du temps. On constate que la taille du patch a tendance à décroître au cours du temps, cela étant éventuellement dû à une contraction de la membrane cellulaire en contact avec la goutte. On constate également que la largeur du patch ne peut pas être mesurée durant la première minute après contact, car la fluorescence du patch aux premiers instants de contact est trop faible. Nous allons voir dans la partie suivante qu'il est possible de déduire la largeur du patch à partir des mesures de $(I_d - I_g)$ et de $(I_{max} - I_{min})$, et que cette méthode permet de d'obtenir une largeur de patch aux premiers instants.

9.2) Méthode de calcul de la longueur du patch

La longueur du patch peut être calculée à partir des quantités mesurées ($I_d - I_g$) et de ($I_{max} - I_{min}$). La démarche suivie est indiquée sur la Figure 88. La longueur du patch s'obtient en écrivant d'abord les expressions des intensités intégrées I_d et I_g . I_d (respectivement I_g) correspond à l'intégration des intensités de la partie droite de la goutte (respectivement la partie gauche de la goutte). La position de la séparation entre les deux parties de la goutte correspond au barycentre des intensités entre la droite et la gauche avant contact avec la cellule.

$$I_g = DP \times I_{min}$$

$$I_d = DP \times I_{min} + S \times (I_{max} - I_{min})$$

avec DP le demi-périmètre de la goutte, I_{min} l'intensité de la goutte, I_{max} l'intensité du patch, $S = L \times l$ la surface du patch, avec L sa longueur et l sa largeur. Il vient donc en faisant la différence de ces deux équations :

$$I_d - I_g = S \times (I_{max} - I_{min})$$

On en déduit alors la longueur L du patch :

$$L = \frac{I_d - I_g}{I_{max} - I_{min}} \times \frac{1}{l}$$

La largeur l du patch est mesurée à partir des images en fluorescence de la goutte. La longueur L du patch peut donc être déduite des mesures de $I_d - I_g$ et de $I_{max} - I_{min}$.

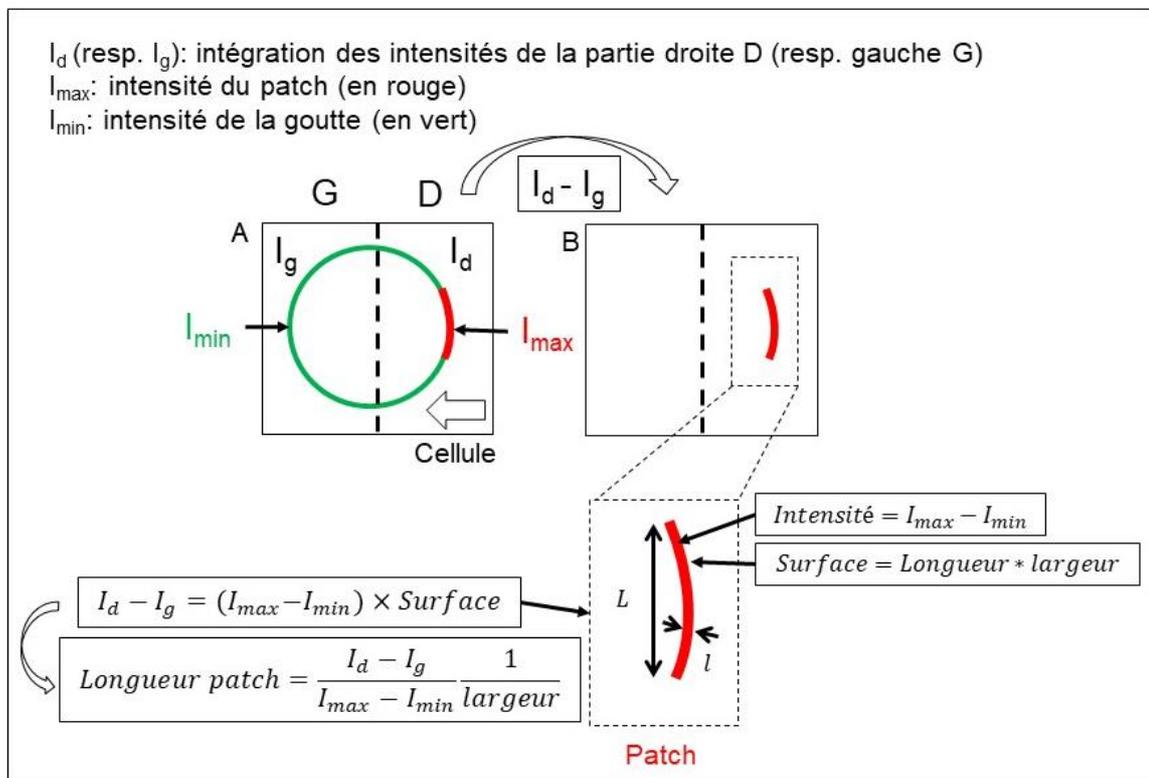


Figure 88. Schéma illustrant la méthode utilisée pour le calcul de la longueur du patch à partir de la différence ($I_d - I_g$) et de la différence ($I_{max} - I_{min}$). La goutte est isolée dans une fenêtre (A), et coupée en deux, de manière à ce que la délimitation soit au niveau du barycentre des intensités avant contact avec la

cellule B. I_d (resp. I_g) est l'intégration des intensités de la partie droite D (resp. gauche G) de la goutte. I_{max} représente l'intensité du patch (en rouge) et I_{min} l'intensité de la goutte (en vert). La première opération consiste à faire la différence des intégrations $I_d - I_g$. On obtient alors l'intégration des intensités au niveau du patch (B). Ce patch a une surface S égale à $S = L \cdot l$ avec L la longueur et l la largeur. L'intégration des intensités au niveau du patch est donc égale à $I_d - I_g = (I_{max} - I_{min}) \times Surface$. La longueur du patch est alors facilement déduite.

9.3) Comparaison du calcul de la taille du patch avec la mesure à mi-hauteur

Nous calculons dans cette partie la longueur du patch et nous validons ce calcul en comparant le résultat à une mesure directe de la longueur du patch. La mesure directe a été présentée plus haut, elle consiste à déplier la goutte et à faire une mesure à mi-hauteur du profil en intensité du patch.

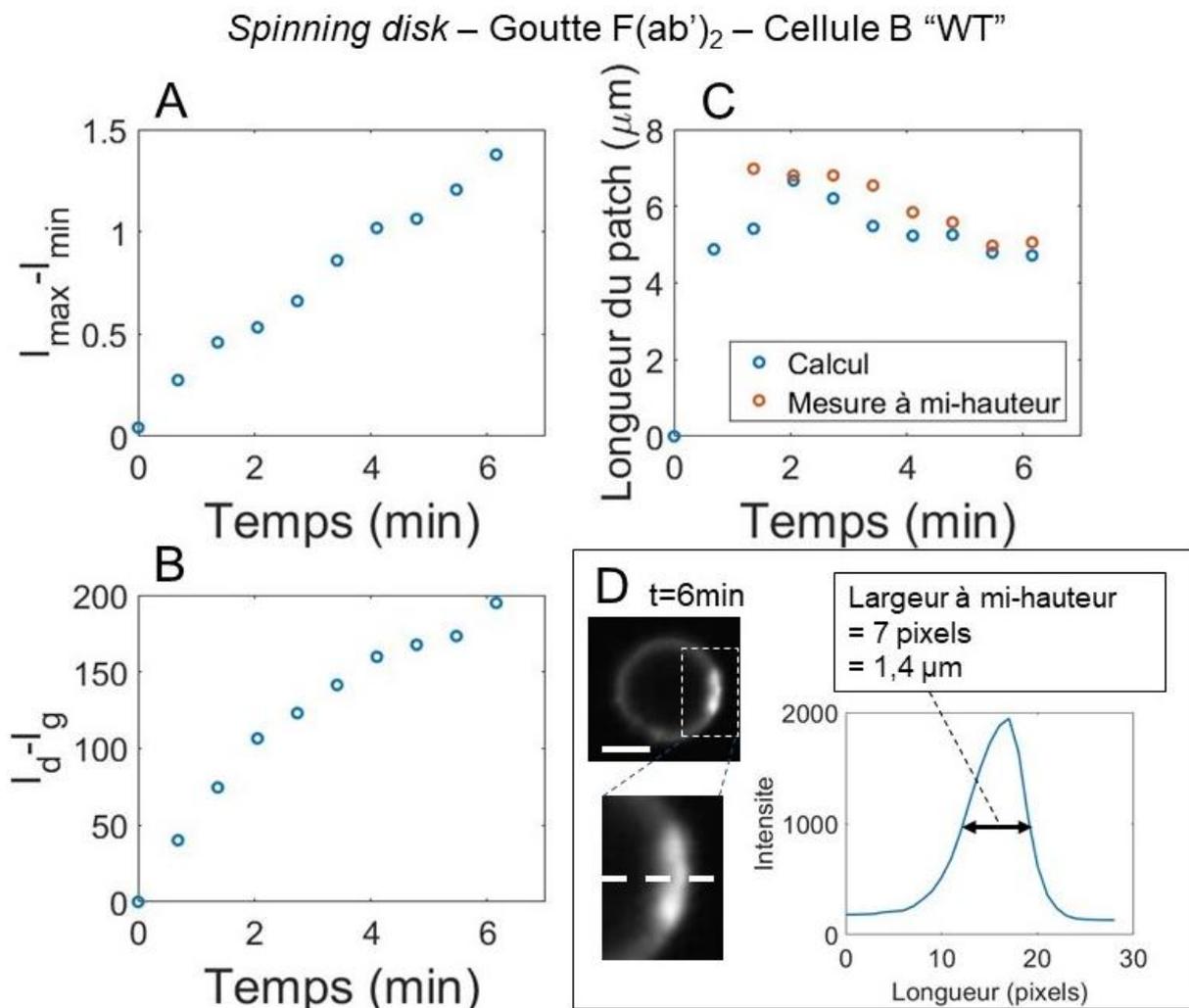


Figure 89. Comparaison de la longueur du patch calculée avec la longueur du patch mesurée, pour une goutte F(ab')₂ et une cellule B de type « Wild Type » (WT). (A) Evolution de $(I_{max} - I_{min})$ en fonction du temps. (B) Evolution de $(I_d - I_g)$ en fonction du temps. (C) Longueur du patch calculée (points bleus) et mesurée (points en orange) en fonction du temps. La largeur prise pour le calcul est de 1,4 μm . (D) Image en fluorescence de la goutte au temps final ($t = 6$ minutes) et zoom du patch. Un profil en intensité est

tracé suivant la ligne blanche pointillée. Le pic obtenu possède une largeur à mi-hauteur de 7 pixels, soit 1,4 μm en tenant compte de l'échelle. Barre d'échelle : 4 μm .

La Figure 89A montre l'évolution de $I_{\text{max}}-I_{\text{min}}$ dans le cas d'un contact goutte $F(\text{ab}')_2$ /cellule B de type « Wild Type » (WT). Les mesures sont faites au *spinning disk*. On constate une évolution assez linéaire. La Figure 89B montre l'évolution en fonction du temps de $I_{\text{d}}-I_{\text{g}}$ pour le même couple goutte-cellule. On constate qu'il y a une évolution vers un plateau, même si les mesures sont arrêtées avant qu'il ne soit réellement atteint. La Figure 89C montre le calcul du patch à partir de $I_{\text{max}}-I_{\text{min}}$ de (A) et de $I_{\text{d}}-I_{\text{g}}$ de (B), en fonction du temps (points bleus). La largeur l du patch a été prise égale à 1,4 μm . La longueur mesurée pour le même couple goutte-cellule correspond aux points en orange. On constate que les deux courbes possèdent la même allure et prennent des valeurs très proches. Nous validons ainsi la méthode du calcul du patch. La Figure 89D montre une image en fluorescence du patch, et un profil en intensité suivant sa largeur. On mesure une largeur à mi-hauteur pour l'intensité de 7 pixels, soit 1,4 μm en tenant compte de l'échelle. Nous avons pris donc cette valeur pour la largeur du patch, ce qui donne une longueur de patch en accord avec celle mesurée directement (voir la Figure 89C).

9.4) Exemples de calculs de longueur de patch

Dans ce paragraphe, nous montrons d'autres exemples de calcul de la taille de la longueur du patch, à partir des quantités mesurées ($I_{\text{d}}-I_{\text{g}}$) et ($I_{\text{max}}-I_{\text{min}}$). L'observation est faite au *spinning disk*.

La Figure 90A montre la quantité ($I_{\text{d}}-I_{\text{g}}$) en fonction du temps pour trois couples goutte $F(\text{ab}')_2$ /cellule B de type « Wild Type ». La Figure 90B montre la quantité ($I_{\text{max}}-I_{\text{min}}$) en fonction du temps pour ces trois mêmes couples goutte-cellule B, chaque couleur correspondant à un couple. Enfin, la Figure 90C montre les longueurs de patch calculées à partir de ($I_{\text{d}}-I_{\text{g}}$) de (A) et ($I_{\text{max}}-I_{\text{min}}$) de (B), les couleurs correspondant à chaque couple goutte-cellule. La largeur du patch pour le calcul a été prise égale à 1,4 μm pour chaque courbe, cette largeur ayant été mesurée sur un patch auparavant (voir Figure 89D). La Figure 90D montre un schéma indiquant la formule utilisée pour le calcul de la longueur du patch et rappelle les notations utilisées.

On observe que les courbes de ($I_{\text{d}}-I_{\text{g}}$) atteignent un plateau, ce qui n'est pas le cas pour la quantité ($I_{\text{max}}-I_{\text{min}}$). Si ($I_{\text{max}}-I_{\text{min}}$) augmente plus rapidement aux temps longs que ($I_{\text{max}}-I_{\text{min}}$), la longueur du patch doit diminuer. C'est ce qu'on observe sur la Figure 90(C) : une légère diminution de la taille du patch aux temps longs.

Spinning disk – Goutte F(ab')₂ – Cellule B “WT”

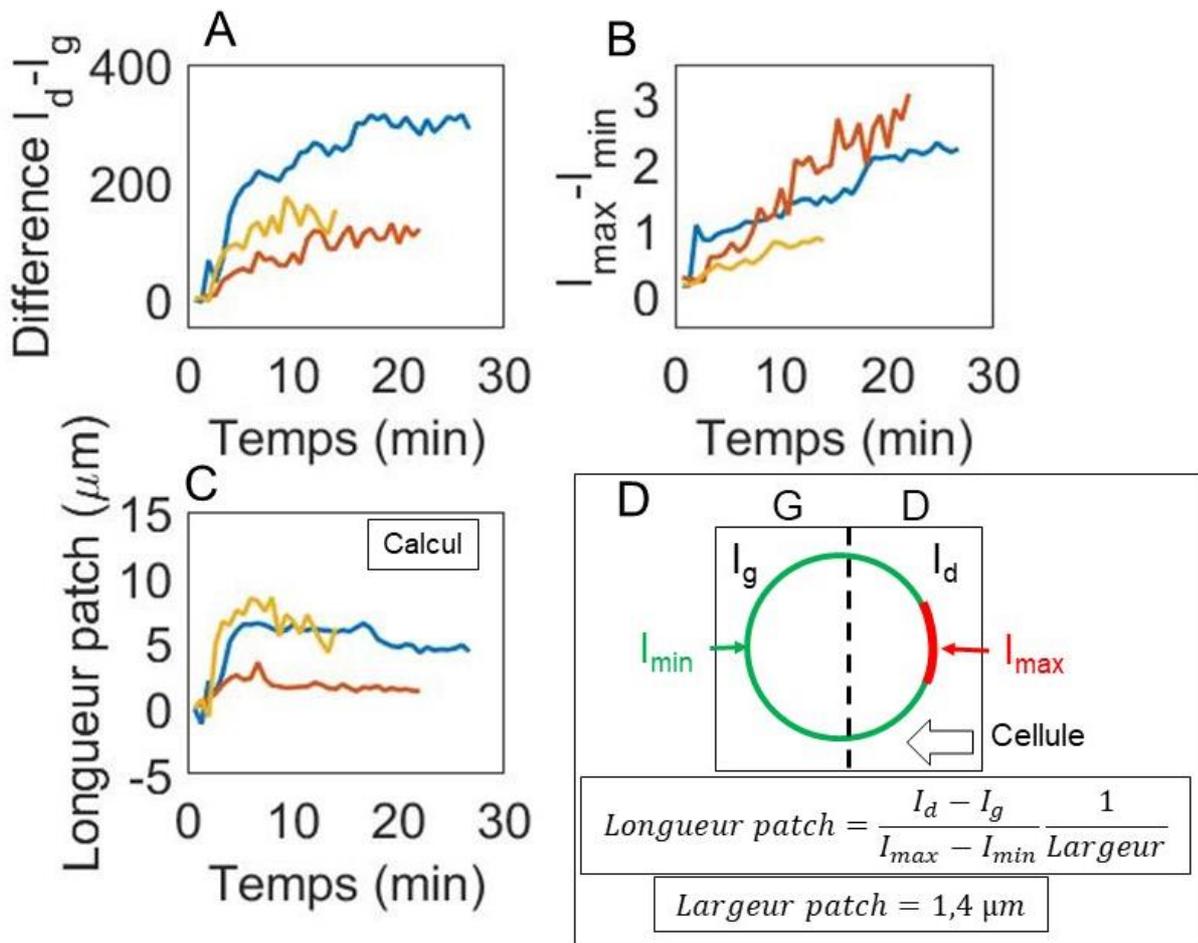


Figure 90. Résultats des expériences au *spinning disk* montrant une diminution de la longueur du patch en fonction du temps. Les gouttes sont F(ab')₂ et les cellules B de type « Wild Type » (WT). (A) Différence ($I_d - I_g$), normalisée par le temps d'exposition et la puissance de la diode, en fonction du temps pour trois couples goutte-cellule B. On constate que les courbes atteignent un plateau. (B) Différence ($I_{max} - I_{min}$), normalisée par le temps d'exposition et la puissance de la diode, en fonction du temps pour les mêmes couples que dans (A). On constate que les courbes n'atteignent pas de plateau. (C) Longueur du patch calculée pour ces trois couples goutte-cellule B. La largeur mesurée prise pour le calcul est de 1,4 μm . (D) Schéma indiquant les notations et la formule utilisée pour le calcul de la taille du patch.

9.5) Moyennes de tailles de patch calculées

De manière à savoir si cette diminution de la taille du patch est présente à chaque contact goutte-cellule B, nous avons moyenné les courbes obtenues. La largeur l du patch a été prise égale à 1,4 μm .

La Figure 91A montre une moyenne de la longueur du patch en fonction du temps, pour $N = 11$ couples goutte-cellule. La Figure 91B montre une moyenne de la longueur du patch, chaque courbe ayant été normée une à une au préalable (avant de faire la moyenne). Pour les Figures (A) et (B), chaque moyenne est calculée à partir de 40 points expérimentaux, et les barres d'erreur correspondent aux variations standards associées.

Spinning disk – Goutte F(ab')₂ – Cellule B “WT”

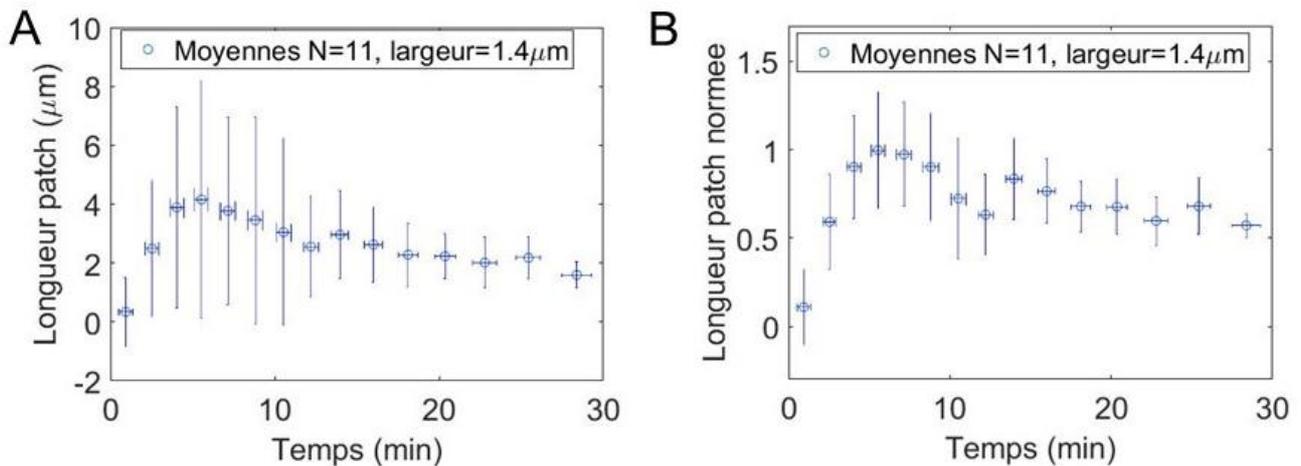


Figure 91. Moyennes des longueurs de patch calculées en fonction du temps, pour des couples goutte F(ab')₂/cellules B « Wild Type » (WT). (A) Longueur calculée en prenant comme largeur de patch 1,4 µm. (B) Moyenne des longueurs normées à un. Chaque point correspond à une moyenne de 40 points expérimentaux, et les barres d'erreur correspondent à la variation standard associée. Il y a en tout 11 couples goutte-cellule B analysées.

On observe bien une rapide augmentation de la longueur du patch, associée aux premiers instants du contact goutte-cellule, puis une légère diminution de cette longueur, que la taille soit normée au préalable ou non. Ceci est en accord avec les observations de Fleire *et al.* [17] qui montrent une augmentation de la surface de contact bicouche lipidique/cellule B, puis une diminution de cette surface liée à une contraction de la part de la membrane cellulaire.

10) Observations du noyau

Nous avons voulu observer le noyau de la cellule B durant le contact entre une goutte F(ab')₂ et une cellule B. Pour cela, nous avons utilisé du Hoechst, qui permet de marquer le noyau dans « le bleu ». Avant de réaliser l'expérience, les cellules sont incubées environ 30 minutes à 37°C dans leur milieu contenant 1 µg/mL de Hoechst. Le milieu est changé avec du milieu neuf par centrifugation des cellules B (800 rpm pendant 4 minutes), avant injection dans les pièges suivant le protocole décrit plus haut.

La Figure 92A montre les images en fluorescence des cellules B en contact avec les gouttes F(ab')₂ environ 10 minutes après contact. Le Hoechst est visible avec le filtre DAPI. On observe que le marquage du noyau est efficace pour la plupart des cellules. On observe comme précédemment l'apparition du patch en F(ab')₂ pour toutes les gouttes en contact avec des cellules B. La Figure 92B correspond à un zoom sur un couple goutte F(ab')₂/cellule B dont le noyau a été marqué par du Hoechst.

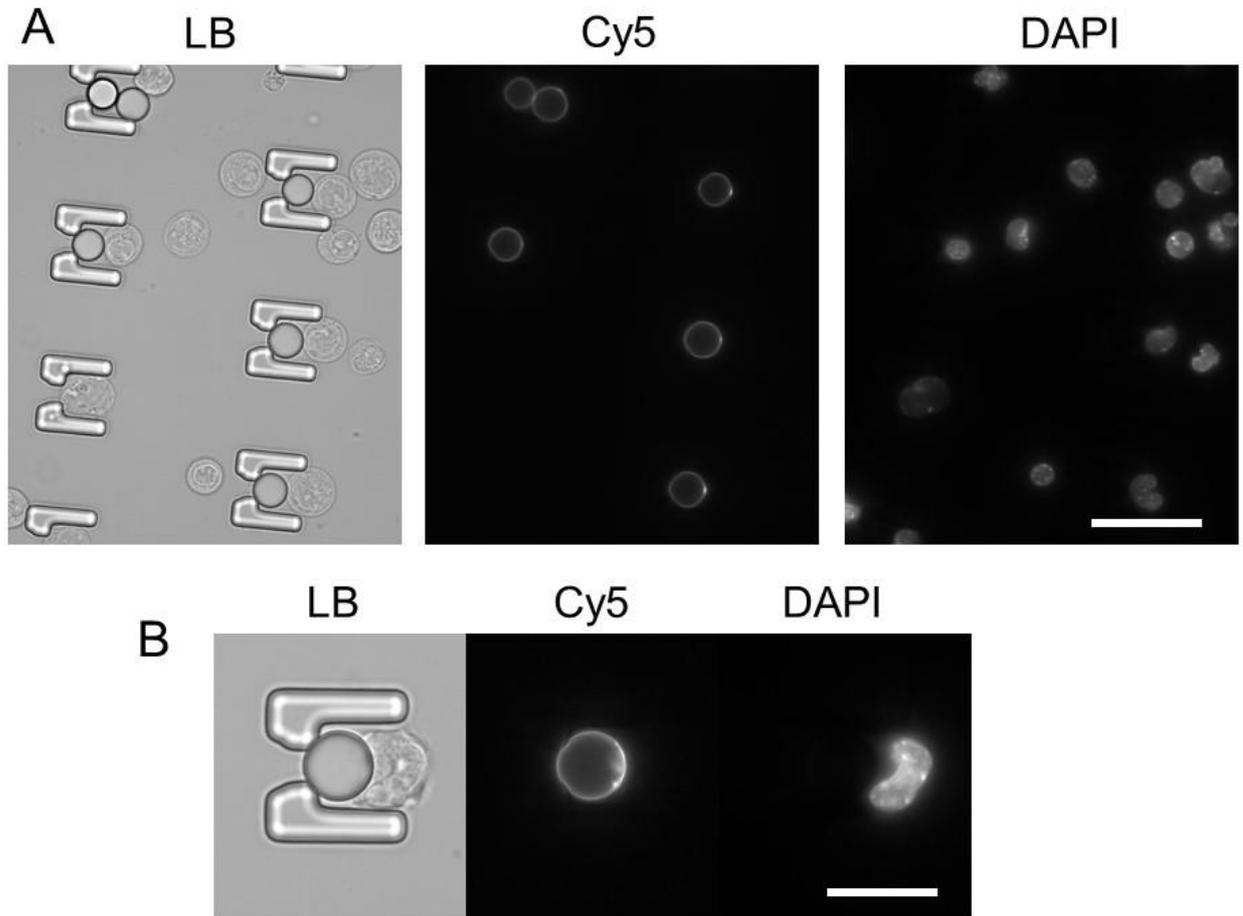


Figure 92. Image globale (A) et zoom sur un piège (B) de cellule B marquées au Hoechst en contact avec des gouttes $F(ab')_2$. Le Hoechst permet de visualiser le noyau avec le filtre DAPI. Les images sont prises au microscope optique à fluorescence. La concentration en Hoechst finale dans le milieu cellulaire est de $1 \mu\text{g}/\text{mL}$. On constate que le marquage est efficace pour la majorité des cellules, et la formation systématique du patch en $F(ab')_2$ au contact goutte-cellule. Les images sont prises une dizaine de minutes après contact entre les gouttes et les cellules B. Barre d'échelle de (A) : $50 \mu\text{m}$, barre de (B) : $20 \mu\text{m}$.

11) Polarisation du lysosome

La polarisation des lysosomes a été observée dans le cas de contacts cellule B/bille de polystyrène [26]. Nous avons marqué les lysosomes des cellules B par transfection (voir le protocole expérimental indiqué plus haut), de manière à suivre son évolution au cours du temps après contact avec la goutte fonctionnalisée par des $F(ab')_2$. Les manipulations de transfection des cellules B ont été réalisées par Pablo Saez de l'institut Curie, et nous le remercions.

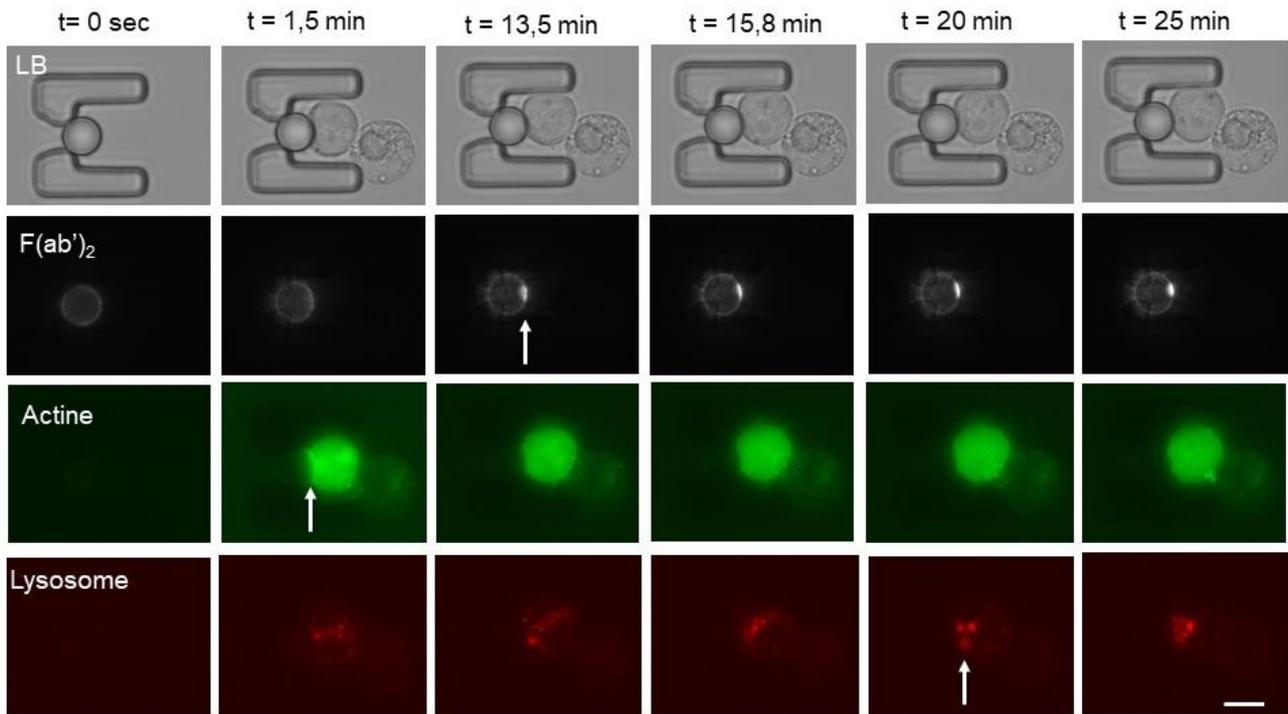


Figure 93. Séquence d'images montrant la polarisation des lysosomes de la cellule B suite au contact avec une goutte $F(ab')_2$. Les images sont prises au microscope optique à fluorescence. Les lysosomes sont marqués en rouge (dernière ligne) et la streptavidine apparaît en blanc (deuxième ligne). Le patch en $F(ab')_2$ dans la zone de contact apparaît au bout de 10 minutes. La polarisation des lysosomes apparaît au bout de 15 minutes. Les polarisations en $F(ab')_2$ et en lysosomes restent stables ensuite. On constate également une accumulation en actine (marquée en vert) dans la zone de contact aux premiers instants.

La Figure 93 montre une séquence d'images prises au microscope optique à épifluorescence montrant une goutte $F(ab')_2$ en contact avec une cellule B transfectée. Les anticorps $F(ab')_2$ apparaissent sur la deuxième ligne et les lysosomes sur la dernière ligne (en rouge). On constate une polarisation des $F(ab')_2$ sur la goutte au bout de 10 minutes, et une polarisation des lysosomes au bout de 15 minutes. En effet, on voit que les lysosomes se concentrent vers la zone de contact avec la goutte.

Le pourcentage de réussite de transfection étant faible (autour de 20 %), il n'a pas été possible d'obtenir un grand nombre de couples cellules B fluorescentes/goutte. Néanmoins, sur 4 couples cellules B/goutte obtenus, cette polarisation du lysosome a été observée à chaque fois. A ce stade de l'étude, en tenant compte du taux de réussite des transfusions sur les cellules B, on se rend compte de l'importance de l'efficacité des pièges pour obtenir des couples cellule/goutte.

Cette observation de la polarisation du lysosome est une indication de la formation de la synapse immunologique chez la cellule B. On voit donc ici que le contact avec une goutte fonctionnalisée par des anticorps peut induire une réponse de la part de la cellule B.

Notons enfin une accumulation en actine (en vert sur la Figure 93) dans la zone de contact aux premiers instants (flèche blanche).

12) Influence de la myosine 1E et 1C dans le recrutement

Des études ont montré que la myosine de classe I avait un rôle dans la formation de la synapse et l'extraction d'antigènes [37][35]. Nous nous proposons ici d'étudier l'influence des myosines 1C et 1E dans la reconnaissance de la goutte fonctionnalisée. Dans un premier temps, nous marquons en fluorescence la myosine 1E et la myosine 1C présentes chez les cellules B, et nous observons l'évolution de la fluorescence au *spinning disk*. Dans un deuxième temps, nous étudions l'influence de la myosine 1E et de la myosine 1C dans la cinétique de recrutement des anticorps à surface de la goutte.

12.1) Observations en fluorescence

Maravillas-Montero *et al.* [71] ont observé une accumulation de myosine 1C au niveau de la synapse immunologique dans le cas d'un contact cellule B/surface de verre recouverte d'antigènes. De manière à savoir si ce phénomène d'accumulation est présent également dans le cas d'un contact cellule B/goutte fonctionnalisée, nous avons marqué la myosine 1E et la myosine 1C dans les cellules B. Ce marquage par transfection a été réalisé par Pablo Saez de l'Institut Curie et nous le remercions. Le principe de la transfection est indiqué plus haut.

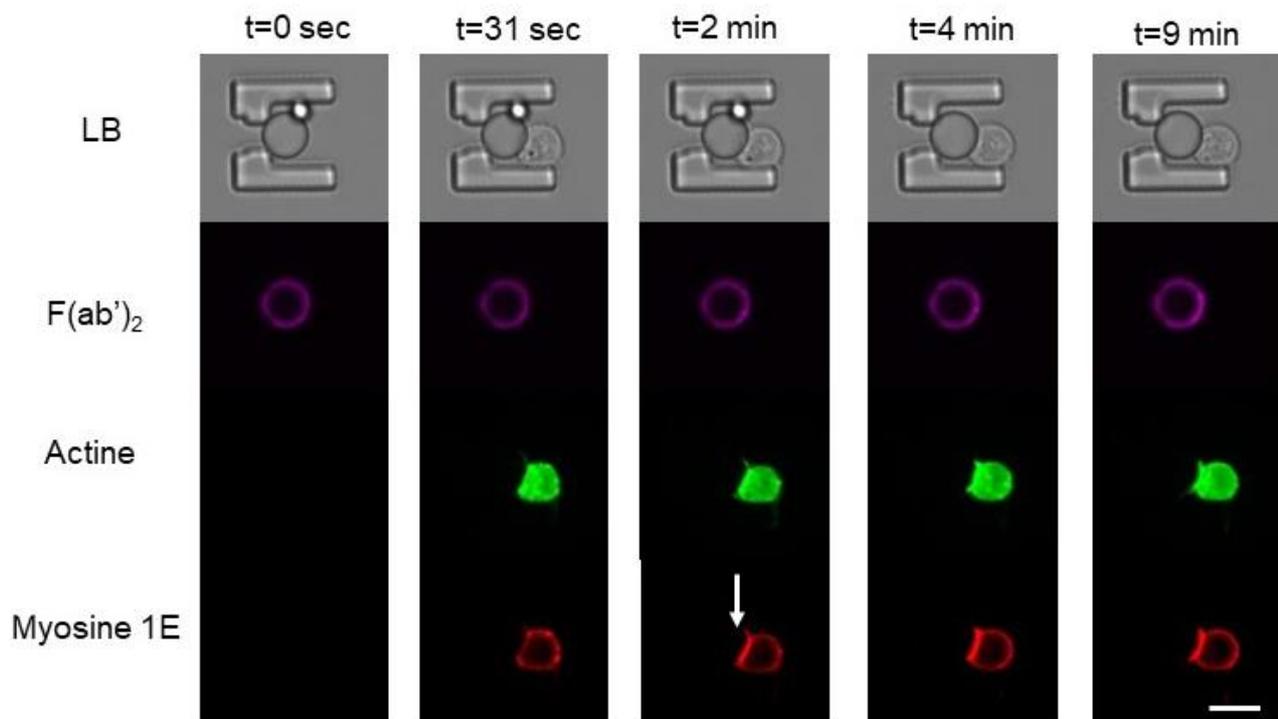


Figure 94. Séquence d'images prises au *spinning disk* montrant une cellule B dont la myosine 1E est marquée en rouge et l'actine en vert, en contact avec une goutte F(ab')₂. Associée à une accumulation en F(ab')₂ au niveau de la goutte, on constate une accumulation de myosine 1E dans la zone de contact dans les 2 premières minutes. L'accumulation en Myosine 1E reste stable dans le temps. La flèche blanche indique la zone d'accumulation en myosine 1E. (Barre d'échelle : 10 μ m).

La Figure 94 montre le cas d'un marquage de la myosine 1E. La myosine 1E est marquée en rouge et l'actine en vert, et les images sont prises au *spinning disk*. On constate que le recrutement des $F(ab')_2$ dans la zone de contact est associé à une accumulation en myosine 1E au niveau de la zone de contact. Cette accumulation en myosine 1E apparaît dès les premières minutes, puis reste stable au cours du temps.

La Figure 95 montre le cas d'un marquage de la myosine 1C. La myosine 1C est marquée en vert et l'actine en rouge. Ici aussi, on constate que le recrutement des $F(ab')_2$ dans la zone de contact est associé à une accumulation en myosine 1C au niveau de la zone de contact. Cette accumulation en myosine 1C apparaît dès les premières minutes, puis la fluorescence redevient uniforme au niveau de la cellule. On note une accumulation en actine également dès les premières minutes, puis un retour à une fluorescence uniforme.

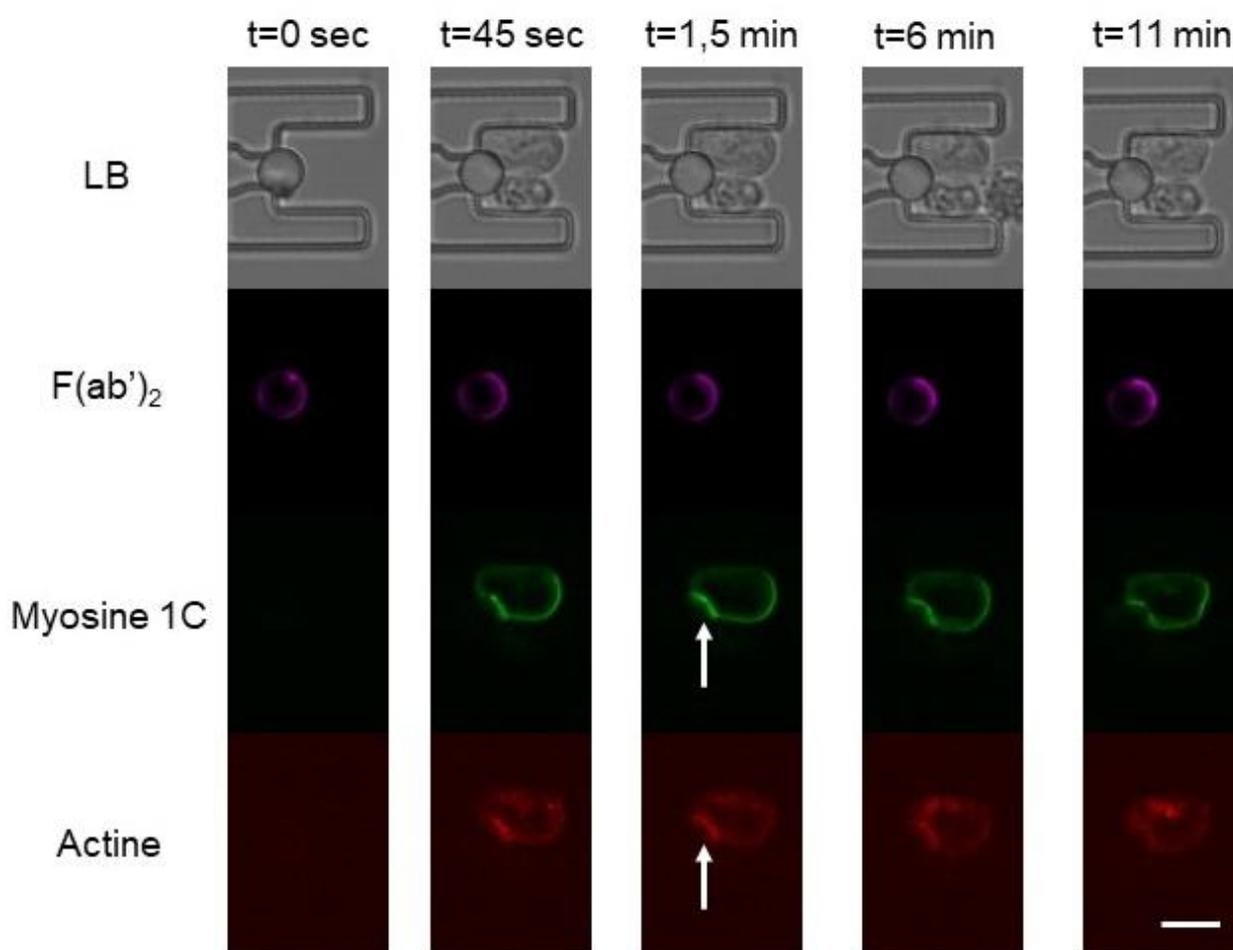


Figure 95. Séquence d'images prises au *spinning disk* montrant une cellule B dont la myosine 1C est marquée en vert et l'actine en rouge, en contact avec une goutte $F(ab')_2$. Associée à une accumulation en $F(ab')_2$ au niveau de la goutte, on constate une accumulation de myosine 1C et d'actine dans la zone de contact dans les 5 premières minutes, puis à un retour à une fluorescence uniforme en myosine 1C et en actine. Les flèches blanches indiquent la zone d'accumulation en myosine 1C et en actine. (Barre d'échelle : 10 μm).

Nous retrouvons donc les observations de Maravillas-Montero *et al.* selon lesquelles la myosine 1C est recrutée à la synapse immunologique.

12.2) Etude par extinction de gènes

Maravillas-Montero *et al.* [71] ont récemment identifié la myosine 1C comme moteur moléculaire impliqué dans la formation de la synapse immunologique chez la cellule B et la présentation des antigènes aux cellules T [71]. Afin de connaître la part de la myosine 1E et 1C dans le recrutement des anticorps à la surface de la goutte, nous avons mené l'étude avec des cellules dont la production de ces protéines a été bloquée par la méthode d'interférence par ARN (voir le principe et le protocole expérimental plus haut).

Les cellules B ayant subi l'interférence par ARN pour la myosine 1E pour un lot de cellules (appelées « cellules SiMyo1E » dans la suite) et pour la myosine 1C pour un autre lot de cellules (appelées « cellules SiMyo1C » dans la suite) sont mises en contact avec des gouttes fonctionnalisées par des anticorps F(ab')₂ (appelées « gouttes F(ab')₂ » dans la suite), suivant le protocole de mise en contact décrit plus haut. Le lot de cellules dites « contrôle » a subi l'électroporation mais aucun ARN interférent n'a été introduit. Les observations sont faites au *spinning disk*.

La Figure 96A montre les cinétiques de recrutement pour des cellules n'ayant pas subi de modification par interférence d'ARN (de type « Wild Type »), dans le cas de gouttes F(ab')₂ (en haut), et de gouttes BSA (en bas). Ces courbes ont déjà été présentées plus haut, mais nous les indiquons ici à titre de comparaison. La méthode d'analyse choisie est la méthode dite « droite-gauche » (voir plus haut) car elle rendait mieux compte des observations que la méthode dite « des pics » (voir plus haut).

La Figure 96B montre les cinétiques de recrutement dans le cas des cellules B ayant subies l'interférence par ARN. Le graphe (i) montre les cinétiques dans le cas « Contrôle » où les cellules B ont subi l'électroporation mais où les ARN interférents n'ont pas été introduits (cellules « SiC »). Le graphe (ii) (respectivement (iii)) montre les cinétiques dans le cas des cellules SiMyo1E (respectivement SiMyo1C).

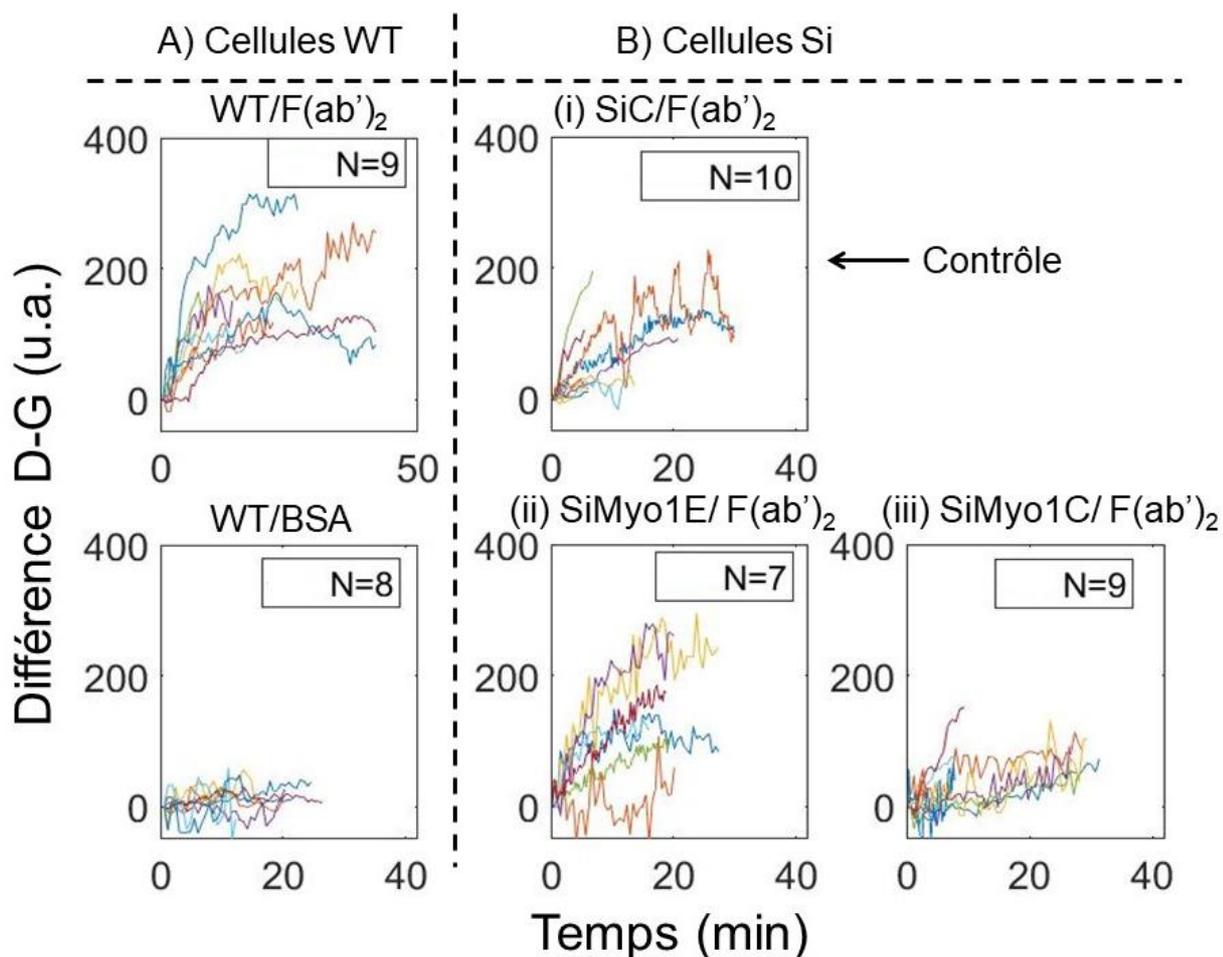


Figure 96. (A) Analyse des gouttes $F(ab')_2$ et BSA mises en contact avec les cellules B de type « Wild Type » (sans transfection). La somme des intensités de la partie droite de la goutte est soustraite à la somme des intensités de la partie gauche (Différence D-G), puis la différence est normalisée par la puissance du laser et le temps d'exposition de la caméra. Les courbes sont tracées en fonction du temps. Pour chaque graphe, chaque courbe représente un couple goutte-cellule. Le nombre de couples analysé est indiqué par N. On constate une augmentation et l'apparition d'un plateau dans le cas WT/ $F(ab')_2$, alors que les courbes restent centrées en 0 pour les WT/BSA. (B) Cas des cellules dont l'expression de myosine 1E (SiMyo1E) ou 1C (SiMyo1C) a été bloquée par interférence par ARN (« RNA silencing »). Ces cellules sont mises en contact avec des gouttes $F(ab')_2$. Les cellules « Contrôle » (SiC) ont subi seulement l'électroporation. On constate que si les cellules « contrôle » et les SiMyo1E forment un patch fluorescent sur la goutte, pour les cellules SiMyo1C ce patch existe mais est moins fluorescent en moyenne.

On constate qu'il y a assez peu de différence entre les cinétiques obtenues entre les cellules SiC et les cinétiques obtenues avec les cellules SiMyo1E. En revanche, les cinétiques obtenues avec les cellules SiMyo1C montrent un plateau plus bas en moyenne que celui des cellules SiC et SiMyo1E. Notons que ces observations faites à partir des cinétiques viennent confirmer les observations visuelles à partir des images prises au microscope.

Ces observations viennent donc confirmer les résultats de Maravillas-Montero *et al.* [71], selon lesquels la myosine 1C a un rôle dans l'expansion de la membrane lors de la formation de la synapse immunologique chez la cellule B.

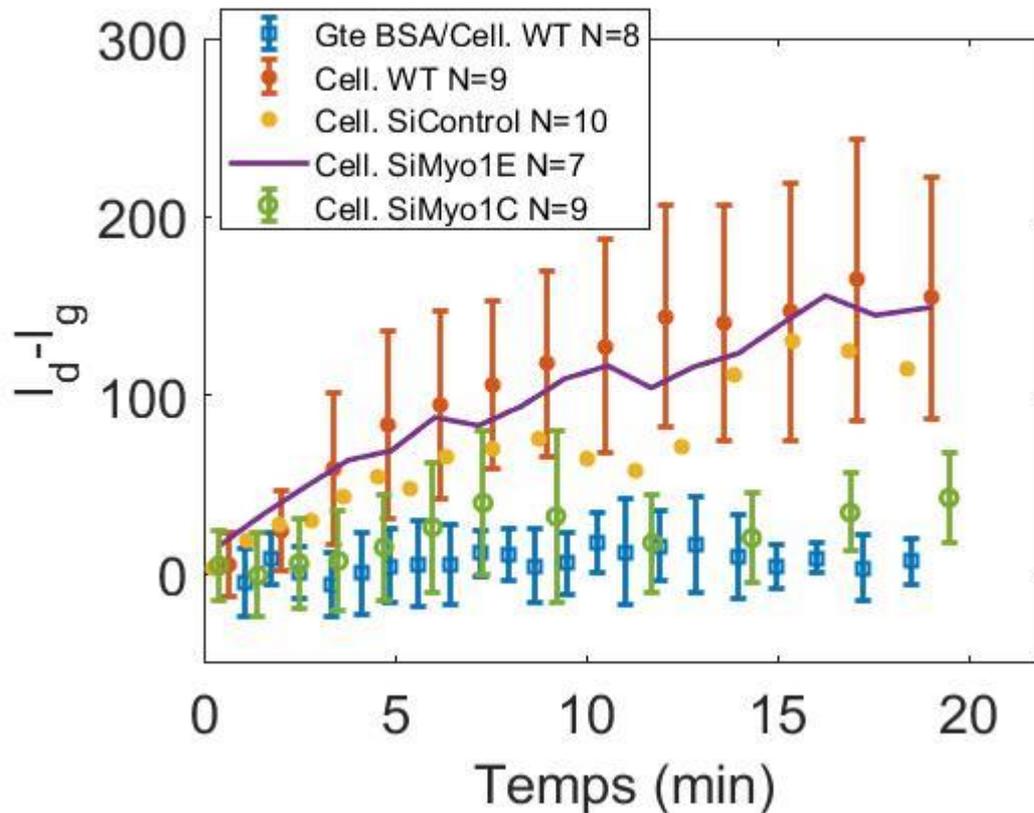


Figure 97. Cinétiques moyennées de $(I_d - I_g)$ pour des gouttes BSA/cellules Wild Type (carré bleu), des gouttes $F(ab')_2$ /cellules Wild Type (rond rouge), des gouttes $F(ab')_2$ /cellules Silencing Contrôle (rond jaune), des gouttes $F(ab')_2$ /cellules Silencing en Myosine 1E (trait violet), des gouttes $F(ab')_2$ /cellules Silencing en Myosine 1C (rond vert). Les cellules Silencing Contrôle ont subi une électrolyse mais leur génome n'a pas été modifié. Dans chaque cas, il y a N couples goutte-cellule analysés. Chaque point correspond à une moyenne de points expérimentaux, et les barres d'erreur à la variation standard associée. Pour des raisons de clarté, les barres d'erreur n'ont pas été mises pour chaque courbe, mais elles sont du même ordre de grandeur.

La Figure 97 montre des moyennes des courbes de la Figure 96, pour chaque cas : les carrés bleus représentent les moyennes pour le cas goutte BSA/cellules B « WT », les points oranges le cas gouttes $F(ab')_2$ /cellules B « WT », les points jaunes le cas $F(ab')_2$ /cellules « Contrôles » pour l'interférence d'ARN (SiControl), la courbe violette le cas $F(ab')_2$ /cellules dont la production de myosine 1E a été bloquée (SiMyo1E), les ronds verts le cas $F(ab')_2$ /cellules dont la production de myosine 1C a été bloquée (SiMyo1C).

On constate que la courbe correspondant aux cellules SiMyo1E arrive au même niveau que les courbes correspondant aux cellules SiControl et aux cellules « WT ». La myosine 1E n'aurait donc pas d'influence dans le recrutement des anticorps sur la goutte.

En revanche, la courbe correspondant aux cellules SiMyo1C se situe légèrement plus haute que la courbe correspondant aux gouttes BSA/cellules « WT ». La myosine 1C aurait donc une influence dans le recrutement des anticorps sur la goutte.

IV) Discussion

Dans cette partie, nous discutons les résultats présentés dans la partie précédente, à la fois qualitatifs et quantitatifs, en les mettant en regard avec les résultats déjà obtenus dans le passé pour des expériences sur la synapse immunologique. Nous commentons les différentes variations des cinétiques mesurées, en donnons une explication liée à l'instrument d'observation utilisé, et faisons le lien avec la taille du patch en fonction du temps.

1) Apparition d'un patch suite à une reconnaissance spécifique par les cellules B

Les expériences ont montré que la mise en contact de cellules B avec des gouttes $F(ab')_2$ conduisait systématiquement à une accumulation de $F(ab')_2$ au contact goutte-cellule. Ce résultat est en accord avec les observations de Fleire *et al.* [17] dans le cas d'un contact des cellules B sur bicouches lipidiques selon lesquelles la concentration en antigènes augmentait dans la zone de contact. On retrouve également les mêmes observations faites par Bourouina *et al.* [44] dans le cas d'un contact entre gouttes fonctionnalisées et cellules T.

Le temps caractéristique de formation du patch, issu des ajustements des cinétiques, est d'environ 6 minutes. Cela correspond aux temps caractéristiques observés par Fleire *et al.* [17] dans le cas d'un contact bicouche lipidique/cellules B, et également aux temps caractéristiques observés par Bourouina *et al.* [44] dans le cas gouttes/cellules T.

La mise en contact de cellules avec des gouttes fonctionnalisées par de la BSA n'a pas conduit à une accumulation de streptavidine au contact goutte-cellule. Nous déduisons de cette observation que la formation du patch nécessite une reconnaissance des $F(ab')_2$ par les récepteurs membranaires des cellules B (RCB). Ce résultat est en accord avec les observations de Bourouina *et al.* [44] qui n'ont pas observé de patch d'anticorps sur les gouttes après mise en contact avec des cellules T si les gouttes ne portaient pas l'anticorps spécifique aux récepteurs des cellules T.

Notons que cette accumulation de ligands et récepteurs a été observé aussi pour un contact goutte/goutte par Bourouina *et al.* [42]. Ce processus d'accumulation apparaît donc pour des objets « non-vivants ». Une explication physique suffit pour expliquer le phénomène d'accumulation entre gouttes.

Il apparaît quatre inconnues dans le problème, comme indiqué sur la Figure 98 : le nombre total de ligands ($F(ab')_2$), le nombre de ligands au contact N_{ligands} , le nombre total de récepteurs et le nombre de récepteurs au contact $N_{\text{récepteurs}}$. Nous sommes dans un cas où le nombre total de ligands est très supérieur au nombre total de récepteurs (ligands en excès). Cela est indiqué par le fait que I_{min} , l'intensité de la partie de la goutte qui n'est pas en contact avec la cellule B (voir schéma de la Figure 98), reste constante au cours du temps (voir Figure 75). Nous vérifierons par un calcul dans la suite que cela est bien le cas. L'intensité de fluorescence I_{max} correspond au surplus de $F(ab')_2$ dans la zone de contact.

Dans les premiers instants de contact entre la goutte et la cellule, on peut penser que la formation du patch est dominée par un phénomène physique dû à la formation de lien ligands/récepteurs à la surface de contact.

Cette explication physique du phénomène peut être donnée en considérant la diffusion à deux dimensions des $F(ab')_2$ (ligands) en surface de la goutte. En effet, ces ligands sont mobiles à cause de l'agitation thermique. Ils ont donc une probabilité non nulle de rencontrer les récepteurs de la cellule B (étape 2 du schéma de la Figure 98). Le temps caractéristique pour qu'un ligand passe d'une extrémité à une autre de la goutte à cause de l'agitation thermique s'écrit :

$$\tau = \frac{S}{D}$$

avec $S = 4\pi R^2$ la surface de la goutte, avec R son rayon et D le coefficient de diffusion à deux dimensions des ligands à la surface de la goutte. En prenant $R = 4 \mu\text{m}$ et $D = 1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, on obtient un temps caractéristique de $\tau = 3 \text{ min}$, ce qui correspond au temps au bout duquel on voit le patch se former au microscope.

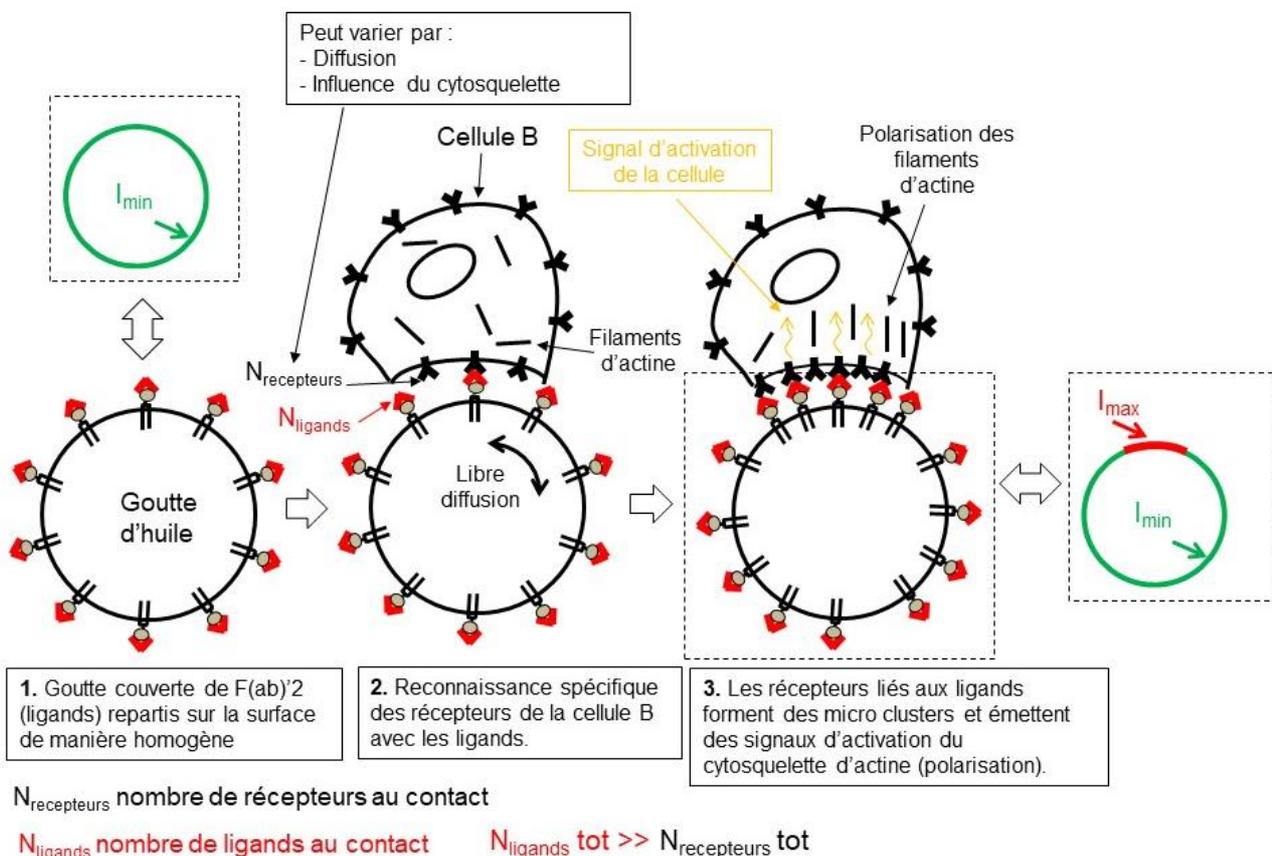


Figure 98. Schématisation des étapes intervenant dans le recrutement des $F(ab')_2$ par la cellule B. (1) Lorsqu'il n'y a pas de contact avec la cellule, les $F(ab')_2$ sont répartis uniformément autour de la goutte. L'intensité de fluorescence est uniforme à la surface de la goutte et égale à I_{min} . (2) La cellule entre en contact avec la goutte. Il y a formation de liens ligands/récepteurs entre $F(ab')_2$ et récepteurs membranaires. Les $F(ab')_2$ sont libres de diffuser à la surface de la goutte, alors que la diffusion des récepteurs est régulée par le cytosquelette d'actine. (3) A l'équilibre, il y a une accumulation de $F(ab')_2$ à la surface de contact. Le nombre de $F(ab')_2$ recrutés est appelé N_{ligands} , et le nombre de récepteurs recrutés est appelé $N_{\text{recepteurs}}$. L'intensité du patch est I_{max} , alors que l'intensité de la goutte reste égale à I_{min} car le nombre de $F(ab')_2$ est très grand devant le nombre de récepteurs. On peut faire l'hypothèse que des signaux d'activation de la cellule sont produits par les récepteurs, et que le cytosquelette d'actine se polarise.

Dans le cas du contact goutte-cellule B, on peut se demander quelle est la part du mécanisme physique et la part du mécanisme biologique. Les récepteurs membranaires de la cellule B peuvent diffuser de manière passive, mais aussi de manière active, c'est-à-dire que l'activité du cytosquelette d'actine de la cellule peut influencer la diffusion des récepteurs. Le nombre de récepteurs au contact varie donc au cours du temps. Il est déterminé à la fois par la libre diffusion des récepteurs sur la membrane, et à la fois par le cytosquelette d'actine. Des études ont montré que le cytosquelette d'actine avait un rôle important dans la diffusion des récepteurs [72].

On peut faire l'hypothèse que la reconnaissance des $F(ab')_2$ par les récepteurs conduit à la transduction de signaux conduisant à la polarisation du cytosquelette d'actine et à l'activation de la cellule B (étape C du schéma de la Figure 98).

Notons que la granulosité du patch fluorescent observée peut être expliquée par la formation de micro-clusters d'anticorps $F(ab')_2$, lors de la formation de la synapse immunologique [73]. Ces micro clusters sont à la base de la génération de signaux induisant l'activation de la cellule B [74].

On peut enfin comparer le contact goutte-cellule B au contact goutte-goutte complémentaire (Bourouina *et al.* [42]). La grande différence tient au fait que le nombre de récepteurs dans la zone de contact dans le cas goutte-cellule est régulé en grande partie par le cytosquelette d'actine ; alors que dans le cas goutte-goutte complémentaire, le nombre de récepteurs est donné directement par la diffusion brownienne en surface des gouttes.

2) Evolution des cinétiques de $(I_d - I_g)$ et $(I_{max} - I_{min})$ normées et lien avec le type de mesure

Dans ce paragraphe, nous comparons les différentes cinétiques normées de la Figure 85. Nous montrons ces mêmes cinétiques normées sur la Figure 99A. Nous avons fait les remarques suivantes :

- $(I_d - I_g)$ dans le cas du *spinning* atteint un plateau ;
- $(I_{max} - I_{min})$ dans le cas du *spinning* n'atteint pas de plateau et continue à augmenter ;
- $(I_{max} - I_{min})$ dans le cas du microscope optique atteint un plateau.

De manière à expliquer cela, nous nous appuyons sur les schémas de la Figure 99. Dans le cas du *spinning disk* (Figure 99B(i)), la profondeur de champ est largement inférieure à la longueur du patch. I_{max} et I_{min} correspondent aux intensités mesurées au niveau des cercles noirs. La quantité $(I_{max} - I_{min})$ est alors proportionnelle à la concentration en $F(ab')_2$ dans le patch. Dans le cas de la méthode Droite-Gauche illustrée sur la Figure 99B(ii), on obtient une intégration des intensités sur l'ensemble du patch (arc de cercle rouge). La quantité $(I_d - I_g)$ est donc proportionnelle au nombre de $F(ab')_2$ dans le patch.

Dans le cas du microscope optique (Figure 99C), la lumière captée se fait sur une certaine épaisseur, supérieure ou égale à la profondeur de champ. Cette épaisseur est de l'ordre de la longueur du patch. La quantité $(I_{max} - I_{min})$ est donc proportionnelle au nombre de $F(ab')_2$ dans le patch.

Le fait que les courbes normées de $(I_d - I_g)$ et $(I_{max} - I_{min})$ pour le microscope optique saturent aux temps longs montre que le nombre total de $F(ab')_2$ sature également. En revanche,

le fait que $(I_{\max}-I_{\min})$ dans le cas du *spinning* continue à augmenter montre que la concentration en $F(ab')_2$ dans le patch augmente. De ces deux évolutions pour le nombre et pour la concentration en $F(ab')_2$ dans le patch, nous en concluons que la taille du patch doit diminuer aux temps longs. C'est ce que nous montrons dans le paragraphe suivant.

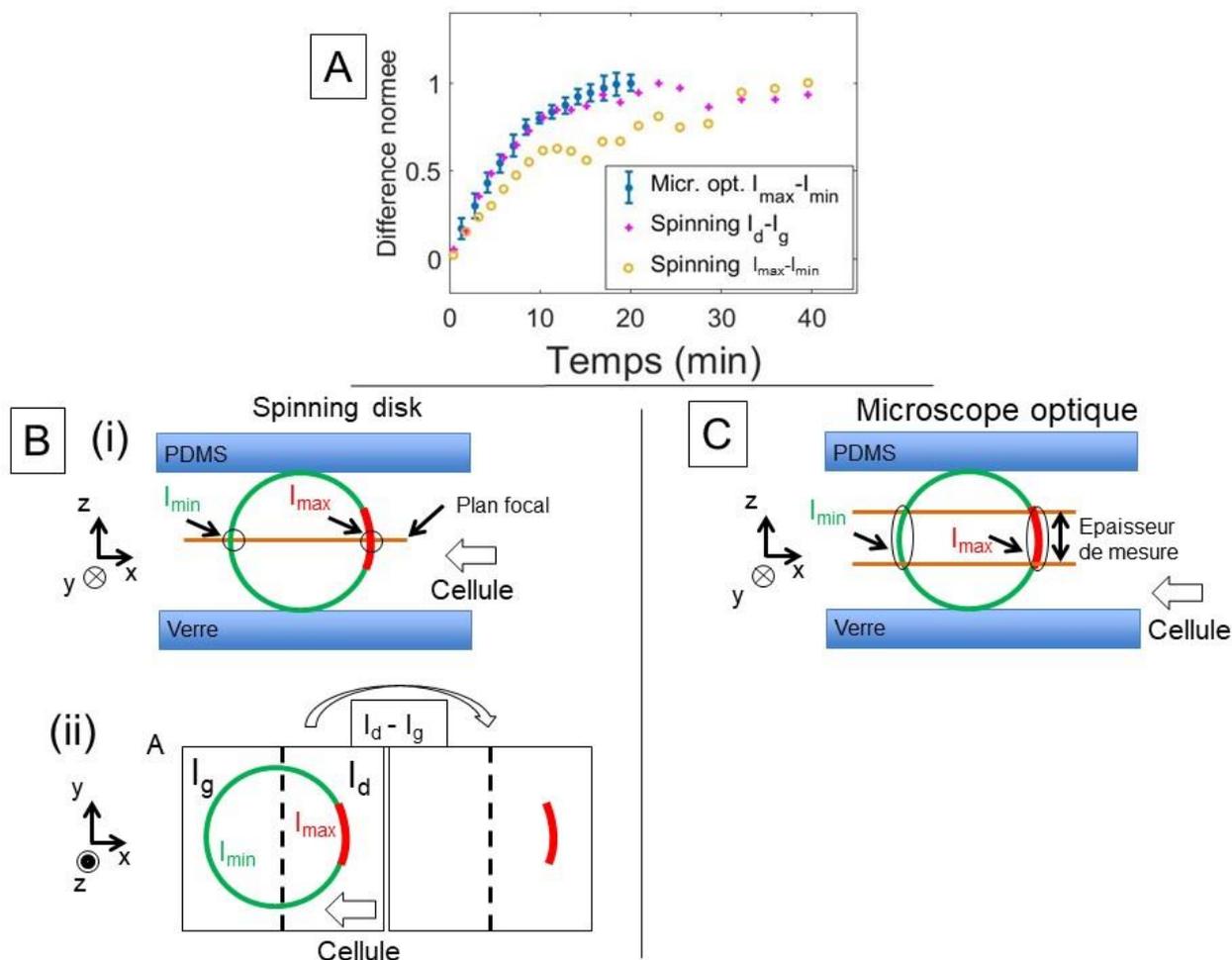


Figure 99. (A) Courbes des moyennes de $(I_{\max}-I_{\min})$ normés au microscope optique (points bleus), (I_d-I_g) et $(I_{\max}-I_{\min})$ normés au *spinning disk* (croix magentas et ronds jaunes). (B)(i) Schéma (vue de profil) illustrant la mesure de $(I_{\max}-I_{\min})$ au *spinning*. L'épaisseur du plan focal est largement inférieure à la longueur du patch. I_{\max} et I_{\min} correspondent aux intensités mesurées au niveau des cercles noirs. $I_{\max}-I_{\min}$ est proportionnel à la concentration en $F(ab')_2$ dans le patch. (ii) Schéma (vue de haut) illustrant la mesure de (I_d-I_g) au *spinning*. On obtient bien l'intégration des intensités sur le patch entier. (C) Schéma illustrant la mesure de $(I_{\max}-I_{\min})$ au microscope optique. L'épaisseur de détection de la lumière, appelée « épaisseur de mesure » est du même ordre que la longueur du patch. I_{\max} et I_{\min} correspondent aux intensités mesurées au niveau des cercles noirs. $I_{\max}-I_{\min}$ est proportionnel au nombre de $F(ab')_2$ dans le patch.

3) Diminution du patch et lien avec les cinétiques de (I_d-I_g) et $(I_{\max}-I_{\min})$

Dans ce paragraphe, nous faisons le lien entre l'évolution des cinétiques de (I_d-I_g) et $(I_{\max}-I_{\min})$ pour le *spinning disk* seulement, et la longueur du patch.

La Figure 100A montre les cinétiques normées de (I_d-I_g) (croix magentas) et de $(I_{\max}-I_{\min})$ (ronds jaunes) dans le cas du *spinning disk*. On constate que (I_d-I_g) atteint un plateau alors que $(I_{\max}-I_{\min})$ continue à augmenter. Selon la formule de la longueur du patch (B), la longueur du

patch doit diminuer aux temps longs. C'est ce que nous constatons aux temps longs sur la Figure 100(C) montrant la longueur du patch calculée au cours du temps : une diminution assez grande à partir de 6 minutes, puis devenant de plus en plus faible au cours du temps.

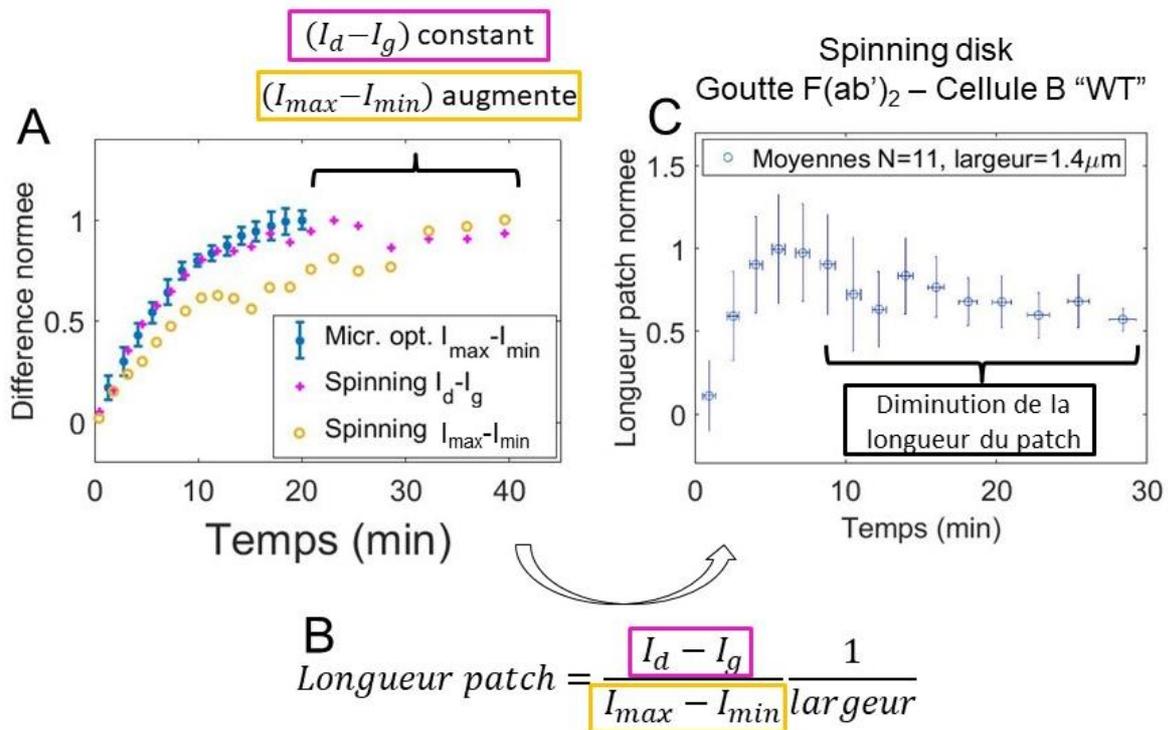


Figure 100. (A) Moyenne des différences normées de $(I_{max}-I_{min})$ pour le microscope optique (points bleus), de (I_d-I_g) et de $(I_{max}-I_{min})$ pour le *spinning disk* (croix magentas et ronds jaunes). Aux temps longs et pour le *spinning disk* seulement, (I_d-I_g) atteint un plateau alors que $(I_{max}-I_{min})$ croît. D'après la formule donnée (B), la longueur du patch calculée doit donc diminuer aux temps long. (C) Moyenne des longueurs de patch calculées à partir de la formule (B). On constate bien une diminution de la longueur du patch aux temps longs. La largeur prise pour le calcul est de $1,4 \mu\text{m}$.

- 4) (I_d-I_g) pour le *spinning* et $(I_{max}-I_{min})$ pour le microscope optique sont constants en fonction de I_{min}

Nous comparons à présent les valeurs finales de (I_d-I_g) pour le *spinning*, et $(I_{max}-I_{min})$ pour le microscope optique, en fonction de I_{min} .

Les plateaux de $(I_{max}-I_{min})$ pour le microscope optique, et de (I_d-I_g) pour le *spinning*, en fonction de I_{min} , sont montrés sur la Figure 83(B)(ii) et Figure 84B respectivement. On observe des évolutions assez similaires pour ces deux courbes. Cela confirme le fait que la mesure de $(I_{max}-I_{min})$ dans le cas du microscope optique donne le même type d'information que la mesure de (I_d-I_g) pour le *spinning*, à savoir un nombre total de $F(ab')_2$ dans le patch.

Le fait que la fluorescence totale du patch reste constante quel que soit la fluorescence de la goutte signifie que le nombre de $F(ab')_2$ recrutés au contact reste le même quel que soit le nombre initial de $F(ab')_2$ initialement présents sur la goutte. On peut faire une estimation du nombre moyen de $F(ab')_2$ présents sur une goutte et le comparer au nombre typique de récepteurs cellulaires.

Lors de la fonctionnalisation des gouttes, le nombre de streptavidine et de F(ab')₂ est largement en excès devant la quantité de biotine présentée en surface sur les gouttes. La quantité de F(ab')₂ portée par une goutte est donc déterminée par la concentration en phospholipides biotinylés dans l'huile. En considérant que tous les phospholipides sont présents à la surface de la goutte, le nombre de F(ab')₂ disponibles à la surface d'une goutte s'écrit :

$$N_{Fab} = N_{DSPE} = C_{molDSPE} \times V_{goutte} \times N_A$$

avec $C_{molDSPE} = C_{mDSPE}/M_{DSPE}$ la concentration molaire en phospholipides biotinylés en fonction de C_{mDSPE} la concentration massique en phospholipides biotinylés et de M_{DSPE} la masse molaire des phospholipides biotinylés, et $V_{goutte} = (4/3)\pi R^3$ le volume de la goutte en fonction de son rayon R . En prenant $C_{mDSPE} = 0,05 \text{ mg/mL}$, $M_{DSPE} = 3000 \text{ g/mol}$, $R = 4 \text{ }\mu\text{m}$, on obtient un nombre de molécules de F(ab')₂ par goutte de $N_{Fab} = 3 \text{ millions}$. Ce nombre est typiquement environ 100 fois plus grand que le nombre de récepteurs d'une cellule B. En effet, Maity *et al.* [75] mesurent une densité en récepteur de $200 \text{ }\mu\text{m}^{-2}$, correspondant à 40 000 récepteurs pour une cellule B de $8 \text{ }\mu\text{m}$ de diamètre. Cet ordre de grandeur est confirmé par Yang et Reth [76], selon lesquels il y a jusqu'à 120 000 récepteurs sur une cellule B. À titre de comparaison, il a été mesuré environ 50 000 récepteurs sur des membranes de cellules T [45]. Nous sommes donc dans un cas où le nombre de F(ab')₂ portés par la goutte est toujours en excès par rapport au nombre de récepteurs.

En supposant que le nombre de F(ab')₂ présents en excès dans la zone de contact soit égale au nombre de récepteurs de la cellule en excès, on en déduit que le même nombre de récepteurs est donc recruté au contact goutte-cellule. Il serait intéressant de pouvoir visualiser les récepteurs en fluorescence pour pouvoir confirmer qu'il y a bien une accumulation de récepteurs de la cellule B dans la zone de contact.

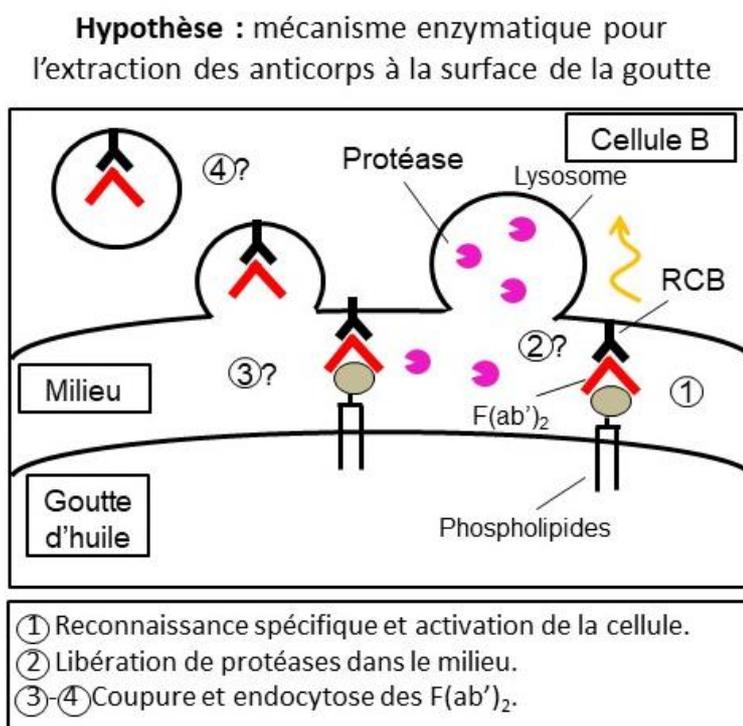
Si on avait une mesure précise du nombre de F(ab')₂ sur la goutte, on pourrait en déduire le nombre précis de F(ab')₂ recrutés, et on aurait donc une information sur le nombre de récepteurs recrutés, sans avoir à marquer les récepteurs. Cela peut présenter un avantage car le marquage en fluorescence des récepteurs membranaires peut stimuler les récepteurs membranaires, et induire des signaux d'activation de la cellule. De plus, l'ajout d'un fluorophore sur le récepteur peut influencer sur les propriétés de diffusion de ce dernier.

5) Processus impliquant une polarisation du lysosome

Des observations faites au microscope à fluorescence ont montré une polarisation du lysosome de la cellule B suite au contact avec une goutte F(ab')₂. Ceci indique une réponse de la part de la cellule induite par la reconnaissance des F(ab')₂ par les RCB.

Une manière d'interpréter cette polarisation serait de dire que la goutte étant trop dure pour la cellule B, la cellule n'a pas activé l'extraction des anticorps par voie mécanique, mais par action enzymatique (voir Figure 101). En effet, cette action enzymatique suppose la migration des lysosomes à la synapse immunologique, et la libération dans le milieu extérieur d'enzymes capables de couper le lien chimique entre les F(ab')₂ et la goutte. Néanmoins, aucune dégradation de l'intensité du patch n'a été observée, ni de présence de fluorescence propre aux

anticorps dans la cellule B, indiquant une possible internalisation des anticorps. Ceci peut être expliqué par le fait que les enzymes sécrétés par la cellule B sont emportés par le faible flux résiduel dans la puce lors de la mise en contact. Un arrêt total du flux dans ces expériences de contact pourrait être une des améliorations à apporter au dispositif expérimental. Ceci suggère que la cellule a répondu à la reconnaissance des $F(ab')_2$ par les récepteurs membranaires en polarisant les lysosomes et en sécrétant des enzymes, mais ces enzymes n'ont pas coupé les anticorps de la goutte, car sans doute emportés par le flux. Dans cette hypothèse, l'internalisation des anticorps n'a donc pas eu lieu.



La cellule B « trouve » la goutte rigide, et choisit un mécanisme enzymatique plutôt que mécanique.

Figure 101. Hypothèse du mécanisme enzymatique pour l'extraction des anticorps dans le cas du contact goutte/cellule B. (1) Reconnaissance spécifique des $F(ab')_2$ par les récepteurs membranaires, conduisant à un signal d'activation de la cellule. (2) Migration des lysosomes vers la surface de contact et libération de protéases (enzymes pouvant couper les liaisons peptidiques des protéines). (3) Les $F(ab')_2$ seraient coupés des phospholipides et internalisés par endocytose. Dans l'expérience, les protéases seraient plutôt emportées par le faible flux restant dans la chambre microfluidique.

Une manière de savoir si les cellules B libèrent des protéases comme indiqué sur le schéma de la Figure 101 serait d'utiliser un colorant dont la fluorescence varie en fonction du pH, comme le CypHer 5. Ce colorant a la particularité de n'être pas fluorescent à pH neutre, et de le devenir à pH inférieur à 5. La libération de protéase par les lysosomes conduirait à un environnement acide proche de la zone de contact, ce qui pourrait être visualisé grâce à ce colorant.

Néanmoins, il n'y a pas de preuves invalidant l'hypothèse d'une extraction des anticorps par voie mécanique, car si la cellule B déforme la goutte pour former des endosomes et détacher les anticorps par voie mécanique, ces endosomes seraient difficilement détectables par microscopie, leur taille étant de l'ordre de 100 nm. La force nécessaire pour déformer la goutte

sur une surface de l'ordre de celle d'un endosome s'écrit $F_{end} = P \times S$ avec $P = 4 \text{ kPa}$ la pression de Laplace de la goutte et $S = 100 \text{ nm} \times 100 \text{ nm} = 0,01 \mu\text{m}^2$. Après calcul, on arrive donc à la force $F_{end} = 0,04 \text{ nN}$, qui est environ 100 fois plus petite que les forces déjà mesurées dans le cas d'adhésion de cellules B sur des gels (de 10 à 50 nN d'après les travaux d'Anita Kumari sous la supervision de Paolo Pierobon à l'Institut Curie). On en déduit que la formation d'endosomes par voie mécanique n'est pas limitée par la rigidité de la goutte. Remarquons que la force calculée est du même ordre que la force nécessaire pour pincer un feuillet cellulaire (environ 40 pN, voir plus haut les mesures de forces faites à l'AFM par Natkanski *et al.* [32]). Encore une fois, cette voie d'extraction n'aurait pas lieu, comme le suggère l'absence de signal en fluorescence des F(ab')₂ dans la cellule.

On peut faire une remarque à propos des temps d'apparition des différentes voies d'extraction des anticorps. La voie mécanique semble se déclencher dès les premières minutes de contact d'après Natkanski *et al.* [32] alors que la voie enzymatique est plus longue à se déclencher (de l'ordre de une heure selon Yuseff *et al.* [26]). Nos expériences de contact durent en moyenne 20 minutes. Dans le cas goutte/cellule B, la voie mécanique aurait le temps de se déclencher, alors que la voie enzymatique n'est peut-être pas totalement développée. La polarisation du lysosome que l'on voit serait seulement la première étape de la voie enzymatique, et les autres étapes (libération des protéases, endocytose des anticorps) n'auraient pas le temps de se mettre en place.

6) Influence de la myosine dans le recrutement d'anticorps

Le marquage en fluorescence de la myosine 1E et de la myosine 1C a montré une accumulation de ces deux protéines dans la zone de contact. Ces observations suggèrent que ces deux protéines jouent un rôle dans la formation de la synapse.

De manière à étudier l'influence de la myosine 1E et de la myosine 1C sur le recrutement des anticorps à la surface de la goutte, nous avons bloqué la production de ces protéines. Comme le montre les cinétiques issues de l'analyse « droite-gauche » avec des cellules dont la production de myosine a été bloquée, la myosine 1C semble avoir un rôle dans le recrutement des anticorps, alors que la myosine 1E semble ne pas avoir d'influence dans ce recrutement. En effet, les courbes relatives aux cellules SiMyo1C atteignent un plateau plus bas en moyenne que le plateau relatif aux cellules « Contrôle », alors que les courbes relatives aux cellules SiMyo1E sont similaires à celles des cellules « Contrôle » (voir plus haut).

Ce résultat confirme le fait que la myosine 1C joue un rôle dans la formation de la synapse immunologique. Le cytosquelette d'actine joue un grand rôle dans la formation de la synapse immunologique, et comme la myosine est associée à l'actine, cela semble cohérent.

Notons que le phénomène d'expansion de la membrane cellulaire lors de la reconnaissance RCB/antigènes, dépend de la présence de myosine, comme l'ont montré Maravillas-Montero *et al.* [71].

Conclusion

Notre étude a consisté à mettre en contact des gouttes fonctionnalisées en surface par des anticorps $F(ab')_2$ avec des cellules B. L'utilisation de ces gouttes comme substrat pour l'activation des cellules B n'a jamais été faite auparavant. En utilisant des objets à la fois liquides et déformables, notre objectif est de mieux comprendre la formation de la synapse immunologique au contact entre les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules B.

Les gouttes ont été fabriquées et fonctionnalisées suivant des méthodes développées au laboratoire.

De manière à mettre en contact une goutte et une cellule B de manière parallèle et contrôlée, nous avons utilisé des pièges microfluidiques en forme de U réparties suivant un réseau hexagonal dans une chambre microfluidique. La forme de la chambre a été optimisée de manière à rendre le remplissage des pièges le plus efficace possible.

Le dispositif expérimental mis au point permet de mettre en contact une goutte fonctionnalisée par des anticorps et une cellule B dans plusieurs pièges en parallèle, et d'observer l'évolution du contact dans le temps par microscopie optique, puis avec un *spinning disk*. Nous avons discuté les différences liées à la mesure de la fluorescence des gouttes avec ces deux appareils, et nous avons montré que les résultats obtenus sont en accord.

Nous avons observé que le contact goutte-cellule induisait la formation d'un patch d'anticorps au niveau de la zone de contact. Contrairement à ce qui a été observé pour un contact gouttes/cellules T, ce patch est stable au cours du temps et ne se désagrège pas. Ce patch est dû à une reconnaissance spécifique de type ligand/récepteur, puisque la mise en contact de gouttes fonctionnalisées par de la BSA (protéine passivante) ne conduit pas à un patch. La cinétique en fluorescence d'apparition du patch est mesurée. Le temps caractéristique d'atteinte du plateau est de l'ordre de 5 minutes. Nous montrons que quelle que soit la fluorescence initiale de la goutte, autrement dit la quantité initiale d'anticorps présents sur la goutte, le nombre d'anticorps recrutés dans la zone de contact reste le même. Le nombre d'anticorps présents sur la goutte étant toujours en excès par rapport aux récepteurs de la cellule B (RCB), cela suggère que le nombre de RCB recrutés au niveau de la zone de contact est sensiblement le même pour chaque cellule B.

Les mesures réalisées au *spinning disk* suggèrent que la membrane cellulaire se contracte aux temps longs. En effet, le nombre d'anticorps recrutés dans la zone de contact atteint un plateau, alors que la concentration en anticorps dans la zone de contact continue d'augmenter aux temps longs. Les calculs de tailles de patch, validés par des mesures directes, montrent bien une diminution de la taille du patch aux temps longs (à partir d'environ 6 minutes). Ce résultat est en accord avec des observations précédentes faites dans le cas de bicouches lipidiques [17].

Le marquage en fluorescence des lysosomes lors de la mise en contact goutte-cellule a montré une polarisation des lysosomes vers la zone de contact. Ceci indique que la cellule B répond physiologiquement au contact avec la goutte, et suggère une extraction des antigènes par voie enzymatique, la goutte étant trop rigide pour la cellule B.

Un marquage de la myosine 1E et myosine 1C a montré une accumulation de ces deux moteurs moléculaires dans la zone de contact. On peut faire l'hypothèse que ces deux moteurs

moléculaires ont un rôle dans la formation de la synapse immunologique. La mesure des cinétiques de recrutement des $F(ab')_2$ a montré que les cellules dont l'expression de la myosine 1C était bloquée recrutèrent moins de $F(ab')_2$ dans la zone de contact que les cellules dites « Contrôle ». Ceci suggère que la myosine 1C a un rôle dans la formation de la synapse immunologique, comme il a été observé précédemment [37].

Pour conclure, nous nous sommes demandé au cours de l'étude quelle était la part d'un mécanisme passif de recrutement des $F(ab')_2$ par rapport à un mécanisme actif de la part de la cellule B. Il semble que la simple reconnaissance ligand/récepteur associée à la mobilité de ces molécules en surface suffise dans l'explication. Néanmoins, le fait que l'absence de myosine 1C induit l'obtention d'un patch moins fluorescent et donc un recrutement moins efficace en $F(ab')_2$ montre que le processus de recrutement des $F(ab')_2$ dans la zone de contact est guidé en partie par l'activité interne de la cellule.

Perspectives

Nous donnons enfin quelques perspectives dans une optique de continuité du travail. On pourra faire des améliorations sur les trois types d'objets intervenant dans le problème : les gouttes, les cellules et les pièges microfluidiques. Nous faisons également des remarques sur la méthode employée pour l'étude de la synapse immunologique, et la pertinence des gouttes dans ce problème.

1) L'efficacité des pièges pour obtenir des doublets goutte/cellule peut être améliorée

Un premier point à améliorer serait sûrement l'efficacité des pièges. Dans notre travail, nous avons choisi d'utiliser les pièges dans un sens seulement, en chargeant les gouttes, puis les cellules. Une manière d'augmenter le nombre de couples goutte-cellule serait d'envisager une méthode d'inversion de flux avec des pièges à « deux couches » comme ceux mentionnés plus haut [52]. Étant donné le temps imparti pendant la thèse, il n'a pas été possible de fabriquer ces pièges à deux couches, et nous avons préféré utiliser nos pièges à une seule couche de manière à pouvoir observer des événements biologiques. Augmenter le nombre de couples goutte-cellule par puce permettrait en effet d'augmenter la statistique des résultats. Surtout, cela permettrait d'obtenir un nombre suffisant de couples goutte-cellule dans le cas où les cellules sont transfectées avec un taux de réussite parfois faible (de l'ordre de 20 %).

Au préalable, des simulations des vitesses dans des pièges à deux couches pourraient être faites de manière à vérifier qu'ils laissent passer plus de flux que les pièges à un étage. Ce genre de simulations pourra être mené en trois dimensions et au niveau d'un seul piège (pour des calculs moins longs). Le cas où une goutte est initialement positionnée dans le piège pourrait être envisagé pour cette simulation, puisque lors du chargement des cellules il faut considérer le système (piège+goutte). Ce genre de simulations pourrait éviter des essais expérimentaux infructueux.

Notons que nos pièges peuvent être utilisés pour fixer les cellules au préalable piégées et en contact avec des gouttes. La fixation de cellules consiste à immobiliser les cellules en les tuant, tout en maintenant leur forme initiale. Pour cela, il suffit d'injecter en entrée de la puce une solution de PFA (paraformaldéhyde) qui va tuer les cellules sans les déformer, puis des marqueurs fluorescents, dilués dans du milieu cellulaire et rendant visibles en fluorescence des éléments des cellules, comme l'actine par exemple. Des premiers tests ont donné des résultats intéressants. Cette méthode de fixation peut être intéressante dans la suite, et plus particulièrement pour des applications tournées vers la biologie. Nous avons préféré dans notre étude nous concentrer sur des phénomènes dynamiques observés chez des cellules vivantes.

2) Possibilité de visualiser les récepteurs des cellules B en fluorescence

Notre méthode a consisté à suivre les ligands présents à la surface des gouttes. On pourrait aussi suivre les récepteurs membranaires des cellules B, comme l'ont fait Batista *et al.* [20] dans le cas d'un contact entre des cellules B et des cellules présentatrices d'antigènes. Cela permettrait de vérifier que l'accumulation des ligands s'accompagne d'une accumulation de récepteurs (colocalisation des ligands et des récepteurs), comme dans le cas d'un contact entre une cellule B et une cellule présentatrice d'antigène [20]. Notons qu'une accumulation de récepteurs au contact a été observé dans le cas cellule T-goutte fonctionnalisée (Bourouina *et al.* [44]). Un marquage en fluorescence des récepteurs membranaires des cellules B peut se faire par transfection. Cette transfection consiste à faire exprimer à la cellule des récepteurs attachés à des fluorophores. La difficulté dans ce marquage est de ne pas stimuler les récepteurs du fait de leur lien avec les fluorophores, et ainsi provoquer une activation « non voulue » des cellules B. Le fait de ne suivre seulement les ligands comme nous l'avons fait présente l'avantage d'être une méthode moins intrusive et ne perturbant pas les mécanismes d'activation de la cellule B.

3) Nos gouttes miment-elles bien les cellules présentatrices d'antigène ?

On peut se demander également si nos gouttes miment bien les cellules présentatrices d'antigène. Une différence notable des gouttes avec les cellules est la présence d'une simple couche de phospholipides en surface possédant une tension de surface. Une meilleure représentation de la membrane cellulaire est donnée avec des vésicules qui possèdent une bicouche lipidique. De plus, la présence de l'huile est également une grande différence avec les cellules présentatrices d'anticorps. Dans notre étude, nous supposons que le contact avec l'huile de soja n'altère pas le comportement des cellules B.

Avec les gouttes, nous ne cherchons pas à mimer exactement les cellules présentatrices d'antigènes, mais à étudier les propriétés de diffusion des récepteurs membranaires de cellules B. En effet, connaissant les coefficients de diffusivité surfaciques des ligands, on peut tirer des informations sur la diffusion des récepteurs membranaires des cellules B. Nous considérons nos gouttes comme des objets à interface fluide dont les propriétés de surfaces sont connues, et nous cherchons à en tirer des informations sur la formation de la synapse immunologique.

Une amélioration par rapport aux bicouches lipidiques ou aux feuilletts membranaires utilisés comme substrats pour les cellules B, réside dans le fait que nos gouttes sont rondes, comme des cellules présentatrices d'antigène. Un modèle plus proche de cellules présentatrices d'antigènes serait des vésicules, mais ces objets sont moins stables que nos gouttes, et leur introduction dans des canaux microfluidiques pourrait les déformer et les rompre. Nos gouttes présentent l'avantage d'être très stables (peu de coalescence ou de division dans les canaux microfluidiques). Cela fait d'elles de bons « outils » de travail.

Notons qu'à l'origine, la synapse immunologique a été observée chez les cellules T lors du contact avec des cellules présentatrices d'antigènes [23]. Cette synapse est une microstructure constituée de nombreuses molécules adhésives entre le lymphocyte B ou T et une cellule présentatrice d'anticorps, et de laquelle sont générés des signaux d'activation du lymphocyte B ou T (production d'anticorps, extraction d'antigène, ...) [22]. La formation d'une synapse

immunologique a été observée par Bourouina *et al.* [44] dans le cas d'un contact entre des cellules T et des gouttes fonctionnalisées. Dans notre travail, il semblerait que cette synapse se soit formée puisque nous avons observé une polarisation du lysosome, signe que la cellule B a été activée. Les gouttes d'huile fonctionnalisées miment donc bien les cellules présentatrices d'antigène, et sont donc de bons outils pour la compréhension du fonctionnement de cette synapse immunologique, qui présente une certaine universalité en immunologie, puisqu'on la trouve chez les cellules B et T.

4) À propos des gouttes : meilleure caractérisation de la quantité d'anticorps en surface et gouttes moins rigides

Dans notre étude, nous n'avons pas quantifié le nombre exact de $F(ab')_2$ présents sur les gouttes. Nous en avons donné un ordre de grandeur à partir de la quantité de phospholipides biotinylés présents dans l'huile et nous avons montré qu'ils étaient beaucoup plus nombreux que les récepteurs des cellules B. Néanmoins, un nombre exact de $F(ab')_2$ aurait pu nous donner un renseignement sur le nombre exact de récepteurs recrutés au contact, en supposant que chaque ligand s'attache à un récepteur dans la zone de contact. Cette quantification aurait pu se faire grâce à une calibration de la fluorescence de la streptavidine, en utilisant par exemple des billes recouvertes de streptavidine dont on connaît la concentration, puis par des analyses de fluorescence par cytométrie en flux. Néanmoins, une quantification précise du nombre de $F(ab')_2$ sur chaque goutte supposerait de faire cette étude de calibration de fluorescence à partir de $F(ab')_2$ fluorescents. Nous n'en avons pas trouvé dans le commerce, il aurait fallu les fabriquer nous même en attachant un fluorophore aux $F(ab')_2$. Pour des raisons de temps, nous n'avons pas pu le faire.

Une autre perspective serait de fabriquer des gouttes plus souples de manière à observer des déformations de gouttes induites par des forces cellulaires. Des gouttes plus souples, ou moins rigides, ont été déjà fabriquées au laboratoire en dissolvant des surfactants dans l'huile constituant les gouttes, ce qui a pour effet une diminution de la tension de surface des gouttes, et donc une diminution de leur rigidité. Des méthodes de fonctionnalisation ont été également développées au laboratoire. Il serait donc intéressant de mettre en contact ces gouttes fonctionnalisées avec des cellules B, pour voir si les cellules peuvent déformer ces gouttes, et tirer des informations de l'ordre mécanique sur le processus biologique mis en jeu. En mesurant les forces exercées pour un grand nombre de couples goutte/cellule, on pourrait déterminer le phénotype « mécanique » des cellules B étudiées (« mechanical phenotyping » en anglais [77]).

La fonctionnalisation d'autres biomolécules en surface, en plus des anticorps déjà présents, pourrait être également intéressante. Cela modifierait la diffusion en surface des anticorps spécifiques, et aurait peut-être une influence sur les temps caractéristiques des cinétiques de fluorescence de la zone de contact. L'accès aux anticorps spécifiques serait peut-être plus difficile pour les récepteurs de la cellule, et cela aurait un impact sur la cinétique d'accumulation.

On pourrait également fonctionnaliser les gouttes avec des anticorps possédant des affinités différentes pour les récepteurs des cellules B, comme l'on fait Spillane et Tolar [18] dans le cas de bicouches lipidiques. La quantité d'anticorps $F(ab')_2$ recrutés selon l'affinité

ligand/récepteur pourrait nous donner une information sur le type de mécanisme d'extraction choisi par la cellule B (mécanique ou enzymatique, voir plus haut).

5) Quantification de la polarisation des lysosomes et confirmation du caractère actif de l'accumulation des anticorps

A partir des marquages réalisés par transfection, une étude quantitative sur la polarisation du lysosome, de l'actine ou de la myosine pourrait être menée. Cela nécessiterait l'obtention d'un grand nombre de couple goutte-cellule car le taux de transfection pour les cellules peut être faible. La quantification de la polarisation de la cellule pourrait être menée en appliquant notre méthode « droite/gauche » à la cellule B par exemple, ou en évaluant la distance entre les lysosomes et le centre de la cellule, comme l'ont fait Yuseff *et al.* [26].

De même, une étude quantitative de la forme du noyau durant le contact entre la cellule B et la goutte pourrait être menée. Nous n'avons pas pu rassembler assez de données pour effectuer cette étude. La forme du noyau peut donner en effet des informations sur l'état physiologique de la cellule au cours du temps.

En s'inspirant des travaux de Fleire *et al.* [20], des simulations numériques pourraient être menées de manière à comprendre l'origine de l'augmentation de la surface de contact, puis de sa contraction. Cela permettrait de savoir si ces observations peuvent s'expliquer à partir d'hypothèses d'ordre physiques, ou si des facteurs biologiques doivent entrer en jeu. Étant donné le temps donné, nous n'avons pas pu développer de modèle pour l'augmentation de la fluorescence dans la zone de contact ou encore la taille du patch au cours du temps. Cela pourrait faire l'objet d'un travail de modélisation.

De manière à confirmer le fait que l'activité de la cellule B a un effet sur la cinétique d'accumulation des anticorps, et qu'il n'y a pas qu'une raison physique basée sur la mobilité des ligands et récepteurs vers le contact goutte - cellule, l'effet d'une drogue sur le recrutement des anticorps par les cellules, de manière à perturber leur fonctionnement interne durant le contact, sans que cette perturbation ne soit trop brutale et ne les dégrade, pourrait être étudié. En effet, en bloquant la production de myosine 1C, nous avons vu que le nombre d'anticorps recrutés à la zone de contact était plus faible, suggérant un rôle de cette protéine dans le processus d'accumulation. Une confirmation du fait que l'activité cellulaire a un rôle dans le recrutement pourrait être envisagée par exemple avec un blocage de la polymérisation de l'actine induit par la latrunculine.

6) Applications possibles : état physiologique des cellules et tests de vaccins

Si l'activité interne de la cellule a bien un rôle à jouer dans le recrutement des anticorps portés par la goutte, des applications en médecine sont possibles dans le cadre de notre expérience. En effet, la quantité d'anticorps accumulés, ou encore le temps caractéristique mesuré, peuvent donner des informations sur l'état physiologique de la cellule. Par exemple, si une cellule B accumule moins ou plus d'anticorps que les autres à la surface de la goutte, on peut

supposer qu'elle est issue d'un organisme malade. En analysant un grand nombre de couples goutte/cellule, on pourrait déterminer le phénotype d'accumulation d'un type de cellule B, et pouvoir le comparer à des types de cellules B issues d'organisme malade. Il a été montré par exemple que les cellules B issues d'un organisme ayant la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD pour *Graft-versus-Host Disease*) ont une réponse hyper sensible aux antigènes et sont activées très facilement [78]. Dans ce cas, on s'attendrait à une accumulation plus rapide des anticorps sur les gouttes. Ce genre de comparaison entre cinétiques, pour des cellules issues d'organismes en bonne santé ou malade pourrait permettre de mieux comprendre l'origine de ces anomalies, encore mal connue aujourd'hui [78].

Dans le contexte des maladies auto-immunes comme le diabète de type 1 ou le lupus, on peut imaginer pouvoir tester la réponse immunitaire des cellules B vis-à-vis différents antigènes. Ces maladies correspondent à une anomalie du système immunitaire, qui considère comme extérieurs des éléments de l'organisme même, et cherche à les détruire. On pourrait tester la spécificité des récepteurs de cellules B issues d'un organisme malade avec nos gouttes fonctionnalisées par des antigènes sélectionnés.

De même, on pourrait immuniser un organisme malade (une souris par exemple) en lui injectant un vaccin, puis vérifier qu'il est bien immunisé en testant la réponse de ces cellules B vis-à-vis de nos gouttes recouvertes de l'antigène spécifique contenu dans le vaccin. Si les cellules sont activées, cela voudrait dire que l'organisme est bien immunisé. Nos gouttes serait un moyen de tester l'efficacité de la réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène spécifique présent sur une surface mimant des cellules présentatrices d'antigènes.

Une autre application serait intéressante dans le domaine de la fabrication d'anticorps pour des vaccins. En effet, on pourrait envisager de fonctionnaliser les gouttes par des antigènes présents dans un vaccin, de les mettre en contact avec des cellules B (ou T) à l'aide de nos pièges, et d'observer la réponse des cellules. Ainsi, notre système permettrait de tester sur une certaine population de cellules B un type d'antigène présent sur une surface mimant une cellule présentatrice d'antigène. Cela pourrait être utile dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules pour les vaccins.

RÉFÉRENCES

- [1] A. D. Stroock, S. K. W. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezic, H. a Stone, and G. M. Whitesides, "Chaotic mixer for microchannels.," *Science*, vol. 295, no. 2002, pp. 647–651, 2002.
- [2] R. J. Adrian, "Twenty years of particle image velocimetry," in *Experiments in Fluids*, 2005, vol. 39, no. 2, pp. 159–169.
- [3] J. G. Santiago, S. T. Wereley, C. D. Meinhart, D. J. Beebe, and R. J. Adrian, "A particle image velocimetry system for microfluidics," *Exp. Fluids*, vol. 25, no. 4, pp. 316–319, 1998.
- [4] R. Lindken, M. Rossi, S. Grosse, and J. Westerweel, "Micro-Particle Image Velocimetry (microPIV): recent developments, applications, and guidelines.," *Lab Chip*, vol. 9, pp. 2551–2567, 2009.
- [5] P. Joseph and P. Tabeling, "Direct measurement of the apparent slip length," *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 71, no. 3, pp. 1–4, 2005.
- [6] G. Silva, N. Leal, and V. Semiao, "Determination of microchannels geometric parameters using micro-PIV," *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 87, no. 3, pp. 298–306, 2009.
- [7] M. Rossi, R. Lindken, B. P. Hierck, and J. Westerweel, "Tapered microfluidic chip for the study of biochemical and mechanical response at subcellular level of endothelial cells to shear flow.," *Lab Chip*, vol. 9, no. 10, pp. 1403–11, 2009.
- [8] R. Lindken, J. Westerweel, and B. Wieneke, "Stereoscopic micro particle image velocimetry," *Exp. Fluids*, vol. 41, no. 2, pp. 161–171, 2006.
- [9] P. Vennemann, R. Lindken, and J. Westerweel, "In vivo whole-field blood velocity measurement techniques," *Exp. Fluids*, vol. 42, no. 4, pp. 495–511, 2007.
- [10] S. Devasenathipathy, J. G. Santiago, and K. Takehara, "Particle tracking techniques for electrokinetic microchannel flows," *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 15, pp. 3704–3713, 2002.
- [11] Y. Sugii, R. Okuda, K. Okamoto, and H. Madarame, "Velocity measurement of both red blood cells and plasma of in vitro blood flow using high-speed micro PIV technique," *Meas. Sci. Technol.*, vol. 16, no. 5, pp. 1126–1130, 2005.
- [12] Y. Sugii, S. Nishio, and K. Okamoto, "Measurement of a velocity field in microvessels using a high resolution PIV technique," ... *New York Acad. ...*, vol. 336, no. Ldv, pp. 331–336, 2002.
- [13] G. M. Nocera *et al.*, "Fluorescent microparticles fabricated through chemical coating of O/W emulsion droplets with a thin metallic film," *Rsc Adv.*, vol. 4, no. 23, pp. 11564–11568, 2014.
- [14] T. G. Mason and J. Bibette, "Emulsification in Viscoelastic Media," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 77, no. 16, pp. 3481–3484, 1996.
- [15] Y. Xia and G. M. Whitesides, "Soft lithography," *Annu. Rev. Mater. Sci.*, vol. 28, no. 12, pp. 153–184, 1998.
- [16] P. B. Lee, H.; Dellatore, S.M; Miller, W.M; Messersmith, "Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional coating," *Science*, vol. 318, no. 2007, pp. 426–430, 2007.
- [17] S. J. Fleire, J. P. Goldman, Y. R. Carrasco, M. Weber, D. Bray, and F. D. Batista, "B Cell Ligand Discrimination Through a Spreading and Contraction Response," *Science (80-.)*, vol. 312, no. 5774, pp. 738–741, 2006.
- [18] K. M. Spillane and P. Tolar, "B cell antigen extraction is regulated by physical properties of antigen presenting cells," *J. Cell Biol.*, vol. 2, pp. 1–19, 2016.
- [19] K. Murphy, *Janeway's immunobiology*, no. 1. 2014.
- [20] F. D. Batista, D. Iber, and M. S. Neuberger, "B cells acquire antigen from target cells after synapse formation.," *Nature*, vol. 411, no. 6836, pp. 489–94, 2001.

- [21] M. Yuseff, P. Pierobon, and A. Reversat, "How B cells capture , process and present antigens : a crucial role for cell polarity," vol. 13, no. July, 2013.
- [22] F. D. Batista and N. E. Harwood, "The who, how and where of antigen presentation to B cells," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 1, pp. 15–27, 2009.
- [23] a Grakoui *et al.*, "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation.," *Science*, vol. 285, no. 5425, pp. 221–227, 1999.
- [24] M.-I. Yuseff, P. Pierobon, A. Reversat, and A.-M. Lennon-Duménil, "How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 7, pp. 475–86, 2013.
- [25] N. A. Mitchison, "T-cell–B-cell cooperation," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 4, pp. 308–312, 2004.
- [26] M. I. Yuseff *et al.*, "Polarized Secretion of Lysosomes at the B Cell Synapse Couples Antigen Extraction to Processing and Presentation," *Immunity*, vol. 35, no. 3, pp. 361–374, 2011.
- [27] E. Natkanski, W.-Y. Lee, B. Mistry, A. Casal, J. E. Molloy, and P. Tolar, "B Cells Use Mechanical Energy to Discriminate Antigen Affinities," *Science (80-.)*, vol. 340, no. 6140, pp. 1587–1590, 2013.
- [28] L. Johannes, R. G. Parton, P. Bassereau, and S. Mayor, "Building endocytic pits without clathrin," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 16, no. 5, pp. 311–321, 2015.
- [29] P. Pierobon and A. M. Lennon-Duménil, "To use or not to use the force: How B lymphocytes extract surface-tethered antigens," *J. Cell Biol.*, vol. 216, no. 1, pp. 17–19, 2017.
- [30] G. J. Doherty and H. T. McMahon, "Mechanisms of Endocytosis," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 78, no. 1, pp. 857–902, 2009.
- [31] D. J. Müller, J. Helenius, D. Alsteens, and Y. F. Dufrêne, "Force probing surfaces of living cells to molecular resolution," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 5, no. 6, pp. 383–390, 2009.
- [32] E. Natkanski, W.-Y. Lee, B. Mistry, A. Casal, J. E. Molloy, and P. Tolar, "B Cells Use Mechanical Energy to Discriminate Antigen Affinities," *Science (80-.)*, vol. 340, no. 6140, pp. 1587–1590, 2013.
- [33] E. A. Evans and D. A. Calderwood, "Forces and Bond Dynamics in Cell Adhesion," *Science (80-.)*, vol. 316, no. 5828, pp. 1148–1153, 2007.
- [34] W. Helfrich, "Elastic Properties of Lipid Bilayers—Theory and Possible Experiments," *Zeitschrift fur Naturforsch. Tl. C Biochem. Biophys. Biol. Virol.*, vol. 28, pp. 693–703, 1973.
- [35] L. Santos-Argumedo, J. L. Maravillas-Montero, and O. López-Ortega, "Class I myosins in B-cell physiology: Functions in spreading, immune synapses, motility, and vesicular traffic," *Immunol. Rev.*, vol. 256, no. 1, pp. 190–202, 2013.
- [36] F. Vascotto *et al.*, "The actin-based motor protein myosin II regulates MHC class II trafficking and BCR-driven antigen presentation," *J. Cell Biol.*, vol. 176, no. 7, pp. 1007–1019, 2007.
- [37] J. L. Maravillas-Montero, P. G. Gillespie, G. Patino-Lopez, S. Shaw, and L. Santos-Argumedo, "Myosin 1c Participates in B Cell Cytoskeleton Rearrangements, Is Recruited to the Immunologic Synapse, and Contributes to Antigen Presentation," *J. Immunol.*, vol. 187, no. 6, pp. 3053–3063, 2011.
- [38] J. Fattaccioli, J. Baudry, N. Henry, F. Brochard-Wyart, and J. Bibette, "Specific wetting probed with biomimetic emulsion droplets," *Soft Matter*, vol. 4, no. 12, p. 2434, 2008.
- [39] K. Ben M'Barek *et al.*, "Phagocytosis of immunoglobulin-coated emulsion droplets," *Biomaterials*, vol. 51, pp. 270–277, 2015.
- [40] G. I. Taylor, "The Formation of Emulsions in Definable Fields of Flow," *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 146, no. 858, pp. 501–523, 1934.

- [41] H. Gu, M. H. G. Duits, and F. Mugele, "Droplets formation and merging in two-phase flow microfluidics," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, no. 4, pp. 2572–2597, 2011.
- [42] N. Bourouina, J. Husson, F. Waharte, R. B. Pansu, and N. Henry, "Formation of specific receptor-ligand bonds between liquid interfaces," *Soft Matter*, vol. 7, no. 19, pp. 9130–9139, 2011.
- [43] M. Edidin and M. Zuniga, "Lateral diffusion of wild-type and mutant L(d) antigens in L cells," *J. Cell Biol.*, vol. 99, no. 6, pp. 2333–2335, 1984.
- [44] N. Bourouina, J. Husson, C. Hivroz, and N. Henry, "Biomimetic droplets for artificial engagement of living cell surface receptors: The specific case of the T-cell," *Langmuir*, vol. 28, no. 14, pp. 6106–6113, 2012.
- [45] D.-M. Zhu, M. L. Dustin, C. W. Cairo, and D. E. Golan, "Analysis of Two-Dimensional Dissociation Constant of Laterally Mobile Cell Adhesion Molecules," *Biophys. J.*, vol. 92, no. 3, pp. 1022–1034, 2007.
- [46] J. Nilsson, M. Evander, B. Hammarström, and T. Laurell, "Review of cell and particle trapping in microfluidic systems," *Anal. Chim. Acta*, vol. 649, no. 2, pp. 141–157, 2009.
- [47] C. R. White and J. A. Frangos, "The shear stress of it all: the cell membrane and mechanochemical transduction," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 362, no. 1484, pp. 1459–1467, 2007.
- [48] W.-H. Tan and S. Takeuchi, "A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 104, no. 4, pp. 1146–51, 2007.
- [49] S. S. Bithi and S. A. Vanapalli, "Collective dynamics of non-coalescing and coalescing droplets in microfluidic parking networks," *Soft Matter*, vol. 11, no. 25, pp. 5122–5132, 2015.
- [50] A. Huebner *et al.*, "Static microdroplet arrays: a microfluidic device for droplet trapping, incubation and release for enzymatic and cell-based assays," *Lab Chip*, vol. 9, no. 5, pp. 692–698, 2009.
- [51] D. Di Carlo, N. Aghdam, and L. P. Lee, "Single-Cell Enzyme Concentrations, Kinetics, and Inhibition Analysis Using High-Density Hydrodynamic Cell Isolation Arrays Single-Cell Enzyme Concentrations , Kinetics , and Inhibition Analysis Using High-Density Hydrodynamic Cell Isolation Arrays," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 14, pp. 4925–4930, 2006.
- [52] A. M. Skelley, O. Kirak, H. Suh, R. Jaenisch, and J. Voldman, "Microfluidic control of cell pairing and fusion," *Nat. Methods*, vol. 6, no. 2, pp. 147–152, 2009.
- [53] X. Xu, Z. Li, and A. Nehorai, "Finite element simulations of hydrodynamic trapping in microfluidic particle-trap array systems," *Biomicrofluidics*, vol. 7, no. 5, pp. 1–16, 2013.
- [54] D. Molino *et al.*, "Droplets bumpers as mechanical sensors for cell migration under confinement," *BioRxiv*, pp. 1–20, 2016.
- [55] D. Di Carlo, D. Irimia, R. G. Tompkins, and M. Toner, "Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 48, pp. 18892–18897, 2007.
- [56] A. Rev and B. Eng, "HHS Public Access," no. 3, pp. 371–396, 2015.
- [57] J. M. Martel and M. Toner, "Particle Focusing in Curved Microfluidic Channels," *Sci. Rep.*, vol. 3, no. 1, p. 3340, 2013.
- [58] G. Segré and A. Silberberg, "© 1961 Nature Publishing Group," *Nature*, vol. 189, pp. 209–210, 1961.
- [59] J. P. Matas, J. F. Morris, and E. Guazzelli, "Lateral forces on a sphere," vol. 59, no. 1, pp. 59–70, 2004.
- [60] L. R. Huang, "Continuous Particle Separation Through Deterministic Lateral Displacement," *Science (80-.)*, vol. 304, no. 5673, pp. 987–990, 2004.

- [61] D. W. Inglis, J. A. Davis, R. H. Austin, and J. C. Sturm, "Critical particle size for fractionation by deterministic lateral displacement," *Lab Chip*, vol. 6, no. 5, p. 655, 2006.
- [62] T. K. Kim and J. H. Eberwine, "Mammalian cell transfection: The present and the future," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, no. 8, pp. 3173–3178, 2010.
- [63] R. E. Kingston, C. A. Chen, and H. Okayama, "Calcium Phosphate Transfection," in *Current Protocols in Cell Biology*, 2003.
- [64] P. L. Felgner *et al.*, "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 84, no. 21, pp. 7413–7417, 1987.
- [65] T. Y. Tsong, "Electroporation of cell membranes," *Biophysical Journal*, vol. 60, no. 2, pp. 297–306, 1991.
- [66] J. Riedl *et al.*, "Lifeact: A versatile marker to visualize F-actin," *Nat. Methods*, vol. 5, no. 7, pp. 605–607, 2008.
- [67] J. C. Weaver and Y. A. Chizmadzhev, "Theory of electroporation: A review," *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, vol. 41, no. 2, pp. 135–160, 1996.
- [68] S. Rutz and A. Scheffold, "Towards in vivo application of RNA interference - new toys, old problems.," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 6, no. 2, pp. 78–85, 2004.
- [69] A. J. Pratt and I. J. MacRae, "The RNA-induced silencing complex: A versatile gene-silencing machine," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 27, pp. 17897–17901, 2009.
- [70] D. Obino *et al.*, "Actin nucleation at the centrosome controls lymphocyte polarity," *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 10969, 2016.
- [71] J. L. Maravillas-Montero, P. G. Gillespie, G. Patino-Lopez, S. Shaw, and L. Santos-Argumedo, "Myosin 1c Participates in B Cell Cytoskeleton Rearrangements, Is Recruited to the Immunologic Synapse, and Contributes to Antigen Presentation," *J. Immunol.*, vol. 187, no. 6, pp. 3053–3063, 2011.
- [72] N. E. Harwood and F. D. Batista, "Early Events in B Cell Activation," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 28, no. 1, pp. 185–210, 2010.
- [73] M.-I. Yuseff, P. Pierobon, A. Reversat, and A.-M. Lennon-Duménil, "How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 7, pp. 475–486, 2013.
- [74] N. E. Harwood and F. D. Batista, "New Insights into the Early Molecular Events Underlying B Cell Activation," *Immunity*, vol. 28, no. 5, pp. 609–619, 2008.
- [75] P. C. Maity, A. Blount, H. Jumaa, O. Ronneberger, B. F. Lillemeier, and M. Reth, "B cell antigen receptors of the IgM and IgD classes are clustered in different protein islands that are altered during B cell activation.," *Sci. Signal.*, vol. 8, no. 394, p. ra93, 2015.
- [76] J. Yang and M. Reth, "Oligomeric organization of the B-cell antigen receptor on resting cells," *Nature*, vol. 467, no. 7314, pp. 465–469, 2010.
- [77] E. L. Elson, "Cellular mechanics as an indicator of cytoskeletal structure and function.," *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, vol. 17, no. 9, pp. 397–430, 1988.
- [78] J. L. Allen *et al.*, "Increased BCR responsiveness in B cells from patients with chronic GVHD," *Blood*, vol. 123, no. 13, pp. 2108–2115, 2014.

ANNEXES

Partie 1 : fabrication des gouttes métallisées et du canal microfluidique

1) Fabrication des gouttes d'émulsion

- Mélanger manuellement 15 g d'huile de soja avec une solution aqueuse contenant 2,5 g de surfactant (Poloxamer F-68 en proportion initiale de 30 % w/w) et 2,5 g d'un agent épaississant (alginate de sodium, proportion initiale de 4 % w/w).
- Introduire l'émulsion polydisperse obtenue dans une cellule de Couette. L'émulsion est soumise à un taux de cisaillement contrôlé (5000 s^{-1}),
- L'émulsion est diluée de manière à avoir une proportion de 1 % w/w de Poloxamer F-68 dans la phase aqueuse et 5 % w/w d'huile dans le volume total.
- Après plusieurs étapes de décantation et rinçage avec une solution de Poloxamer F-68 à 1 % w/w pour enlever les très petites gouttes, l'émulsion est stockée dans une chambre à température régulée à 12 °C.

2) Ajout des couches de polydopamine et d'argent

Etape 1 : prélèvement des gouttes d'émulsion

- La crème de l'émulsion est rincée deux fois avec une solution tampon Tris (pH = 8,5, 20 mM) contenant un surfactant (Tween 20, proportion initiale de 0,2 % w/w dans la solution tampon Tris). Pour faire ce rinçage, 70 μL de l'émulsion est mélangée à 200 μL de solution tampon de Tris-Tween, le mélange est centrifugé à 4000 rpm pendant 30 sec et la phase aqueuse est retirée avec une micro pipette (200 μL).

Etape 2 : ajout de la dopamine

- Pour la couche de polydopamine, 70 μL de l'émulsion rincée est dispersée dans 100 μL d'une solution de dopamine (concentration initiale de 5 mg/mL dans la solution de Tris-Tween) et 85 μL de Tris-Tween solution est ajoutée. Ensuite, 5 μL de solution de permanganate de potassium est ajoutée (KMnO_4 , concentration initiale de 40 mg/mL dans de l'eau) pour permettre la transformation de la dopamine en polydopamine à la surface des gouttes.
- La solution est homogénéisée avec un rotor (60 rpm) pendant deux heures à température ambiante et isolée de la lumière. Pour enlever les molécules qui n'ont pas réagi, l'échantillon est rincé deux fois comme décrit plus haut, en utilisant 180 μL de la solution de Tris-Tween.

Etape 3 : ajout des ions argents

- Les gouttes sont dispersées dans 50µL d'une solution de nitrate d'argent (AgNO_3 , concentration initiale de 18 mg/mL dans la solution de Tris-Tween). La solution obtenue est homogénéisée avec un rotor (60 rpm) pendant 90 min à température ambiante et isolée de la lumière.
- Dans cette dispersion de 50 µL, 150 µL d'une solution d'acide ascorbique sont ajoutés. La solution d'acide ascorbique a une concentration initiale de 15,5 mg/mL dans la solution de Tris-Tween contenant en plus un surfactant (polyvinylpyrrolidone, proportion initiale de 0,02 % w/w dans la solution de Tris-Tween)

3) Fabrication du canal microfluidique

Les puces sont faites en PDMS (polydiméthylsiloxane) en utilisant les techniques standard de lithographie. Nous fabriquons des moules de résine SU-8 (SU-8 3050, Microchem) sur des supports de silicium, puis nous moulons le PDMS dessus et chauffons à 80°C pendant deux heures. Nous utilisons le PDMS RTV 615 avec un ratio 1:10 d'agent réticulant (RTV 615, Momentive Performance Materials). Nous traitons la surface de PDMS et la lamelle de verre (VWR, 50×24mm) avec un plasma à air (300 mTorr, 40 s) avant de coller les deux parties de la puce. Le canal microfluidique est ensuite connecté avec des tubes à deux petits béciers utilisés pour imposer une pression hydrostatique. Les dimensions du canal sont : largeur (w) = 200µm, hauteur (h) = 65 – 70 µm et longueur (L) = 2 cm.

Partie 2 : fabrication des gouttes fonctionnalisées par des anticorps F(ab')_2 et des pièges microfluidiques

1) Fabrication des gouttes d'émulsion avec de l'huile contenant des phospholipides

- Préparation de l'huile contenant les phospholipides biotinylés DSPE-PEG(2000) biotine (Avanti Polar Lipids, concentration finale de 0,05 mg/mL) : diluer 100 µL d'une solution de DSPE-PEG biotine contenue dans du chloroforme (concentration initiale de 10 mg/mL) dans 20 g d'huile de soja.
- Un mélange composé de 15 g d'huile de soja contenant les phospholipides, de 2,5 g d'une solution d'alginate de sodium (Sigma-Aldrich, proportion initiale massique de 2 % dans l'eau) et de 2,5 g d'une solution de Poloxamer F-68 (Croda France SAS, proportion initiale massique de 30 %) est mélangé dans un bécier à l'aide d'une spatule.
- Le mélange est soumis à un cisaillement constant dans une cellule de Couette (2000 s^{-1}),

affinant ainsi la distribution en taille des gouttes d'émulsion, centrée à 7,2 μm .

- Avant décantation, l'émulsion est diluée de manière à avoir une proportion massique de 1 % de Poloxamer F-68 dans la phase aqueuse et de 5 % en huile au total. Après plusieurs étapes de décantation et rinçage avec une solution de Poloxamer F-68 à 1 % pour enlever les très petites gouttes, l'émulsion est stockée dans une chambre à température régulée à 12 °C.

2) Fonctionnalisation par des $F(ab')_2$ et de la BSA

Etape 1 : prélèvement et lavage de l'émulsion

- Après homogénéisation, 20 μL de l'émulsion obtenue sont introduits dans 200 μL d'une solution phosphate tampon contenant du Tween 20, un surfactant (tampon phosphate, pH = 7,2, 20 mM, proportion massique initiale en Tween 20 de 0,2 %). 40 μL de cette solution intermédiaire sont introduits dans 200 μL de solution tampon phosphate – Tween 20 (appelée PB-Tween dans la suite).

- L'émulsion est lavée 3 fois avec la solution de PB-Tween (centrifugeuse à 4000 tr/min pendant 30 sec, aspiration à la micropipette de 180 μL du sous-nageant et ajout de 200 μL de la solution de PB-Tween).

Etape 2 : ajout de streptavidine

- A l'aide d'une micropipette, 5 μL d'une solution de streptavidine fluorescente (Alexa Fluor, longueur d'onde d'excitation $\lambda_{\text{exc}} = 647 \text{ nm}$, longueur d'onde d'émission $\lambda_{\text{exc}} = 670 \text{ nm}$, concentration initiale de 1 mg/mL) sont ajoutés au tube contenant l'émulsion préalablement lavée.

- Après environ 30 minutes d'agitation au rotor (60 tr/min) à température ambiante et protégée de la lumière, la solution est lavée 4 fois suivant la même méthode que précédemment.

Etape 3 : ajout des $F(ab')_2$

- A l'aide d'une micropipette, 3 μL d'une solution d'anticorps $F(ab')_2$ (Jackson ImmunoResearch, chèvre anti-souris biotine, concentration initiale de 1,6 mg/mL) sont ajoutés au tube contenant l'émulsion préalablement fonctionnalisée par la streptavidine.

- Après environ 30 minutes d'agitation au rotor (60 tr/min) à température ambiante et protégée de la lumière, la solution est lavée 3 fois avec la solution de PB-Tween suivant la même méthode que précédemment.

Etape 3' : ajout de la BSA

- A l'aide d'une micropipette, 5 μL d'une solution de BSA-biotine (Sigma-Aldrich, concentration initiale de 1 mg/mL) sont ajoutés au tube contenant l'émulsion préalablement fonctionnalisée par la streptavidine.

- Après environ 30 minutes d'agitation au rotor (60 tr/min) à température ambiante et protégée de la lumière, la solution est lavée 3 fois avec la solution de PB-Tween suivant la même méthode que précédemment.

3) Ajout d'anticorps secondaires fluorescents

- A la fin de l'étape 3, 1 μL d'une solution d'anticorps secondaires (Alexa Fluor, âne anti-chèvre, concentration initiale de 2 mg/mL, longueur d'onde d'excitation $\lambda_{\text{exc}} = 647 \text{ nm}$, longueur d'onde d'émission $\lambda_{\text{exc}} = 670 \text{ nm}$) est ajouté à la suspension de gouttes fonctionnalisées par des F(ab')_2 .

- Après homogénéisation au rotor à l'abri de la lumière, les gouttes sont lavées avec la solution tampon PB-Tween 3 fois selon la méthode décrite plus haut. Pour cette expérience de caractérisation, la streptavidine utilisée est fluorescente dans le vert ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$).

4) Fabrication des pièges microfluidiques

4.1) Etapes de dessin

- Sous CleWin, dessiner les pièges et la chambre sur une première couche, et les lignes pour les trous sur une seconde couche. Enregistrer le dessin au format cif. Les pièges doivent être dessinés avec des formes fermées et en utilisant un seul trait (voir Figure 45B), car Kloedesign comprendra que l'intérieur de ces formes doit être insolé par le laser. De même pour les chambres.

- Sous Kloedesign, importer les pièges au format cif et les enregistrer en LWI2d (idem pour les lignes).

- Convertir les pièges en polygones.

- Grouper les pièges et la chambre, translater et dupliquer pour faire une matrice (dans tool) (idem pour lignes)

- Dégroupier les pièges et la chambre, sélectionner les pièges et la chambre. De manière à définir les zones d'insolation, sélectionner Fill, puis Validate.

- Générer un fichier LWO pour les pièges et les chambres, et un autre pour les lignes. Pour les pièges, sélectionner Fillings, puis All fillings. Pour les lignes, Pattern.

4.2) Préparation du wafer avec la résine photo-sensible

- Au préalable, mesurer l'épaisseur du wafer avec un micromètre.

- Etaler de la SU-8 2015 par « spin-coating » à 3500 tours/min.

- Pour l'étape de « soft-bake », le wafer est posé sur une plaque chauffante à 70°C pendant 3 minutes de manière à évaporer le solvant de la résine. Puis le wafer est posé sur une plaque chauffante à 90°C pendant 4 minutes (« hard-bake »).

- Laver les traces de résine avec un coton tige imbibé de développeur PGMEA derrière le wafer.

4.3) Ecriture directe avec la Dilase

- Placer le filtre NE06 A-A sur la ligne à 2um. Pour cela, ouvrir le boîtier à droite, la ligne 2um est la première accessible, enlever les filtres non compatibles et placer le bon.

- Vérifier que la clé est tournée vers ON sur le tableau de bord. Lancer le logiciel pilotant la Dilase. Appuyer d'abord sur Initialization, sélectionner le laser de longueur d'onde 375 nm et d'épaisseur 2 µm.

- Placer le wafer sur la platine motorisée, faire le vide.

- Importer les deux fichiers au format LWO dans le logiciel de la Dilase et pour chacun sélectionner une puissance de laser de 100 % et une vitesse de 10 mm/s.

- Indiquer la valeur de l'épaisseur du wafer mesurée et l'épaisseur de la couche de résine SU-8 dans un fichier Excell qui calcule la valeur de la focale du laser. Indiquer cette valeur pour les deux fichiers au format LWO.

- Une fois tous les paramètres enregistrés par le logiciel, le programme est lancé. Pour un wafer contenant quatre puces, chacune d'entre elle contenant 100 pièges, la durée d'écriture est de 3 heures environ. Une fois le programme terminé, le wafer est retiré de la Dilase et les étapes de développement standard de micro-fabrication sont réalisées.

4.4) Développement

- Placer le wafer sur une plaque chauffante à 95°C pendant 4 minutes.

- Placer le wafer dans un bain de développeur PGMEA pendant 3 minutes.
- Observer les motifs au microscope optique et chauffer à 200°C pendant 10 minutes pour éliminer les « craquements » résiduels.

4.5) Fabrication de la puce en PDMS

Les puces en PDMS sont fabriquées selon les techniques standards de lithographie « douce ». Le PDMS liquide (Polydiméthylsiloxane, RTV, proportion 1 : 10 d'agent réticulant) est versé sur le moule en résine. La puce est placée pendant une nuit à 70°C puis le PDMS est démoulé, découpé et collé sur une lame de verre (VWR, 50 × 24 mm) avec un plasma à dioxygène.

5) Génération de gouttes de 14,4 µm de diamètre en microfluidique

- Le moule en résine SU-8 a été fabriqué par écriture direct avec la Dilase. La hauteur des canaux est de 5 µm et la largeur de 8 µm.

- Les puces en PDMS sont fabriquées selon les techniques standards de lithographie « douce ». Le PDMS liquide (Polydiméthylsiloxane, RTV, proportion 1 : 10 d'agent réticulant) est versé sur le moule en résine. La puce est placée pendant une nuit à 70°C puis le PDMS est démoulé, découpé et collé sur une lame de verre (VWR, 50 × 24 mm) avec un plasma à dioxygène. Dès que la puce est scellée, la remplir d'une solution de PVP à 0,2 % en masse à l'aide d'une seringue de manière à maintenir le PDMS hydrophile après plasma.

- La phase huileuse contient les phospholipides biotinylés (concentration de 0,05 mg/mL). La phase aqueuse contient 0,1 % en masse d'alginate de sodium et 0,1 % en masse de Poloxamer F-68. Adapter la puce à un régulateur de pression. Les pressions mises en jeu sont de l'ordre de 300 mbar pour un flux de 1 µL/heure. L'émulsion en sortie de la puce est récupérée dans un eppendorf.

Résumé

Dans le système immunitaire, l'activation d'une cellule B nécessite la reconnaissance spécifique par les récepteurs membranaires des cellules B (RCB) des antigènes portés par cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (macrophages, cellules dendritiques, ...). Cette reconnaissance se traduit par une accumulation de protéines adhésives constituant une structure moléculaire appelée synapse immunologique, à partir de laquelle sont extraits les antigènes. Les mécanismes biologiques impliqués dans l'extraction d'antigènes par les cellules B sont encore mal connus.

Dans notre étude, nous proposons d'utiliser des gouttes d'huile dont la surface est fonctionnalisée par des anticorps, comme substrat pour l'activation des cellules B. Ces gouttes présentent l'intérêt de posséder une interface liquide donc permettant la diffusion des anticorps en surface. De plus, ces gouttes sont potentiellement déformables donc se comportent comme des sondes de force cellulaire. Enfin, les gouttes possédant des tailles comparables aux cellules, elles « miment » l'action des cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

Afin de mettre en contact les gouttes fonctionnalisées avec les cellules B, nous avons fabriqué un réseau régulier de pièges ayant la forme d'un U répartis dans une chambre microfluidique. La forme de cette chambre a été optimisée de manière à garantir un remplissage efficace des pièges.

Le dispositif expérimental mis au point permet de mettre en contact une goutte fonctionnalisée par des anticorps et une cellule B dans plusieurs pièges en parallèle, et d'observer l'évolution du contact dans le temps par microscopie. Nous avons observé que le contact goutte/cellule induisait une accumulation d'anticorps greffés à la goutte au niveau de la zone de contact. La cinétique d'accumulation est mesurée. Des observations des lysosomes des cellules B montrent une polarisation vers la zone de contact, suggérant une réponse de la part de la cellule suite à la reconnaissance spécifique des anticorps.

Abstract

In the immune system, B cell activation is triggered by the specific binding of the B cell receptors (BCR) with the antigens present on "antigen-presenting cells" (APC) like macrophage, dendritic cells, ... This recognition leads to an accumulation of adhesive proteins at the contact. This molecular structure is called immune synapse, from which the antigens are extracted by the B cell. The precise biological mechanisms implied in the extraction of antigens are still unknown.

In our work, we propose to use antibody-coated oil droplets as substrates for the activation of B cells. These droplets have the advantage to have a liquid surface, allowing the antibodies-coated diffusion at their surface. Moreover, these droplets are potentially deformable, so they behave as cellular force probes. Lastly, the droplets have the same size of the B cells, so they mimic the antigen-presenting cells.

In order to put in contact the B cells with the droplets, we fabricated a regular network of microfluidic traps with U-shape in a microfluidic chamber. The shape of the chamber has been optimized to guaranty a good trapping efficiency.

Using the traps, we have been able to put into contact one antibody-coated droplet with one B cell in several traps in parallel, and to observe the contact in function of time by fluorescence microscopy. We observed an accumulation of the antibodies coated on the droplet at the surface of contact. The kinetics of accumulation has been measured and the time scale of accumulation has been deduced. Also, observations with fluorescence showed a polarization of the lysosomes near the contact, suggesting a B cell response.

