



Étude des interactions entre des substrats microstructurés et des cellules endothéliales pour le développement d'un biocapteur plasmonique pour le diagnostic précoce de conditions pathologiques

Zhor Khadir

► To cite this version:

Zhor Khadir. Étude des interactions entre des substrats microstructurés et des cellules endothéliales pour le développement d'un biocapteur plasmonique pour le diagnostic précoce de conditions pathologiques. Optique [physics.optics]. Université Paris-Saclay; Université de Sherbrooke (Québec, Canada), 2022. Français. NNT : 2022UPAST035 . tel-03665218

HAL Id: tel-03665218

<https://pastel.hal.science/tel-03665218>

Submitted on 11 May 2022

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.

Étude des interactions entre des substrats microstructurés et des
cellules endothéliales pour le développement d'un biocapteur
plasmonique pour le diagnostic précoce de conditions
pathologiques.

*Study of interactions between micropatterned substrate and endothelial cells for the
fabrication of a plasmonic biochip for early diagnosis of pathological conditions.*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay et de l'université de Sherbrooke

École doctorale n° 575, Electrical, optical, bio : physics and engineering (EOBE)
Spécialité de doctorat : Optique et photonique
Graduate School : Université Paris-Saclay. Référent : Institut d'Optique

Thèse préparée dans la (ou les) unité(s) de recherche : **Laboratoire Charles Fabry (CNRS UMR
8501)**, et le **Laboratoire Nanotechnologies et Nanosystèmes (CNRS UMI 3463)**

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 29 mars 2022, par

Zhor KHADIR

Composition du Jury :

Elodie ENGEL BIDAL Maître de Conférences, SyMMES, Université Grenoble Alpes	Rapporteuse
Gaetan LAROCHE Professeur titulaire, Université Laval	Rapporteur
Alice NICOLAS Chargée de recherche CNRS, LTM	Examinatrice et Présidente
Philippe GOGOL Maître de Conférences, Université Paris-Saclay / Professeur associé Université de Sherbrooke	Examineur
Michael CANVA Directeur de recherche, Université Paris-Saclay / Professeur associé, Université de Sherbrooke	Co-Directeur de thèse
Paul CHARETTE Professeur titulaire, Université de Sherbrooke	Co-Directeur de thèse
Michel GRANDBOIS Professeur titulaire, Université de Sherbrooke	Co-Directeur de thèse
Julien MOREAU Maître de Conférences, LCF, Université Paris-Saclay / Professeur associé, Université de Sherbrooke	Co-encadrant de thèse

À mes parents.

Titre : Étude des interactions entre des substrats microstructurés et des cellules endothéliales pour le développement d'un biocapteur plasmonique pour le diagnostic précoce de conditions pathologiques.

Mots clés : Biocapteur, imagerie par résonance des plasmons de surface (SPRI), imagerie cellulaire, microstructuration, chimie de surface, cellules endothéliales, diagnostic médical.

1 RESUME

L'avancement des découvertes de médicaments et du diagnostic repose en partie sur le développement et l'évolution de technologies innovantes capables de représenter avec précision les activités biologiques associées aux processus pharmacodynamiques et pharmacocinétiques. Parmi ces outils de détection, l'imagerie par résonance des plasmons de surface (SPRI) permet de quantifier l'activité biologique de modèles cellulaires cultivés sur des biopuces plasmoniques adaptées. Dans ce projet, le développement et la validation de biopuces plasmoniques de nouvelle génération sont proposés dans le but de générer des modèles de couches cellulaires normalisés *in vitro*, afin de quantifier, en temps réel et sans marquage, l'intégrité de la barrière endothéliale. L'intégrité de l'endothélium vasculaire dépend de la cohésion des cellules endothéliales qui constituent la monocouche cellulaire. Cette cohésion est renforcée par des jonctions endothéliales dites d'adhérence entre les cellules, principalement constituées de VE-cadhérines. La quantification de l'intégrité de cette couche cellulaire est particulièrement importante dans l'étude et le diagnostic de conditions pathologiques associées à un stress inflammatoire et à l'exposition à des toxines bactériennes comme dans le cas du sepsis. L'association de ces conditions inflammatoires à une perte de l'intégrité de l'endothélium vasculaire permet de proposer, à terme, une application pour le développement d'un biocapteur pour le diagnostic précoce de conditions pathologiques tel le sepsis.

Dans le but de développer des monocouches cellulaires endothéliales sur des biopuces plasmoniques comme modèles cellulaires *in vitro*, il faudrait induire un phénotype de couche cellulaire imperméable et fonctionnelle où les cellules génèrent des jonctions avec le substrat et entre elles. Au cours de ces dernières années, dans les études en biomédical et en ingénierie des tissus, la microstructuration a été définie comme un outil puissant permettant de restaurer les informations spatiales et structurelles perdues *in vitro* et d'essayer de se rapprocher le plus des conditions spatiales *in vivo*. Ainsi, le contrôle de l'adhésion et l'autoassemblage de ces cellules au niveau du substrat

métallique est effectuée en combinant des techniques de chimie de surface sur or et de photolithographie douce pour la structuration de ces surfaces à différentes échelles. Ces travaux de thèse se basent sur l'hypothèse que l'optimisation de l'autoassemblage et de l'adhésion de cellules individuelles selon des microstructures hexagonales peut induire l'émergence d'un modèle cellulaire endothélial *in vitro* normalisé et fonctionnel. Dans un premier temps, une étude systématique des conditions permettant la génération de couches cellulaires normalisées et fonctionnelles est réalisée. De façon générale, il s'agira d'étudier la contribution de l'adhésion surfacique des cellules en conjonction avec les paramètres de microstructuration de la surface afin de mieux comprendre et de moduler les comportements de confinement et de connectivité des cellules. Le confinement des cellules dans les microstructures correspond à l'observation de exactement une cellule individuelle confinée dans une microstructure. Ensuite, les espacements entre les microstructures sont variés afin de les rapprocher et d'identifier les paramètres de connectivité permettant d'induire la formation de jonctions endothéliales entre les cellules. La fonctionnalité et la performance des biopuces obtenues seront validées par imagerie plasmonique dans un contexte de diagnostic de conditions pathologiques en quantifiant les perturbations d'une couche endothéliale modèle exposée à la thrombine.

Dans ces travaux de thèse, un modèle de monocouche cellulaire *in vitro* constitué de 3 hexagones a été fabriqué. Il s'agit d'une première preuve de concept qui confirme que la stratégie de contrôler géométriquement le confinement des cellules puis leur connectivité en optimisant les paramètres d'autoassemblage et d'adhésion, permet d'induire une monocouche cellulaire fonctionnelle comme modèle normalisé endothélial *in vitro*. Il s'agit d'une première brique pour la fabrication, in fine, d'un tissu endothélial plus complet constitué de plus d'hexagones, pour le développement de biopuces plasmoniques de nouvelle génération pour les diagnostics précoces de conditions pathologiques tel le sepsis.

Ce doctorat est mené en cotutelle entre l'Université de Sherbrooke et l'Université Paris-Saclay. La fabrication des substrats d'or et des masques en chrome/quartz pour les techniques de photolithographie douce ainsi que le traitement des images sont effectués à l'Institut Interdisciplinaire de l'Innovation Technologique (3IT), l'expertise en imagerie plasmonique est fournie par le laboratoire Charles Fabry (LCF) à l'Institut d'Optique Graduate School en France (IOGS), et les expériences de chimie de surface, de microfabrication, de cultures cellulaires et de validation des biopuces sont effectuées au département de pharmacologie de Sherbrooke (IPS).

Title : Study of interactions between micropatterned substrate and endothelial cells for the fabrication of a plasmonic biochip for early diagnosis of pathological conditions.

Keywords : plasmonic biochip, cell micropatterning, surface plasmon resonance imaging (SPRI), surface chemistry, endothelial cells, early diagnosis, medical application.

2 ABSTRACT

The continued success of drug discovery and diagnosis partly relies on the development and evolution of innovative technologies capable of accurately representing the biological activities associated with pharmacodynamic and pharmacokinetic processes. Among these detection tools, we are interested in surface plasmon resonance imaging (SPRI), which quantifies the biological activity of cellular models grown on adapted plasmonic biochips. In this project, we are proposing the development and validation of next generation plasmonic biochips to generate standardized cell layer models *in vitro*, in order to label-free quantify, in real time, the integrity of the endothelial barrier. The integrity of the vascular endothelium depends on the cohesion of the endothelial cells that compose the cell monolayer. This cohesion is reinforced by endothelial junctions called adherens junctions between cells, mainly composed of VE-cadherins. Quantifying the integrity of this cell layer is particularly important in the study and diagnosis of pathological conditions associated with inflammatory stress and exposure to bacterial toxins such as in the case of sepsis. Based on the association of these inflammatory conditions with a loss of the integrity of the vascular endothelium, we propose a further application for the development of a biosensor for the early diagnosis of pathological conditions such as sepsis.

In order to develop endothelial cell monolayers on plasmonic biochips as cellular models *in vitro*, we wanted to induce an impermeable and functional cell layer phenotype where cells generate junctions with the substrate and between them. In recent years, in biomedical and tissue engineering studies, micropatterning has been defined as a powerful tool for restoring spatial and structural information lost *in vitro* and trying to get as close as possible to spatial conditions *in vivo*. Thus, we aimed to control the adhesion and self-assembly of cells at the level of the metal substrate, by combining techniques of surface chemistry on gold and soft photolithography for the patterning of these surfaces at different scales.

This thesis work is based on the hypothesis that optimization of the self-assembly and adhesion of individual cells according to hexagonal microstructures can induce the

emergence of a normalized and functional endothelial cell model *in vitro*. First, we carried out a systematic study of experimental conditions allowing the generation of a normalized and functional cellular monolayers. In general, we would like to study the contribution of the surface adhesion of cells in conjunction with the surface micropatterning parameters in order to better understand and modulate the confinement and connectivity behaviors of cells. Confinement of cells into microstructures is the observation of exactly one individual cell confined within a microstructure. Next, we vary the spacings between the microstructures in order to bring them closer together and identify the connectivity parameters that induce the formation of endothelial junctions between the cells. The functionality and performance of the resulting biochips will be validated by plasmonic imaging in the context of the diagnosis of pathological conditions by quantifying the perturbations of an endothelial cellular model exposed to thrombin.

In this thesis work, we fabricated an *in vitro* cellular monolayer model made up of 3 hexagons. This is a first proof of concept which confirms that the strategy of geometrically controlling the confinement of cells and their connectivity by optimizing the self-assembly and adhesion parameters, makes it possible to induce a functional cell monolayer as a normalized endothelial model *in vitro*. This is a first step towards the ultimate fabrication of a more complete endothelial tissue made up of more hexagons, for the development of new generation plasmonic biochips for the early diagnosis of pathological conditions such as sepsis.

This doctorate was carried out jointly between the University of Sherbrooke and the University of Paris-Saclay. The fabrication of gold substrates and chrome / quartz masks for soft photolithography techniques as well as image processing were carried out at the Interdisciplinary Institute for Technological Innovation (3IT), expertise in surface plasmon resonance imaging was provided by the Charles Fabry laboratory (LCF) at the Institut d'Optique Graduate School in France (IOGS), and experiments of surface chemistry, micropatterning, cell cultures and biochip validation were performed at the Pharmacology department of Sherbrooke (IPS).

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mes directeurs de thèse Michael Canva, Paul Charette et Michel Grandbois pour leur encadrement, pour leur soutien tout au long de ces années de thèse et pour les échanges scientifiques et réflexions nées de ces discussions. Grâce à votre confiance, j'ai acquis beaucoup d'autonomie et une bonne organisation de travail qui me serviront dans la suite de ma carrière.

Je remercie tous les membres du jury de thèse : merci à Alice Nicolas d'avoir accepté de présider ma soutenance de thèse. Merci à Elodie Engel Bidal et Gaetan Laroche d'avoir accepté de rapporter cette thèse. Merci également à Philippe Gogol d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je souhaite particulièrement remercier Julien Moreau. Merci pour ton encadrement sans faille, malgré la distance. Merci d'avoir été très présent, très compréhensif et de m'avoir beaucoup aidée à surmonter les défis de fin de thèse.

Un grand merci à Laurence Convert pour ta disponibilité, tes appels et ton soutien moral. Merci d'avoir toujours été présente et à l'écoute.

Je tiens à remercier mes collègues du laboratoire Charles Fabry (LCF) et un grand merci à Patrick Georges, directeur du LCF, pour son aide afin de régler tous les problèmes administratifs liés à la création de l'Université Paris-Saclay. Je souhaite également remercier mes collègues de l'équipe de biophotonique du 3IT et l'ensemble du personnel de salles blanches. Merci à Jean-François Bryche pour ton aide et d'avoir été présent à tout moment pour discuter du projet. J'aimerai également remercier mes collègues du laboratoire de pharmacologie (IPS) et particulièrement Ulrike Froelich pour ton aide en culture cellulaire. Merci également à Jean Lainé pour son aide en plateforme de microscopie.

Merci à tous ceux qui m'ont encadré et aidé scientifiquement et administrativement tout au long de cette thèse en cotutelle qui a présenté de nombreux avantages mais également des difficultés liées au déplacement entre les deux pays. Merci à Aline Cerf d'avoir pris le temps de m'accueillir dans son laboratoire à Toulouse et d'être un modèle féminin dans le monde de la recherche.

J'aimerai remercier ma famille et mes amis. Je remercie infiniment mes parents. Merci maman de savoir être cette oreille attentive, cette voix réconfortante et merci pour ces mots que tu sais toujours trouver. Merci papa pour tout ce que tu m'as transmis en force de caractère, curiosité et amour pour la science et le sport. Par ton intelligence et ton honnêteté, tu as toujours été un modèle pour moi. Merci de m'avoir soutenue et poussée dans mes études et merci à vous d'avoir fait de moi la femme que je suis aujourd'hui. Merci à mon frère, merci de m'avoir soutenue pendant toutes ces années d'études et merci d'être toujours là pour moi. Merci à toute ma famille. Merci à Isabelle et Yves. Merci d'avoir été présents, d'avoir toujours trouvé les bons mots pour m'encourager et me motiver. Merci pour tout votre soutien et votre aide ! Merci à tous

les Schmidt et les Jourdan. Grâce à vous, j'ai l'immense chance d'avoir une famille en France. Merci de m'avoir aussi vite et aussi bien intégrée.

Merci à tous mes amis. Merci aux copains de Marrakech, de Bordeaux et de Paris, qui malgré la distance, m'ont apporté leur soutien et leur amour et ont réussi à maintenir ces amitiés profondes qui durent depuis de nombreuses années maintenant. Merci à la petite famille sherbrookoise d'avoir été ma plus grande motivation de retourner au Québec. Merci pour tous les moments incroyables, vous avez réussi à me faire aimer la rando et la neige !

À la mémoire d'Anna, ton courage, ta force et ton sourire à toute épreuve ont été un exemple.

Pour finir, merci à celui qui a rendu beaucoup de toutes ces belles choses possibles. Merci à toi mon Victor d'avoir porté avec moi toutes les difficultés de cette thèse, qu'elles aient été professionnelles, administratives ou morales. Aujourd'hui, cette réussite je la partage avec toi. Te dire merci ne suffirait pas pour tous ces moments difficiles, où même quand je n'y croyais plus, tu as su trouver les bons mots pour me relever. Même quand j'avais beaucoup de résultats à traiter et quantifier, tu m'as aidée, tu as pris le temps de m'apprendre à coder. Par ta patience et ta pédagogie, tu m'as donné envie de continuer à apprendre à coder en Python. Tu as été un pilier, et par ton soutien et ton amour tu m'as poussée vers le haut.

TABLE DES MATIERES

1	Résumé	ii
2	Abstract.....	iv
	Remerciements	vi
	Table des matieres.....	viii
	Chapitre 1 : Chapitre introductif	1
	Introduction générale et problématique de recherche	1
	Objectifs de thèse et organisation du manuscrit.....	3
➤	Question de recherche	3
➤	Stratégies mises en place.....	4
➤	Organisation du manuscrit	5
	Chapitre 2 : Revue bibliographique	11
	Section 1 : Contexte biologique du projet de recherche.....	11
I-	Architecture d'un tissu endothélial	11
II-	Contexte physiologique de l'endothélium vasculaire	16
III-	Dysfonctions endothéliales : un marqueur pathologique dans le cas du sepsis	18
	Section 2 : Etat de l'art des techniques de microstructuration de surface pour des applications cellulaires	21
I-	La microstructuration : un outil d'étude de la physiologie cellulaire	21
II-	Techniques de microstructuration de la surface.....	24
	Section 3 : Mesure de la réponse cellulaire en surface	30
I-	Biocapteur pour la mesure cellulaire.....	30
II-	Biodétection par marquage	31
III-	Fonctionnement d'un biocapteur SPR	34
	Chapitre 3 : Contrôle de l'auto-assemblage des cellules endothéliales	46
	Section 1 : Contrôle de l'adhésion de cellules endothéliales individuelles.....	46
I-	Développement du protocole de microstructuration pour le contrôle de l'adhésion cellulaire.....	47
II-	Confinement des cellules dans les microstructures en fonction des surfaces des régions adhésives	58
	Section 2 : De la cellule individuelle à un groupe de cellules endothéliales	67
I-	Identification d'une gamme d'espacements pour la formation de jonctions cellule/cellule.....	68
II-	Prolifération des cellules en fonction du nombre de microstructures	69
III-	Choix du groupe de 3 hexagones comme unité du modèle cellulaire <i>in vitro</i>	70
	Section 3 : Matériels et méthodes	73
I-	Culture cellulaire.....	73
II-	Marquages des jonctions et des noyaux	74
III-	Techniques d'imagerie.....	74
IV-	Traitement des images	75
	Chapitre 4 : Evaluation du phénotype endothélial du modèle in vitro.	79
	Section 1 : Evaluation du phénotype structurel des groupes de 3 hexagones	79
I-	Protocole expérimental de formation des jonctions intercellulaires	80
II-	Quantification du phénotype statique dans les groupes de 3 hexagones	83
III-	Déplacement des noyaux et polarité des cellules.....	88
	Section 2 : évaluation du phénotype dynamique du groupe de 3 hexagones	89
I-	Protocole expérimental pour l'imagerie par microscopie SPR de cellules vivantes.....	90
II-	Mesure de la réponse cellulaire après injection de la thrombine	91
III-	Conclusion et discussion	108
	Section 3 : Matériels et méthodes	109
I-	Problématique des études d'imagerie en vivant.....	109
II-	Imagerie par microscopie SPR.....	116
III-	Acquisition et traitement des données des groupes de 3 hexagones.....	122
	Chapitre 5 : Perspectives et conclusion	125
	PERSPECTIVES	125
	CONCLUSION GENERALE	129

Chapitre 6 : Annexes.....	133
Section 1 : Schémas récapitulatifs des photomasques chrome/quartz fabriqués dans cette thèse	133
Section 2 : Résultats préliminaires obtenus avec la microstructuration par microcontact printing ..	143
Section 3: Optimisation du microscope SPR	148
Section 4 : Autres résultats de mesure des réponses cellulaires par SPRI	150
I- Marquages des noyaux des cellules vivantes pour l'imagerie SPR	150
II- Mesure de la réponse des cellules dans les assemblages à 3 hexagones après injection de LPS	152
Section 5 : Résultats préliminaires de futurs travaux	157
I- Résultats des assemblages à 7 hexagones	157
II. La nanostructuration combinée à la microstructuration.....	174
III- Etudes sur des cellules de cultures primaires de l'endothélium cornéen.....	187
REFERENCES.....	190
LISTE DES FIGURES.....	207

CHAPITRE 1 : CHAPITRE INTRODUCTIF

Ces travaux de thèse ont été effectués en cotutelle entre l'Université Paris-Saclay en France et l'Université de Sherbrooke au Québec au Canada. Les expériences ont été effectuées entre 3 laboratoires - le laboratoire Charles Fabry (LCF) à l'Institut d'Optique Graduate school en France - le laboratoire de Nanotechnologies et Nanosystèmes (LN2) au sein de l'Institut Interdisciplinaire de l'Innovation technologique (3IT) à Sherbrooke, au Québec, Canada – l'Institut de Pharmacologie de Sherbrooke situé dans la faculté de médecine et des sciences de la santé à Fleurimont au Québec, Canada. Le laboratoire dans lequel les travaux ont été effectués sont précisés tout au long de ce manuscrit.

INTRODUCTION GENERALE ET PROBLEMATIQUE DE RECHERCHE

L'objectif de ces travaux de thèse est de contrôler et d'optimiser l'auto-assemblage et l'adhésion de cellules endothéliales individuelles sur des substrats d'or, pour la fabrication d'une monocouche cellulaire endothéliale comme modèle cellulaire *in vitro*. Ainsi, le développement et la validation de biopuces plasmoniques de nouvelle génération sont proposés, permettant de générer des modèles cellulaires normalisés afin de quantifier, en temps réel et sans marquage, l'intégrité de l'endothélium. La quantification de l'intégrité est particulièrement importante dans l'étude et le diagnostic de conditions pathologiques associées à un stress inflammatoire et à l'exposition de toxines bactériennes, par exemple dans le cas du sepsis.

Ce manuscrit présente deux études expérimentales : la première étude permet de contrôler l'adhésion de cellules endothéliales individuelles et de les confiner selon des microstructures de géométries données sur des substrats d'or. La deuxième étude consiste à induire de la connectivité entre ces cellules confinées afin de les contraindre à former des jonctions cellule/cellule entre elles, spécifiques à une monocouche cellulaire endothéliale. La fabrication d'une monocouche cellulaire endothéliale fonctionnelle permettrait d'évaluer et idéalement de moduler la fonction de la barrière endothéliale dans un modèle cellulaire in-vitro.

Il est important de commencer par définir les différentes échelles en biologie afin de pouvoir contextualiser cette étude. En effet, dans une échelle croissante, le corps humain est constitué d'atomes (taille : 10^{-10}m , 0,1 nm ou 1 Å), qui eux-mêmes sont regroupés en molécules (taille : 10^{-10}m à 10^{-7}m). L'ensemble de ces molécules constitue la cellule définie comme l'unité de base des organismes vivants (taille : 10^{-6}m à 10^{-4}m). Les cellules forment des tissus (taille : 10^{-4}m à 10^{-2}m) qui se regroupent pour donner des organes (taille : 10^{-2}m à 10^{-1}m) caractérisés par une fonction principale. Un

ensemble d'organes interagissent et définissent un système spécifique comme le système nerveux, respiratoire, digestif... La coopération entre ces systèmes définit l'organisme.

Cette étude se situant à l'échelle biologique des cellules, il est également possible de les définir comme des objets micrométriques en 3D qui s'auto-assemblent afin de former un tissu. Cette approche impliquant l'assemblage de petites unités afin d'élaborer un objet plus complet, comme un puzzle, est considérée comme une approche dite ascendante ou « bottom-up ». La stratégie inverse descendante appelée « top-down » permet l'analyse de l'ensemble d'un système avant d'en isoler les composantes et d'essayer de simplifier son étude.

Dans ces travaux, ces deux approches sont combinées. En effet, dans un premier but de contrôler l'adhésion de cellules endothéliales individuelles sur des substrats d'or, la cellule individuelle est considérée comme un ensemble global. Cette approche descendante permet d'isoler la cellule dans un environnement où les variations de son cytosquelette et de ses composantes sont réduites par rapport à quand elle est entourée d'autres cellules voisines comme dans une boîte de pétri à confluence par exemple. Ensuite, dans un deuxième temps, les paramètres d'auto-assemblage des cellules sont optimisés et donc une approche ascendante est choisie, permettant d'induire de la connectivité entre les cellules afin d'obtenir un objet plus complet qui constitue, à terme, le tissu endothélial.

Une telle étude avec des cellules révèle plusieurs limitations liées à la dynamique du vivant. En effet, les cellules sont en constante évolution : elles grossissent, se divisent, prolifèrent, se déplacent, communiquent avec leur environnement et entre elles. L'ensemble de ces événements mettent en avant une certaine hétérogénéité du système qui fait que les expériences sont difficilement reproductibles et comparables les unes aux autres. De plus, lorsque les cellules sont mises en culture sur un substrat d'or plan, elles adhèrent aléatoirement et ne forment pas systématiquement des adhésions avec les cellules qui les entourent (Figure 1)

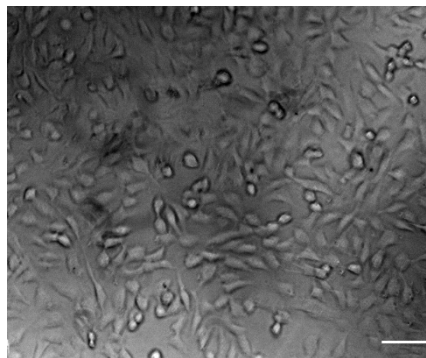


Figure 1: Adhésion aléatoire de cellules endothéliales EAhy926 sur une lame d'or après 2 jours d'adhésion dans un incubateur.

La microstructuration est un outil puissant permettant de contrôler l'architecture d'une

cellule et d'un tissu *in-vitro*, afin d'augmenter la reproductibilité des expériences en normalisant par la géométrie des patrons adhésifs. Il existe des techniques de microstructuration combinant des traitements par chimie de surface, et de la microfabrication par photolithographie. Cette stratégie impose aux cellules d'adhérer dans des régions adhésives selon des géométries données.

Ainsi, en ayant un outil d'ingénierie des tissus tel que la microstructuration cellulaire, il est possible de contrôler et moduler les conditions expérimentales cellulaires afin de reproduire un grand nombre de mesures et de pouvoir les comparer et les quantifier. Le concept de détection d'un élément biologique tel une cellule sur un dispositif et de sa conversion en un signal facilement mesurable est la définition même d'un biocapteur. Il existe une large variété de biocapteurs développés dans différents domaines : biomédecine, pharmaceutique, environnement...

Dans cette étude, le choix de l'or pour les substrats sur lesquels les cellules adhèrent est principalement lié à son effet plasmonique, sa stabilité chimique et sa biocompatibilité. Ainsi la mesure de la réponse cellulaire sur les substrats d'or microstructurés se fait par résonance des plasmons de surface (SPR), dans le but de développer, à terme, un biocapteur cellulaire SPR pour l'évaluation de la fonction de la barrière endothéliale dans un modèle cellulaire *in-vitro*.

OBJECTIFS DE THESE ET ORGANISATION DU MANUSCRIT

➤ Question de recherche

Les approches diagnostiques utilisées aujourd'hui pour la détection de conditions pathologiques associées à un stress inflammatoire et à l'exposition de toxines bactériennes comme le sepsis à titre d'exemple, essaient principalement de cibler une ou plusieurs composantes biochimiques impliquées dans la réponse de l'hôte et associées aux processus d'inflammation, de coagulation et d'homéostasie vasculaire. Cette pharmacothérapie intervient pour éviter et contrôler l'apparition d'œdèmes et la défaillance associée aux organes. Plusieurs études démontrent l'évidence du rôle physiopathologique de la dysfonction de l'endothélium dans le sepsis et la défaillance d'organes. Par conséquent, l'étude et la caractérisation de cette perte d'intégrité de l'endothélium est d'un grand intérêt dans le développement d'un biocapteur de diagnostic précoce de ces conditions pathologiques et du sepsis plus précisément.

Dans le cadre des études par imagerie plasmonique sur l'intégrité de la barrière endothéliale, nous souhaitons contrôler et optimiser l'auto-assemblage et l'adhésion des cellules endothéliales par structuration de la surface du substrat à différentes échelles afin d'évaluer, et idéalement de moduler la fonction de la barrière endothéliale dans un modèle cellulaire *in vitro*.

Ainsi le but de ce projet est de se concentrer sur le développement d'un biocapteur qui n'est pas spécifique à la détection de biomarqueurs spécifiques, mais qui permet de détecter la perte fonctionnelle de la barrière endothéliale dans un contexte de diagnostic du choc septique.

➤ Stratégies mises en place

Dans ce chapitre sont présentés les objectifs fixés et les stratégies mises en place selon l'état de l'art pour répondre à la question de recherche du projet d'étude.

Objectif 1 : Développer un protocole de microstructuration pour le contrôle de l'adhésion cellulaire sur des substrats d'or.

En prenant en compte la sensibilité des cellules aux contraintes géométriques et mécaniques de leur microenvironnement et en se basant sur les différentes études principalement effectuées sur des cellules individuelles, deux techniques différentes de microstructuration ont été testées, tout en tenant compte des limitations liées à la fabrication d'un biocapteur plasmonique reproductible et à faible coût. Ainsi l'adhésion des cellules est contrôlée en combinant des techniques de photolithographie douce et de chimie de surface afin de contraindre géométriquement les cellules à adhérer au substrat fonctionnalisé et, ce, en modulant les surfaces des régions adhésives, et les surfaces des régions non-adhésives qui les séparent. Les caractérisations aux différentes étapes du protocole permettent d'évaluer l'efficacité de la chimie de surface utilisée, ainsi que la microstructuration par illumination Deep-UV pour des applications cellulaires.

Objectif 2 : Identifier les paramètres de confinement des cellules endothéliales individuelles en fonction des surfaces des régions adhésives.

L'étude de l'adhésion surfacique des cellules en fonction des paramètres de microstructuration de la surface permet de mieux comprendre les comportements de confinement cellulaires. Ainsi la distribution du nombre de cellules en fonction de la surface des régions adhésives est quantifiée, et la gamme de surfaces pour laquelle le confinement d'une cellule individuelle est observé par microstructure est identifiée.

Objectif 3 : Identifier les paramètres de connectivité entre les cellules endothéliales individuelles qui induisent la formation de jonctions cellule/cellule.

Les espacements entre les microstructures où les cellules sont confinées sont modulés. La variation des surfaces non adhésives au niveau des espacements entre les microstructures permet d'identifier une gamme d'espacements pour laquelle un contact entre les cellules via des jonctions intercellulaires est observé. Cependant, travailler

avec des cellules vivantes présente plusieurs défis liés à la dynamique des cellules (division, prolifération...). Cette dynamique rend le contrôle des paramètres expérimentaux plus complexes. Ainsi pour réduire ces paramètres du vivant, un modèle cellulaire plus réduit, constitué de 3 microstructures hexagonales a été choisi pour cette étude.

Objectif 4 : Quantifier le phénotype structurel et fonctionnel de la monocouche cellulaire endothéliale fabriquée.

Les objectifs précédents ont permis d'identifier les paramètres de confinement et de connectivité permettant d'obtenir une cellule endothéliale individuelle par microstructure dans les groupes de 3 hexagones. Cependant, il est primordial de vérifier si ces cellules confinées dans les 3 hexagones forment des jonctions intercellulaires entre elles. En effet, *in vivo*, les cellules endothéliales sont connectées par des jonctions spécifiques au niveau des zones d'adhérence appelées des VE-cadhérines. Ainsi, pour confirmer le phénotype endothélial structurel du groupe de 3 hexagones, les jonctions entre les cellules endothéliales ont été fixées et marquées avec des marqueurs fluorescents spécifiques de VE-cadhérines. D'autre part, ce phénotype endothélial fonctionnel peut être quantifié, en temps réel et sans marquage, en utilisant la microscopie SPR. Enfin, en mesurant la réponse des cellules à différents stimuli référencés dans la littérature comme la thrombine ou les lipopolysaccharides (LPS) on peut valider que le groupe de 3 hexagones est bien une première brique pour la fabrication d'un modèle de monocouche cellulaire endothéliale *in vitro*.

➤ Organisation du manuscrit

L'objectif principal de ces travaux de thèse est de contrôler et d'optimiser l'auto-assemblage et l'adhésion des cellules endothéliales par microstructuration de la surface dans un cadre des études par imagerie plasmonique sur l'intégrité de la barrière endothéliale. Le manuscrit de ce projet de thèse est composé de 5 chapitres. Le premier chapitre introduit la question de recherche principale du projet et les stratégies mises en place pour y répondre. Dans le second chapitre, le contexte biologique de nos travaux sur les cellules endothéliales est introduit. En effet, les études sur l'endothélium présentent un intérêt particulier dans le domaine de la santé, par le fait que les dysfonctionnements de la monocouche cellulaire endothéliale peuvent être des marqueurs de plusieurs pathologies. Ensuite, un état de l'art des études pionnières et existantes de microstructuration de surface pour des applications cellulaires et leurs problématiques est présenté. Et finalement, la dernière section traite sur les biocapteurs pour la mesure cellulaire et principalement des biocapteurs SPR pour l'imagerie cellulaire comme utilisé plus loin dans ces travaux.

Dans les 2 chapitres suivants, les résultats obtenus sont organisés tout au long de cette thèse selon les 4 grands objectifs décrits précédemment comme stratégies mises en

place. Le chapitre 3 répond aux 3 premiers grands objectifs et contient 3 sections : la première section décrit le protocole de microstructuration qui a été développé pendant ces travaux de thèse et qui permet de contrôler l'auto-assemblage des cellules endothéliales sur des substrats d'or selon des géométries de patrons adhésifs, en combinant des techniques de chimie de surface et de microstructuration par illumination Deep-UVs. Dans cette même section, les paramètres de confinement de 2 types cellulaires endothéliaux dans les microstructures en fonction des surfaces des régions adhésives sont étudiés. La deuxième section de ce chapitre met en avant les problématiques rencontrées au cours de ces travaux de thèse et qui sont liées à la dynamique des cellules vivantes. En effet, afin de réduire cette hétérogénéité liée à la division et la prolifération cellulaire, le modèle d'étude a été réduit à un groupe de 3 hexagones comme première brique du modèle cellulaire endothélial *in vitro* à fabriquer. Dans le cadre de ces travaux, il a été démontré que le confinement des cellules endothéliales dans les microstructures ne dépendait pas uniquement des surfaces des régions adhésives, mais également des surfaces des régions non adhésives au niveau des espacements entre les microstructures. Les résultats présentés dans ce chapitre permettent d'identifier une gamme de surfaces adhésive et une gamme d'espacements pour lesquels le confinement de exactement 1 cellule par microstructure a été observé. La dernière section de ce chapitre détaille les matériels et méthodes utilisés pour obtenir et traiter l'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre.

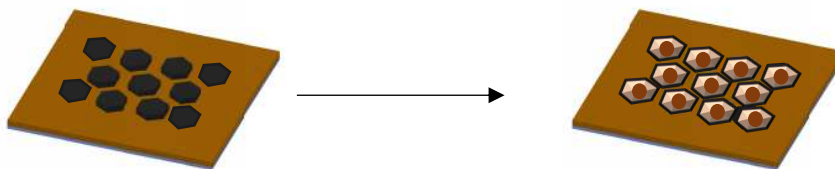
Le chapitre 4 répond au dernier objectif de la stratégie mise en place pour répondre à la question de recherche. Ce chapitre se compose de 3 sections : la première section porte sur l'évaluation du phénotype endothélial statique des groupes de 3 hexagones fabriqués. Le phénotype endothélial statique consiste à vérifier la présence de jonctions cellule/cellule spécifique à l'endothélium et principalement composées de VE-cadhérines. Cette quantification est effectuée en fixant et en marquant les jonctions intercellulaires avec des marqueurs fluorescents spécifiques aux molécules VE-cadhérines. Ainsi les paramètres expérimentaux cellulaires et géométriques pour la fabrication d'une monocouche cellulaire endothéliale ont été identifiés. La deuxième section du chapitre 4 permet de démontrer l'évaluation du phénotype dynamique du groupe de 3 hexagones. Le phénotype dynamique correspond à l'activité cellulaire mesurée sur des monocouches cellulaires endothéliales en présence d'agents externes. Ces réponses cellulaires sont déjà référencées dans la littérature après stimulation avec de la thrombine ou des lipopolysaccharides (LPS) par exemple. Le but de cette section de chapitre est de mesurer la réponse des groupes de 3 hexagones fabriqués par microscopie SPR, en temps réel et sans marquage, afin de confirmer le phénotype endothélial fonctionnel du groupe de 3 hexagones développés dans le cadre de ces travaux de thèse. La dernière section décrit la méthodologie et les matériels utilisés dans ce chapitre.

Le dernier chapitre discute des perspectives et des ouvertures à la suite de ces premiers résultats obtenus. La première partie présente des résultats préliminaires obtenus avec des assemblages à 7 hexagones. Cependant pour les groupes de 7 hexagones, il est important d'optimiser les paramètres expérimentaux afin d'obtenir d'une part un bon rendement d'occupation des microstructures par les cellules et d'autre part d'induire de la connectivité entre ces dernières afin qu'elles forment des jonctions entre elles, tout

en réduisant les probabilités de division et de prolifération. Pour cela, différentes solutions ont été testées afin de respecter ce compromis entre le remplissage des microstructures par les cellules et la formation de jonctions endothéliales entre elles avec un faible taux de division. Parmi ces solutions, l'ajout d'agents pharmacologiques a été proposé, comme l'inhibiteur de la ROCK appelé Y-27632 et un stabilisateur de jonctions appelé sphingosine-1-phosphate (S1P). Des premiers tests effectués sur les groupes de 3 hexagones ont été effectués, permettant de vérifier que l'ajout de ces agents pharmacologiques optimise l'obtention d'une cellule par hexagone dans les assemblages à 3 après le temps initial d'adhésion, suivi par la formation de jonctions entre les cellules avec un taux de division moins élevé. L'évaluation du phénotype dynamique des cellules dans les groupes de 3 hexagones après ajout des agents pharmacologiques reste cependant à déterminer et sera également discuté. D'autres géométries possibles pour les hexagones sont proposés, qui pourraient être plus optimales pour respecter le compromis discuté ci-dessus en se basant sur l'état de l'art. La deuxième partie présente de précédents travaux de l'équipe démontrant que la nanostructuration est un outil qui permet d'améliorer la résolution de l'imagerie SPR pour les mesures d'activités cellulaires. Dans cette partie, les premiers résultats obtenus combinant la microstructuration et la nanostructuration pour l'imagerie SPR de cellules endothéliales sont présentés. Finalement la dernière partie traite de plusieurs ouvertures du projet sur des applications de biocapteur pour le maintien du phénotype structurel et fonctionnel de cellules endothéliales de la cornée comme modèle cellulaire en culture primaire, et de biocapteur pour une application clinique et médicale, développé, à terme, pour le diagnostic précoce de maladies infectieuses.

SCHEMA RECAPITULATIF DES DIFFERENTES ETAPES EXPERIMENTALES DES TRAVAUX DE THESE

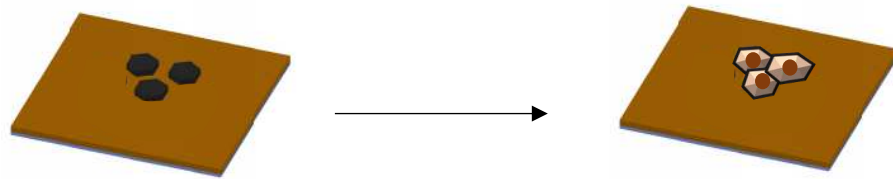
- 1- Mise en place du protocole de microstructuration pour le contrôle de l'adhésion cellulaire. [Chapitre 3 : Section 1, I]
- 2- Confinement des cellules dans les microstructures [Chapitre 3 : Section 1, II]



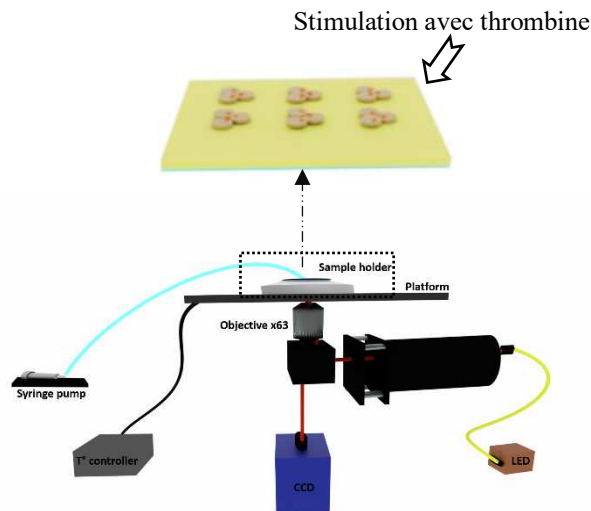
3- Choix des groupes de 3 hexagones. [Chapitre 3 : Section II, II]

4- Confinement des cellules dans les groupes de 3 hexagones en fonction des espacements entre les microstructures [Chapitre 3 : Section II, III]

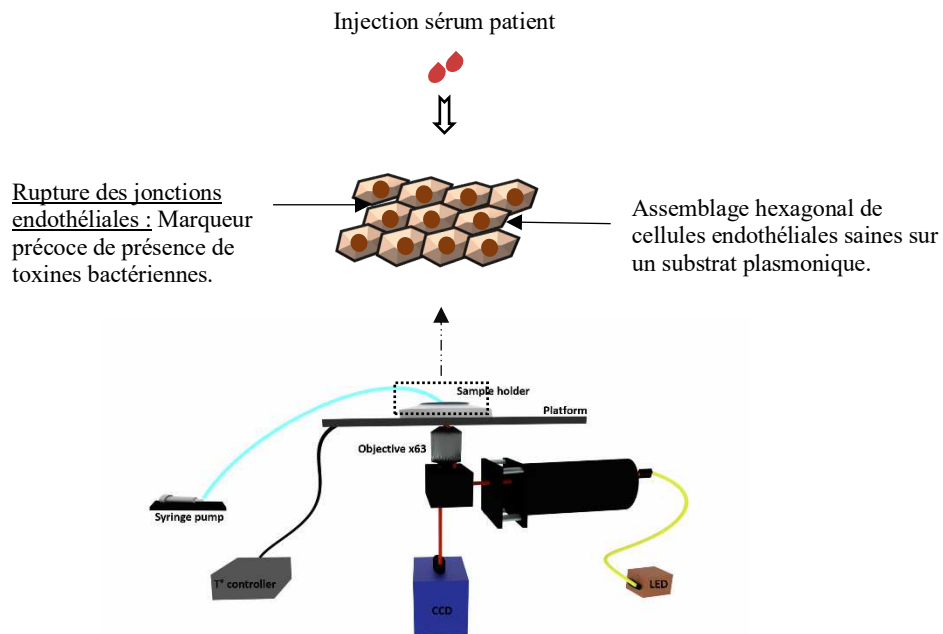
5- Validation du phénotype structurel endothélial des groupes de 3 hexagones. [Chapitre 4: Section I]



6- Evaluation du phénotype dynamique endothélial des groupes de 3 hexagones par imagerie SPR. [Chapitre 4 : Section II]



7- Développement d'un biocapteur de diagnostic précoce de conditions pathologiques tel le sepsis. [Chapitre 5 : Section II]



CHAPITRE 2 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

SECTION 1 : CONTEXTE BIOLOGIQUE DU PROJET DE RECHERCHE

I- Architecture d'un tissu endothélial

Un tissu représente un ensemble de cellules différenciées formant des jonctions entre elles et avec la matrice extracellulaire (MEC) que ce soit in vivo dans le tissu ou en culture cellulaire. L'intégrité d'un tissu est assurée par la cohésion des cellules qui le composent. L'endothélium est une monocouche cellulaire tapissant la face interne des vaisseaux de l'organisme. Les cellules endothéliales sont des cellules aplaties de 0.1 – 10 μm d'épaisseur, 50 – 70 μm de longueur et 10 – 30 μm de largeur¹. Elles sont à l'interface entre les éléments du sang dont elles doivent favoriser la circulation et la paroi vasculaire. Elles sont situées en contact étroit avec une phase liquide appelée le plasma et reposent sur une structure solide qui est la matrice extracellulaire (MEC) de la membrane basale. Les cellules endothéliales adhèrent à la MEC et entre elles grâce à des glycoprotéines transmembranaires appelées des molécules d'adhésion cellulaire (CAM). Ces molécules d'adhésion ont été regroupées, en fonction de leur structure en 4 grandes familles : les intégrines, les cadhérines, les sélectines et les immunoglobulines².

A- Adhésions focales

Les cellules endothéliales adhèrent à la MEC au niveau de régions différenciées de la membrane plasmique très riches en molécules d'adhérence comme les intégrines qui régulent les interactions entre le cytosquelette et la MEC. Les intégrines interviennent dans l'adhésion cellulaire en interagissant avec des ligands extracellulaires tels les fibronectines, laminines et collagène de la MEC. La fibronectine est la principale molécule d'adhésion. Il s'agit d'un dimère glycoprotéique formé de deux sous-unités unies par deux ponts disulfures près de leur extrémité carboxy-terminale³. Chaque sous-unité est composée de domaines distincts spécialisés dans la liaison soit à des macromolécules de la MEC ou aux cellules. Il a été montré que le domaine de liaison aux cellules possède une séquence particulière d'arginine, glycine et acide aspartique : Arg-Gly-Asp appelée séquence RGD indispensable à la liaison de la fibronectine à ses récepteurs cellulaires (Figure 2).

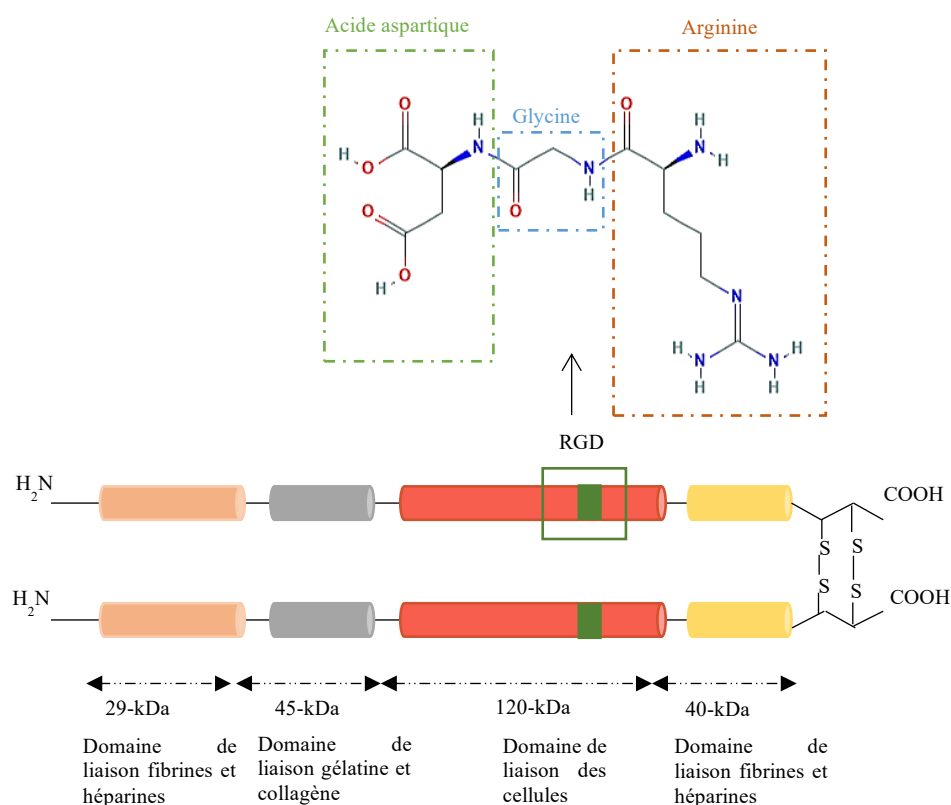


Figure 2: Structure de la fibronectine⁴ et structure chimique du tripeptide RGD (Pubchem CID 104802).

Lorsque les cellules adhèrent à un substrat, elles s'ancrent à l'aide de plaques de protéines appelées contacts focaux. C'est à ce niveau de la MEC que les intégrines sont très concentrées et se regroupent au niveau de ces points d'ancrages. Elles sont liées directement aux macromolécules de la matrice et indirectement à des protéines associées au cytosquelette (Vinculine...) elles-mêmes reliées aux microfilaments d'actine de la cellule⁵ (Figure 3). Dans l'environnement tissulaire, les cellules sont constamment soumises à des contraintes mécaniques soit par leur propre contractilité soit par des facteurs environnementaux extérieurs, ce qui inclut des changements locaux au niveau des sites d'adhésion. Ainsi ces points focaux d'adhésion permettent à la cellule de sentir son environnement mécanique et de transmettre des forces contractiles sur la MEC afin de maintenir une intégrité mécanique du tissu par une régulation de l'adhésion.

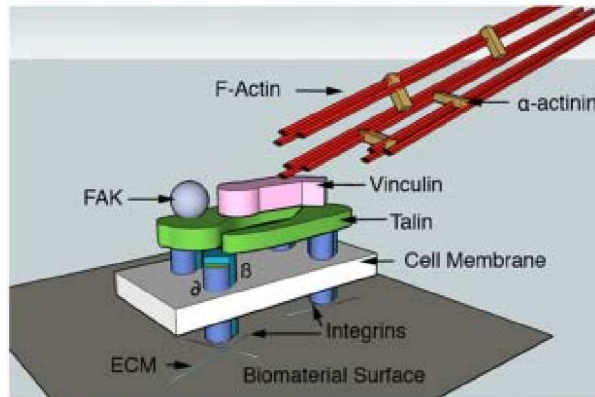


Figure 3: Interactions moléculaires pour la formation de points focaux d'adhésion⁶.

B- Adhésions cellule/cellule

Pour assurer la cohésion du tissu endothélial, les cellules adhèrent les unes aux autres via des jonctions adhérentes, des jonctions serrées complètement étanches et des jonctions communicantes ou nexus assurant la communication entre deux cellules voisines et l'échange d'ions, de métabolites divers et de facteurs de régulation. Les jonctions intercellulaires endothéliales sont nécessaires à l'intégrité du système vasculaire. Il existe trois types de jonctions intercellulaires endothéliales : les jonctions d'adhérence principalement composées par les protéines transmembranaires VE-cadhérines qui sont reliées aux filaments d'actine du cytosquelette cellulaire via des protéines cytoplasmiques α -caténines, β -caténines et p120-caténines. Les jonctions serrées formées des protéines transmembranaires occludines, claudines et JAM qui sont également liées aux filaments d'actine via des protéines intercellulaires de la famille zonula occludens (ZO-1, ZO-2 et ZO-3). Et finalement les jonctions de communication de type GAP qui sont des canaux formant des communications directes entre les cellules endothéliales (Figure 4). Ces jonctions jouent un rôle dans l'intégrité du tissu endothélial et dans sa fonction de barrière⁷. Elles sont également impliquées dans d'autres fonctions cellulaires comme la croissance par inhibition de contact, la migration, l'apoptose et la formation de nouveaux vaisseaux cellulaires⁸.

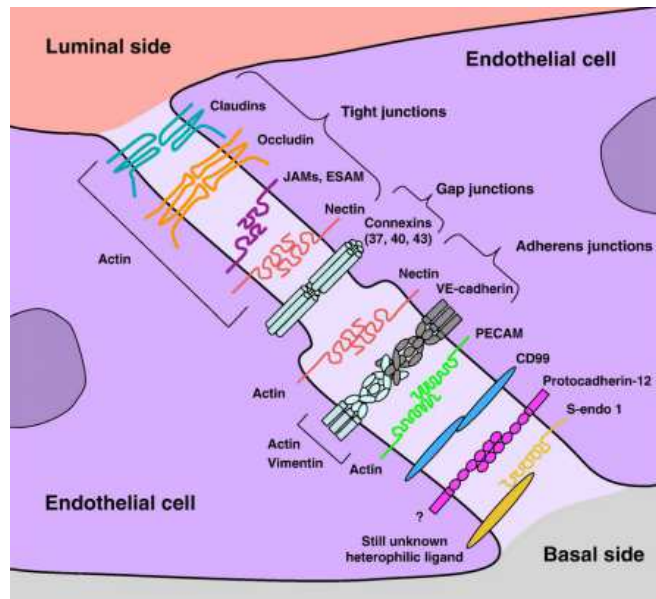


Figure 4: Différentes protéines d'adhésion entre les différentes jonctions des cellules endothéliales⁹.

L'ensemble des adhésions des cellules endothéliales avec la MEC et elles-mêmes assurent la cohésion et la faible perméabilité de la barrière endothéliale séparant le sang de l'espace interstitielle. La communication entre ces deux derniers se fait par le transfert de molécules et de substances circulantes à travers cette barrière en passant par voie transcellulaire à travers la cellule endothéliale ou paracellulaire entre des cellules adjacentes à travers les jonctions interendothéliales¹⁰.

C- Cytosquelette cellulaire

Le cytosquelette est un réseau complexe de polymères fibreux qui s'étend dans tout le cytoplasme et la face interne de l'enveloppe nucléaire¹¹. Il s'agit d'une structure très dynamique en perpétuelle réorganisation selon les différents événements cellulaires (division, migration ...). Le cytosquelette est composé de 3 types de fibres : les microfilaments dont principalement les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires.

Les microtubules sont des polymères de tubuline et jouent un rôle central dans de multiples fonctions comme la division cellulaire et la séparation des chromosomes, les trafics intracellulaires et la morphogénèse cellulaire. Les filaments intermédiaires sont les éléments les moins dynamiques du cytosquelette. Ils sont formés de kératine et maintiennent la forme de la cellule et la structure du cytosquelette.

Les protéines d'actine sont les plus abondantes dans les cellules. Les monomères d'actine se polymérisent pour former une double hélice filamenteuse (Figure 5 – a, b).

Les microfilaments d'actine forment des structures dynamiques remodelées en permanence et qui peuvent être stabilisées par des protéines associées. Le cytosquelette d'actine est impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires dont la motilité, la contraction, la sécrétion et la réponse à des changements extracellulaires. Il existe différentes architectures du cytosquelette d'actine se mettant en place grâce à des protéines spécifiques à chaque réseau comme les lamellipodes, les filopodes, le cortex d'actine et les fibres de stress^{11,12}.

- Les lamellipodes représentent un des exemples de réseaux d'actine branchés (Figure 5 – c). Ils sont formés grâce à l'intervention de complexes protéiques tel que le complexe Arp2/3 et de protéines régulatrices comme Rac1, et permettent la motilité cellulaire lors de la migration.
- Les filopodes sont formés par un faisceau parallèle serré d'actine (Figure 5 – d). Ces extensions membranaires permettraient à la cellule de sentir son microenvironnement local.
- Le cortex d'actine est un réseau de filaments d'actine interconnectés par des protéines de pontage comme la filamine et la fimbrine (Figure 5 – e). Ce réseau se caractérise par sa viscoélasticité liée aux réarrangements des liens entre les filaments d'actine en fonction des déformations subies.
- Les fibres de stress correspondent à des paquets de filaments d'actine associés à des myosines II (Figure 5 – f). Les myosines ont une activité ATPasique en fonction de leurs interactions avec les filaments d'actine. Ils agissent comme des moteurs moléculaires pouvant se déplacer tout le long des filaments d'actine permettant ainsi la contraction des fibres et donc de la cellule¹³.

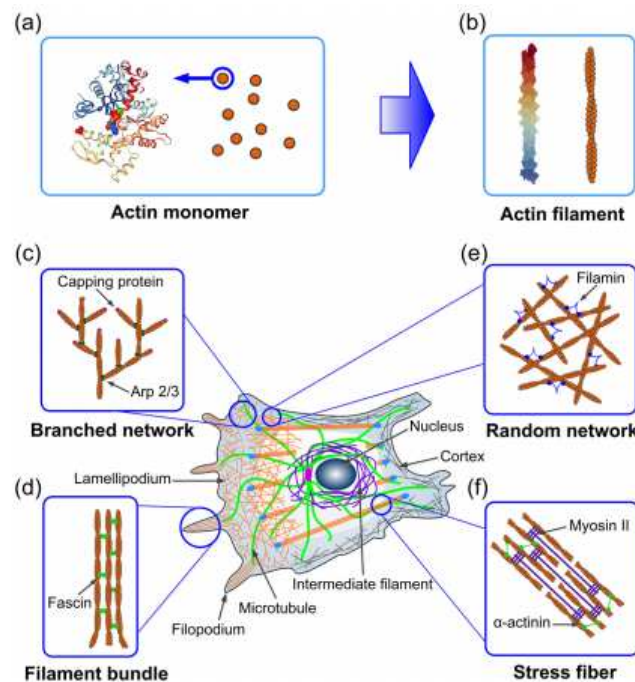


Figure 5: Schéma des composantes structurelles principales du cytosquelette dans une cellule

eucaryote e les différentes architectures des filaments d'actine et leurs protéines spécifiques¹⁴. **a**, Structure cristalline de l'actine globulaire. **b**, Structure de tous les atomes et schéma d'un simple filament d'actine. **c**, Réseau branché d'actine formé grâce au complexe protéique Arp 2/3 et des protéines de coiffage qui bloquent la croissance du filament. **d**, Fagot de filaments parallèles d'actine et leurs protéines de réticulation (fascine). **e**, Module d'actine interconnectée par des protéines de pontage (filamine..). **f**, Les fibres de stress correspondant à des fagots d'actine antiparallèles réorganisés sous l'effet de la myosine et de l' α -actinine.

II- Contexte physiologique de l'endothélium vasculaire

Les vaisseaux sanguins acheminent le sang dans le système circulatoire et permettent le transport des nutriments, de l'oxygène et de l'eau vers les cellules de l'organisme. Les trois principaux types de vaisseaux sanguins sont les artères, les veines et les capillaires. Ils sont constitués de 3 tuniques concentriques : la tunique externe ou l'adventice, la tunique moyenne ou la média et la tunique interne aussi appelée intima ou endothélium (Figure 6). L'endothélium vasculaire est formé d'une monocouche de cellules endothéliales tapissant la face interne de tous les vaisseaux sanguins.

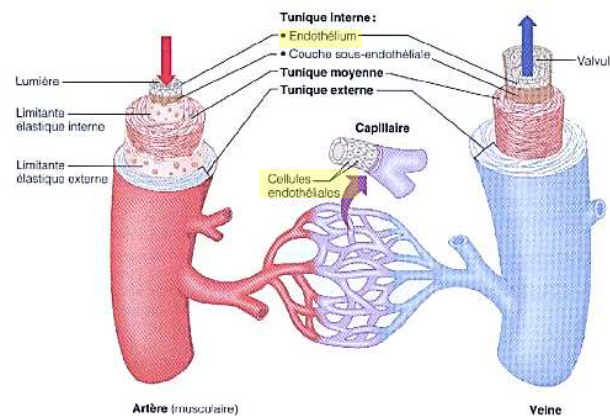


Figure 6: Structure du réseau vasculaire¹⁵.

A- Fonctions physiologiques de l'endothélium

Les cellules endothéliales entretiennent des relations importantes avec leur environnement et sont capables de moduler leurs structures et leurs fonctions rapidement en réponse à des signaux physiques et mécaniques¹⁶. Cette grande plasticité des cellules endothéliales assure un dynamisme crucial à l'endothélium lui permettant d'accomplir diverses fonctions homéostatiques clés au sein de l'organisme.

L'endothélium a différentes fonctions physiologiques. Il forme une barrière active semi-perméable entre le sang et les tissus sous-jacents régulant le trafic cellulaire et

macromoléculaire. Une régulation précise de la perméabilité endothéliale est cruciale afin de maintenir une homéostasie circulatoire et les fonctions physiologiques de différents organes¹⁰. La perméabilité paracellulaire est régulée par les jonctions intercellulaires endothéliales et principalement par la régulation des VE-Cadhérines au niveau des jonctions adhérentes¹⁷. L'endothélium joue un rôle dans le contrôle du diamètre vasculaire et du débit sanguin appelé le tonus vasomoteur. Ce flux sanguin repose sur une balance entre des facteurs de vasoconstriction et de vasodilatation du système vasculaire¹⁸. Il est également impliqué dans les processus d'angiogenèse et dans le maintien de la fluidité sanguine¹⁹. En effet, l'endothélium permet de conserver le sang dans un état fluide grâce à un équilibre physiologique entre un processus coagulant pouvant entraîner des accidents thrombotiques et un processus de fibrinolyse pouvant entraîner des risques hémorragiques²⁰. De plus, l'endothélium est impliqué dans la réponse immunitaire innée. Lors d'une agression tissulaire par des agents pathogènes, les cellules endothéliales recrutent des leucocytes et permettent leur migration vers les sites infectés en exprimant à leur surface des molécules d'adhérence membranaires comme des sélectines, des intégrines et des immunoglobulines qui régulent le trafic des leucocytes circulants du compartiment sanguin vers le compartiment tissulaire²¹.

B- Hétérogénéité structurelle et phénotypique de l'endothélium

Les cellules endothéliales de l'organisme ont des propriétés communes mais leurs phénotypes varient en réponse à un programme génétique ou selon l'environnement dans lequel elles sont, leur conférant un rôle distinct dans les différents vaisseaux, tissus et organes, que ce soit dans leur état physiologique, ou en cas d'agression²². Cette complexité est tellement importante que les histologistes parlent d'endothéliums au pluriel. Ainsi l'endothélium, localisé sur la face interne de tous les types de vaisseaux présente une hétérogénéité fonctionnelle et phénotypique induite par une hétérogénéité structurelle²³. En effet, au niveau du cerveau par exemple, il s'agit d'un endothélium continu en monocouche pavimenteuse serrée et imperméable jouant un rôle de barrière appelée la barrière hémato-encéphalique²⁴. Alternativement, les cellules endothéliales peuvent former une couche discontinue avec des fenêtres intercellulaires comme dans le rein ou la moelle osseuse permettant un échange rapide des fluides et des cellules²⁵. Ces cellules endothéliales présentent une géométrie polygonale *in-vivo* et *in-vitro*. L'endothélium cornéen par exemple, situé dans la surface postérieure de la cornée, présente un modèle géométrique hexagonal parfait en nid d'abeilles (honeycomb) (Figure 7), lui permettant de jouer un rôle de barrière entre le stroma et l'humeur aqueuse et de réguler constamment l'hydratation du stroma²⁶. Un endothélium cornéen sain se définit par des paramètres de densité, de morphologie et de structure des cellules qui le composent. Le moindre changement au niveau de ces paramètres peut correspondre à un état pathologique cornéen²⁷.

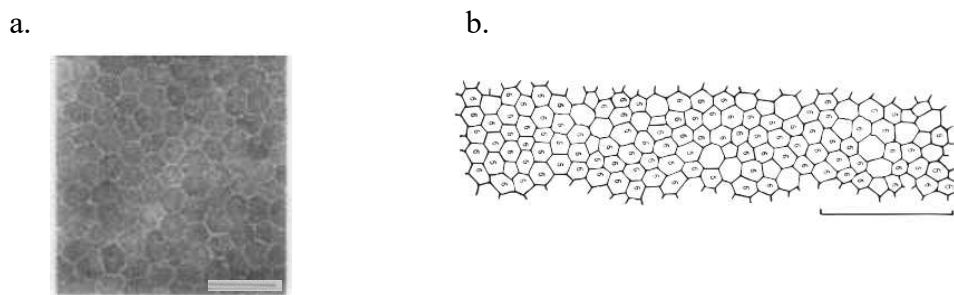


Figure 7: **a**, Image en microscopie électronique à balayage d'un endothélium cornéen de lapin (barre d'échelle = 60 μm)²⁸. **b**, Arrangement en mosaïque du centre d'un endothélium cornéen d'un jeune adulte caucasien montrant des cellules hexagonales à 6 cotés communicants (barre d'échelle = 135 μm)²⁹.

III- Dysfonctions endothéliales : un marqueur pathologique dans le cas du sepsis

A- Définition des dysfonctions endothéliales et du sepsis

Une infection est le résultat de l'agression d'un organisme par une bactérie, un virus, un parasite ou un champignon dont résulte une réponse inflammatoire liée à la présence de l'agent pathogène ou à l'invasion du tissu. En effet, suite à une agression par un agent infectieux, de nombreuses réponses faisant partie de la réaction immunitaire innée sont déclenchées afin de circonscrire le foyer infectieux, limiter les lésions, éliminer le pathogène et démarrer le processus de réparation tissulaire³⁰. En général, il est connu que l'endothélium est impliqué dans plusieurs pathologies, soit en tant que facteur pathophysiologique déterminant, ou en tant que victime d'un dommage collatéral³¹. Les dysfonctions endothéliales se définissent comme une atteinte des fonctions régulatrices de l'endothélium et se caractérisent entre autres par un dérèglement entre les substances anti- et pro-coagulantes, les médiateurs anti- et pro-inflammatoires et un déséquilibre de la balance vasodilatation et vasoconstriction¹⁸. L'ensemble de ces altérations et dérèglements entraînent l'apparition de pathologies provoquant souvent des dommages au niveau des parois vasculaires. Quant aux lésions physiques de l'endothélium, elles sont principalement causées par de l'hypertension artérielle, mais aussi par des facteurs à risques comme le diabète, le tabagisme et l'obésité qui prédisposent à des maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose³², l'insuffisance cardiaque³³, les syndromes respiratoires aigus³⁴ et le sepsis³⁵.

Le sepsis est un problème de santé majeur entraînant une dysfonction d'organes mettant en jeu le pronostic vital avec un taux de mortalité supérieur ou égal à 10%. Le sepsis peut évoluer en choc septique au cours duquel les anomalies circulatoires, cellulaires et métaboliques sont associées à une mortalité plus élevée (40%) que le sepsis³⁶. Le choc septique est considéré comme une succession biologique d'événements survenant

extrêmement rapidement après l'introduction anormale dans l'organisme d'un composant étranger d'origine infectieuse. L'endothélium vasculaire est le site prédominant de ces interactions³⁷, ce qui engendre des lésions microvasculaires, des thromboses définies par la formation d'un caillot dans un vaisseau sanguin, la perte de l'intégrité du tissu endothélial (fuites capillaires), le tout entraînant une circulation insuffisante du sang vers différents organes tel le cœur, le cerveau, le foie... Les patients atteints de sepsis qui ne sont pas diagnostiqués en urgence ont une augmentation des risques de mortalité de 7,6% chaque heure³⁸. Afin de faire un diagnostic précoce de sepsis, Il est donc nécessaire de développer un moyen de détection rapide qui viendrait compléter le diagnostic clinique du médecin afin d'éviter que le cas d'un patient atteint de sepsis évolue en choc septique et d'augmenter ses chances de survie.

B- Dysfonctions endothéliales dans le cas du sepsis

Le sepsis induit des modifications phénotypiques de l'endothélium résultant en des modifications fonctionnelles et structurelles de ce dernier provoquant des dommages tissulaires : on parle alors de dysfonctions endothéliales. Les endotoxines de différents antigènes comme les lipopolysaccharides (LPS) pour les bactéries Gram-négatives stimulent les macrophages et les monocytes qui vont libérer des facteurs de nécrose tumorale (TNF- α) résultant en une cascade de libération de cytokines pro-inflammatoires. Une réponse immunitaire normale à une infection bactérienne est basée sur une balance entre les médiateurs pro et anti-inflammatoires. Dans le cas du sepsis, il y a une libération excessive de cytokines pro-inflammatoires : facteur de nécrose tumorale (TNF- α) et l'interleukine (IL-1 β) qui mènent à la production de médiateurs toxiques qui vont endommager le feuillet endothélial provoquant des modulations phénotypiques traduits par des changements de structure, une fragmentation cytoplasmique ou un détachement³⁹. Ces médiateurs inflammatoires libérés par les leucocytes augmentent le passage en apoptose des cellules endothéliales⁴⁰. Celles-ci expriment des molécules d'adhérences (ICAM-1 et VCAM-1) permettant le recrutement des leucocytes circulants et des plaquettes, ce qui rend l'endothélium pro-adhésif et amplifie la production de molécules pro-inflammatoires et pro-coagulantes. Chez l'homme septique, une étude a montré que plus le taux de molécules d'adhérences ICAM-1 était élevé, plus la mortalité et le nombre d'organes atteints étaient importants⁴¹. L'altération de la barrière endothéliale favorise le passage des cellules, des médiateurs inflammatoires et du plasma vers le secteur interstitiel (Figure 8). Les modifications structurelles induisent donc des changements fonctionnels dans la régulation de l'homéostasie et dans la garantie de la perméabilité et de l'intégrité de la barrière endothéliale. Cette dysfonction endothéliale provoque des altérations vasculaires dans le cas du choc septique empêchant les cellules endothéliales de maintenir leur tonus vasculaire et induisant des fuites capillaires avec une diminution du volume intravasculaire, la formation d'œdèmes dans les organes impliqués et la mort⁴².

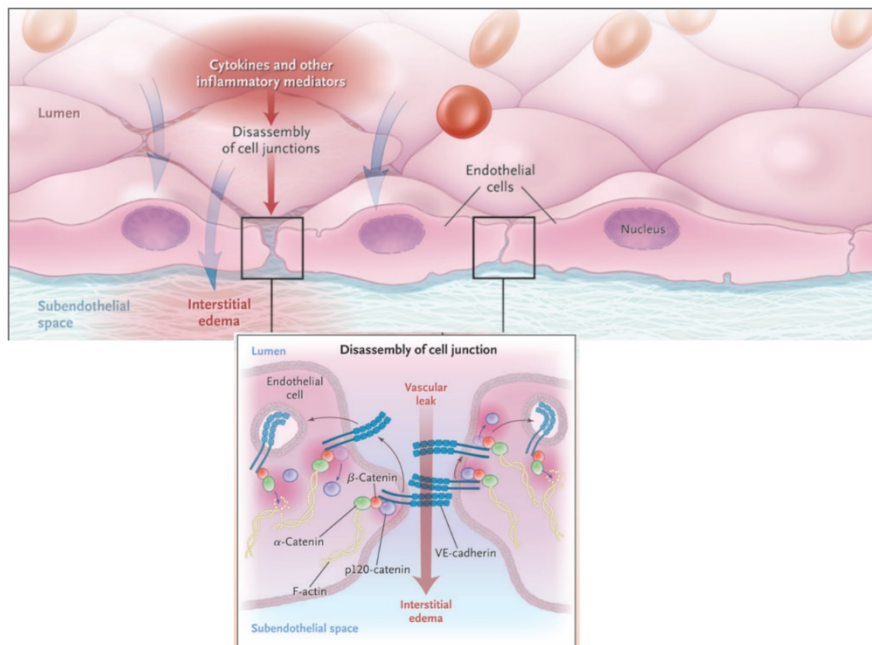


Figure 8: Ruptures des jonctions intercellulaires induites par des cytokines et d'autres médiateurs d'inflammation. La génération de ces trous dans le tissu endothélial provoque des fuites micro vasculaires et des œdèmes caractéristiques du sepsis⁴³.

Conclusion partielle: Cette section présente le contexte biologique du tissu endothélial afin de comprendre son organisation et la biologie cellulaire des molécules d'adhésion assurant son intégrité. En effet, ces molécules d'adhésion constituent les jonctions cellule/cellule et les jonctions cellule/MEC que l'on retrouve également des études *in vitro* où la MEC est remplacée par un substrat fonctionnalisé. De plus, le contexte physiologique de l'endothélium vasculaire est également présenté afin de définir les contextes d'application de ces travaux. Il a été démontré qu'en présence de toxines bactériennes, les jonctions cellulaires assurant l'intégrité de la barrière endothéliale sont impactées très rapidement avec une apparition de trous entre les cellules endothéliales. Cette rupture de jonctions intercellulaires engendre des fuites au niveau des vaisseaux sanguins caractéristiques de conditions pathologiques tel le sepsis. Les dysfonctions endothéliales présentent alors des marqueurs précoces d'infection. Nos travaux de thèse se situent dans ce cadre d'application. En effet, l'objectif principal est de mettre au point une biopuce permettant de détecter et de quantifier ces ruptures de jonctions correspondant à des trous au niveau de la monocouche cellulaire endothéliale fabriquée, afin, à terme, de disposer d'un outil de diagnostic précoce.

SECTION 2 : ETAT DE L'ART DES TECHNIQUES DE MICROSTRUCTURATION DE SURFACE POUR DES APPLICATIONS CELLULAIRES

I- La microstructuration : un outil d'étude de la physiologie cellulaire

A- Sensibilité des cellules à leur microenvironnement

L'agencement des cellules entre elles et avec la MEC définissent la fonctionnalité des tissus formés. En effet, les cellules sont très sensibles à ce microenvironnement composé de la MEC, des cellules voisines, de facteurs biochimiques tels les facteurs de croissance, les hormones et les cytokines et des contraintes physiques. L'ensemble de ces facteurs imposent des conditions de limites spécifiques ayant une influence sur la structure, la mécanique, la polarité et la fonction cellulaire⁴⁴ (Figure 9). De manière générale, plusieurs travaux principalement basés sur les cellules individuelles ont démontré la sensibilité des cellules à leur microenvironnement et leur capacité à adapter leur processus d'adhésion, d'étalement, de différenciation^{45,46}... Dans son microenvironnement *in vivo*, une cellule est soumise à différentes contraintes structurelles, chimiques et mécaniques⁴⁷. Cependant dans des conditions classiques de culture cellulaire, dans le microenvironnement *in vitro*, la majorité des informations spatiales et structurelles sont perdues.

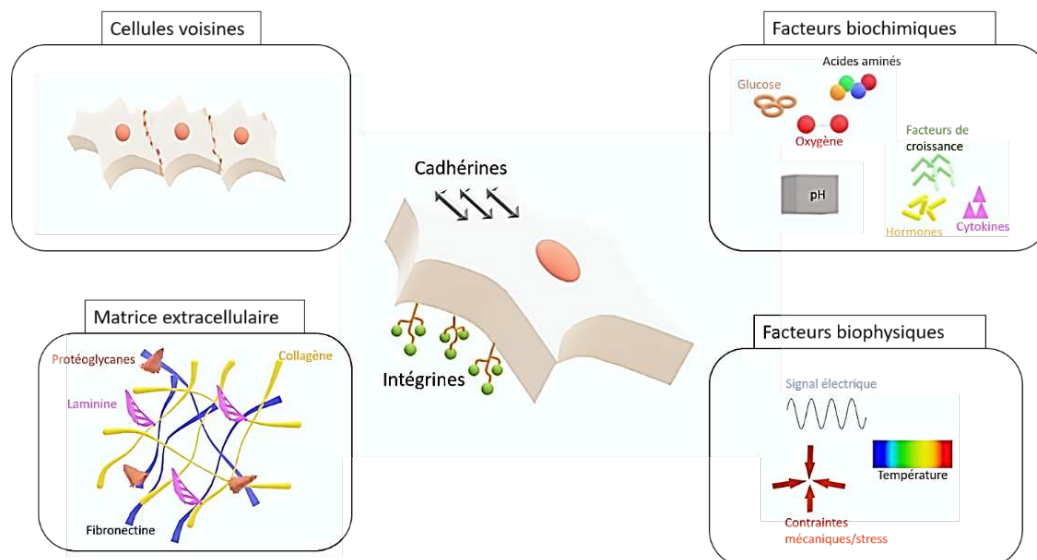


Figure 9: Schéma illustratif des principaux composants du microenvironnement cellulaire. Les facteurs déterminants sont : **a**, Les cellules voisines qui adhèrent entre-elles via des jonctions intercellulaires. **b**, La MEC à laquelle les cellules adhèrent au niveau des points focaux

d'intégrines. **c**, Des facteurs biochimiques composés de nutriments (oxygène, glucose et acides aminés), de molécules de signalisation (facteurs de croissance, cytokines et hormones) et d'un ensemble d'acides et de bases (eau...) régulant le pH. **d**, Des facteurs biophysiques comme des contraintes mécaniques, du stress, et des stimuli électriques, magnétiques, acoustiques, et thermiques auxquelles répondent les cellules *in-vivo*. [Adapté de 44].

B- La microstructuration cellulaire

Dans le but de restaurer les informations spatiales et structurelles perdues *in vitro* et d'essayer de se rapprocher le plus des conditions spatiales *in vivo*, la microstructuration est devenue un outil de plus en plus populaire dans la recherche en biomédicale. Cette méthode permet la création d'un micro-environnement où l'adhésion cellulaire est contrôlée, de façon à générer des régions adhésives et non adhésives permettant le confinement des cellules dans des microstructures de géométries et de tailles définies⁴⁸. Lorsqu'une cellule est ensemencée *in vitro* sur un substrat, elle est adsorbée sur la surface de ce dernier grâce à des forces de van der Waals et des forces ioniques. Ensuite, elle s'attache à la surface et adhère au substrat grâce aux intégrines. Après quelques heures, la cellule s'étale sur le substrat de façon très active en réorganisant son cytosquelette et en développant des points focaux d'adhésion. Les cellules contractent leurs filaments d'actomyosine au niveau de ces sites d'adhésion, générant des forces mécaniques leur permettant une stabilité la stabilité morphologique. Finalement, les cellules synthétisent des protéines de la MEC à l'interface du substrat^{49,50} (Figure 10).

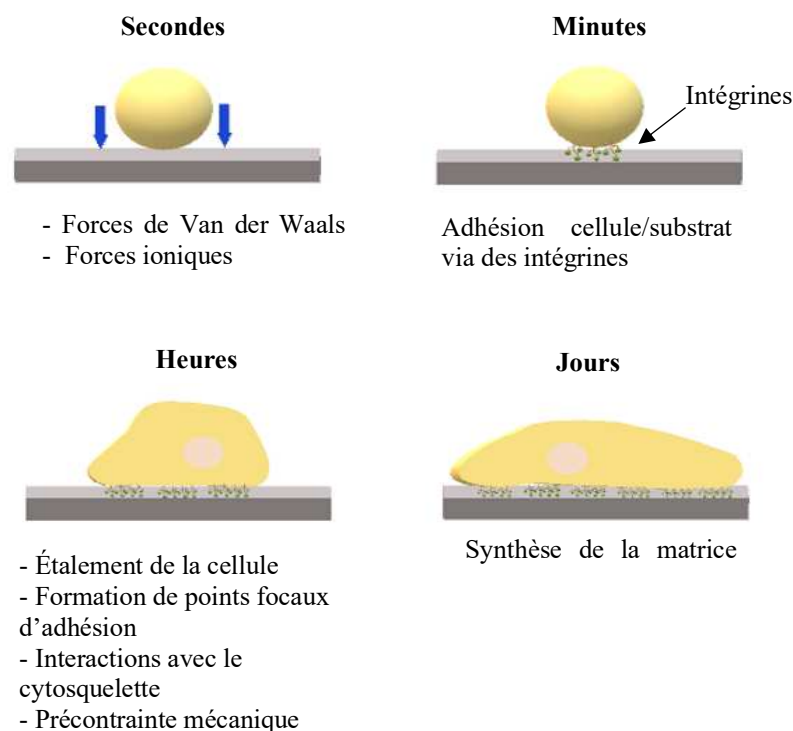


Figure 10: Les différentes cinétiques et phases de l'adhésion cellulaire⁵¹.

Il est important de limiter l'étalement cellulaire sur les substrats afin de mimer le confinement spatial *in vivo* des cellules, et ce grâce à la microstructuration. Les travaux de Whitesides et al.⁵² ont été parmi les premiers à démontrer la sensibilité des cellules aux facteurs morphologiques de leur microenvironnement sur ce type de substrats. Ils ont démontré l'impact de la surface des régions adhésives des microstructures sur la prolifération et la mort cellulaire. De plus, après adhésion sur le substrat, les cellules réorganisent leur cytosquelette, et exercent des forces de traction sur le substrat grâce aux fibres de stress⁵³. L'ensemble de ces forces varient selon les types cellulaires et leurs phénotypes migratoires.

Théry et al.⁵⁴ ont étudié la réorganisation du cytosquelette de 2 types cellulaires en fonction de leur adhésion sur différentes géométries en triangle, en V, en T et en Y. Le choix de ces géométries permet d'imposer différentes conditions de limites spatiales aux cellules en les faisant adhérer sur des bords adhésifs et non adhésifs. Cette étude démontre que l'acquisition du phénotype structurel des cellules dépend de la géométrie et la surface des régions adhésives et non adhésives des microstructures. Ainsi, lorsque les cellules adhèrent sur des patrons adhésifs adaptés à leur surface d'adhésion et à leur géométrie (ex : cercles), elles développent leurs zones d'ancrage et leurs extensions membranaires de façon plus ou moins homogène en périphérie au niveau des contours (Figure 11 – a). Lorsque les cellules adhèrent sur des patrons adhésifs adaptés à leur géométrie mais ayant une plus grande surface d'adhésion les poussant à s'étaler, elles forment des faisceaux filamenteux d'actine allant de l'extérieur vers l'intérieur, ainsi que des fibres de stress au niveau du centre de la microstructure (Figure 11 – b). Lorsqu'on impose plus de contraintes spatiales aux cellules en les faisant adhérer dans des géométries ayant des bords droits, adhésifs (ex : triangle) ou non adhésifs (ex : forme en V), les points focaux s'accumulent au niveau des régions distales en périphérie cellulaire comme les sommets, où ils forment des lamellipodes, filopodes et autres extensions membranaires. Ensuite, les cellules redistribuent leurs fibres de stress au niveau des bords afin de minimiser la distance entre deux sommets (Figure 11 – c). La force de traction de ces fibres de stress est plus importante résultant en une contractilité très élevée lorsque les fibres sont formées sur des régions non adhésives (Figure 11 – d). Ainsi l'adhésion des cellules sur des substrats microstructurés dépend fortement des paramètres structurels et spatiaux des patrons adhésifs des microstructures dans lesquelles les cellules seront confinées.

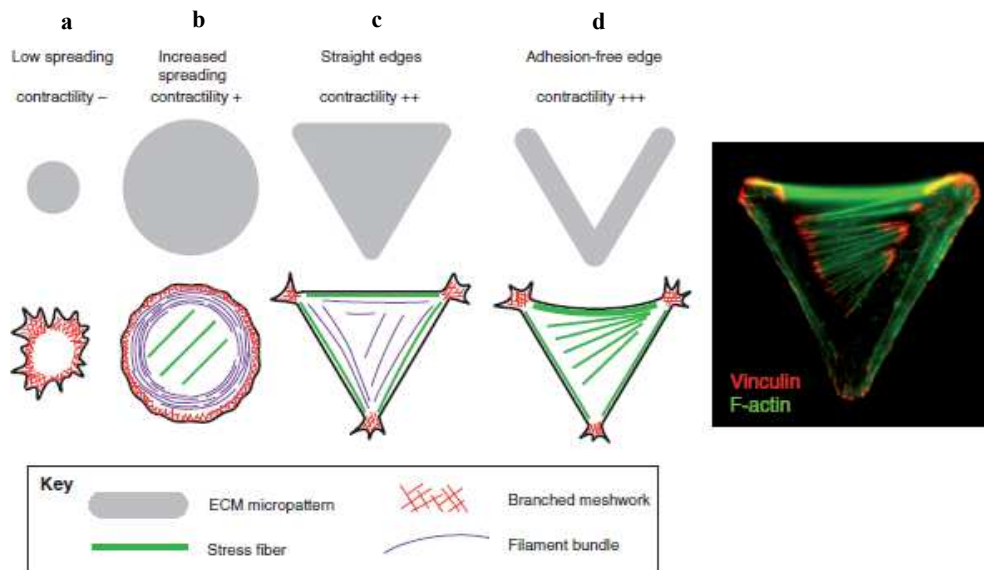


Figure 11: Effets de la microstructuration sur l'adhésion, la structure et la contractilité cellulaire⁴⁷. **a**, Cellules adhérant sur des petits patrons adaptés à la surface des cellules. **b**, Cellules adhérant sur des patrons dont la surface est plus grande. **c**, Adhésion des cellules dans des microstructures ayant des bords droits adhésifs en forme triangulaire. **d**, Adhésion des cellules dans une forme en V avec 2 côtés adhésifs et un non adhésif.

II- Techniques de microstructuration de la surface

Il existe différentes méthodes pour obtenir des substrats microstructurés. Parmi ces méthodes est citée la chimie de surface qui peut être combinée avec d'autres techniques de lithographie douce afin de contraindre géométriquement les cellules. Selon les applications, il est souvent nécessaire de combiner les deux méthodes et de fonctionnaliser les substrats microstructurés afin de modifier leur propriétés chimiques de surface comme dans le cas des biomatériaux utilisés dans l'ingénierie des tissus⁵⁵, de biodétection⁵⁶ et plusieurs autres applications. Les principales méthodes pour la fabrication de substrats microstructurés incluent de la lithographie douce, de la photolithographie, de la lithographie thermique et de la lithographie par plasma⁵⁷. Cette section expose les différentes stratégies retenues dans la bibliographie pour des applications cellulaires permettant une adhésion contrôlée et organisée des cellules sur des substrats microstructurés en combinant des techniques de fonctionnalisation chimique de la surface et de lithographie douce.

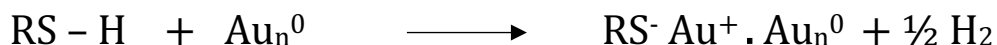
A- Fonctionnalisation des surfaces métalliques

La modification de la surface d'un substrat est la première étape des techniques de microstructuration présentées dans cette section. Elle permet de créer un contraste

chimique permettant le contrôle de la réactivité de la surface selon les molécules déposées sur les différentes zones. Il existe deux types de techniques de modifications de la surface : 1 — chimiquement en impliquant des réactions chimiques à la surface du substrat ce qui va altérer des atomes ou des molécules du matériau existant. — physiquement en créant une couche qui recouvre la surface du matériau⁵⁸. La procédure la plus commune pour le dépôt de molécules sur des substrats est la formation de monocouches auto-assemblées. Il s'agit d'une stratégie physique de modification de surface qui consiste à aligner des macromolécules à la surface d'un substrat. Ces films monomoléculaires autoorganisés ou SAMs (Self-Assembled Monolayers) sont fixés de manière covalente ou électrostatique au substrat, leur conférant une forte résistance et assurant la stabilité chimique de la surface. Les interactions d'accroche sont différentes selon les substrats et les propriétés des molécules déposées.

La fonctionnalisation des substrats de silicium (SiO_2)⁵⁹, de polydiméthylsiloxane (PDMS)⁶⁰ et des oxydes métalliques en général s'appelle la silanisation. Elle consiste à faire réagir les groupements hydroxyles (OH) de la surface avec une solution de silanes pour former des groupements actifs d'alkylsiloxanes, qui en présence d'eau, forment des réseaux réticulés⁶¹. Ces liaisons ne sont pas très bien définies dans la littérature et dépendent des conditions utilisées pour la formation des SAMs. Les silanes sont composés d'un groupement de surface, suivi d'une chaîne alkyle, puis d'un atome de silicium (Si) avec des groupements d'accroche facilement hydrolysables. La fonctionnalisation des surfaces SiO_2 se fait majoritairement avec 3 groupements hydrolysables au niveau de l'accroche ce qui permet d'obtenir un greffage plus robuste⁶². Parmi ces groupements les plus utilisés se trouvent les trichlorosilanes ($\text{R} = \text{Cl}$) comme OctadécylTrichloroSilane (OTS).

La réaction la plus connue pour le dépôt de molécules organiques sur des surfaces métalliques de façon robuste et stable est la formation de SAMs à partir d'alcanethiols et de leurs dérivés sur l'or, l'argent, le cuivre, le palladium, le platine, et des alliages de ces métaux. Les alcanethiols de formule chimique $(\text{HS} - (\text{CH}_2)_n - \text{X})$ contiennent 3 parties ⁶²: 1 — Le groupement en tête principalement composé de soufre (HS) permettant l'accroche sur des surfaces de métaux nobles. 2 — le groupement central correspondant à une chaîne alkyle composée de groupements méthylènes $((\text{CH}_2)_n)$. 3 — le groupement terminal fonctionnel (X) (Figure 12). La liaison du groupement thiol S-H à la surface de l'or se fait par élimination réductrice d'hydrogène et par la formation d'une liaison thiolate S-Au.



.La principale force motrice de l'assemblage des alcanethiols est liée à la forte affinité de l'atome de soufre du groupement d'accroche sur les surfaces d'or, et aux interactions hydrophobes de Van der Waals entre les carbones des groupements méthylènes de la chaîne alkyle. L'ensemble de ces forces causent une inclinaison de la chaîne de thiols d'environ 30° de façon à optimiser l'interaction entre les chaînes et minimiser leur énergie de surface⁶³. La cinétique de l'auto-assemblage d'un SAM dépend de la propreté de la surface du substrat d'or et de la longueur de la chaîne : en effet, plus la chaîne alkyle est longue, plus le SAM aura une meilleure auto-organisation et plus il sera stable grâce aux interactions C-C. Un bon SAM d'alcanethiols devrait contenir au moins 10 carbones dans la chaîne alkyle afin d'empêcher la rotation des molécules selon leur degrés de liberté de rotation⁶⁴.

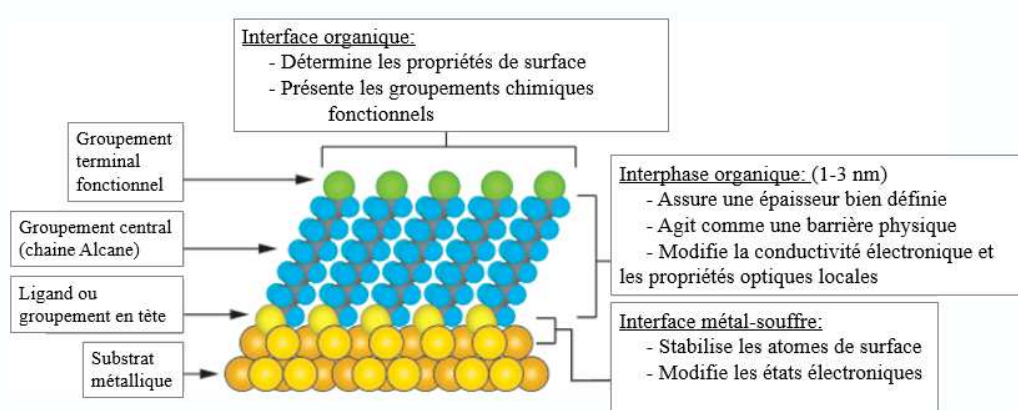


Figure 12: Schéma d'un SAM idéal monocristallin d'alcanethiols sur un substrat d'or. Les caractéristiques du SAM sont présentées en détails⁶⁵.

Cependant dans le cas des applications en biocapteurs *in vitro*, l'utilisation de groupements moléculaires ayant de fortes densités mène à des encombrements stériques et génère des surfaces de mesures désordonnée pouvant être à l'origine d'adsorption de biomolécules non spécifiques à la surface⁶⁶. Ainsi, malgré leur plus faible stabilité, l'utilisation de SAMs avec une chaîne alkyle plus courte a été suggérée dans de récentes études sur les biocapteurs, puisqu'ils semblent offrir une meilleure sensibilité de mesure et ont besoin d'un temps d'incubation plus court pour leur auto-assemblage⁶⁷. Il est également possible de préparer des surfaces de biodétection en utilisant des mélanges de SAMs avec des chaînes alkyles longues et des chaînes alkyles courtes ayant des groupement fonctionnels terminaux différents⁶⁸. Toutefois il est difficile d'obtenir une surface bien contrôlée dans ce cas d'étude car la concentration des groupements fonctionnels terminaux et de leur distribution à la surface ne dépend pas linéairement des ratios de concentrations mesurés en entrée dans le mélange de solutions.

B- Choix des groupements actifs pour des applications cellulaires

La modification chimique de la surface des substrats pour des applications de fabrications de biocapteurs *in vitro* a fait l'objet de plusieurs études et développements dans les dernières années afin de personnaliser l'interface entre le matériau et les objets biologiques. L'ensemble de ces techniques permettent d'optimiser la biocompatibilité des substrats utilisés afin de réduire l'adsorption non spécifique de protéines à la surface et de sélectivement promouvoir l'adhésion cellulaire. Ainsi, les surfaces peuvent être modifiées afin de générer des régions adhésives et non adhésives aux protéines et aux cellules. La modification des propriétés de surface se fait à l'interface organique du SAM au niveau des groupements chimiques terminaux fonctionnels. En effet, une surface peut être modifiée pour empêcher l'adhésion d'objets biologiques grâce à des molécules passivantes comme les polyéthylènes glycols (PEG), des polysaccharides comme le Dextran⁶⁹ ou des polymères zwitterioniques⁷⁰. Concernant les PEGs, il s'agit d'un polymère fabriqué à partir de répétition de la chaîne monomérique $[-CH_2-CH_2-O-]$ dont la longueur et la conformation de la chaîne, la densité de greffage et l'hydrophobicité jouent un rôle important dans la résistance d'adhésion.

Cependant un même produit peut servir de passivant pour les protéines mais pas pour les cellules car la sensibilité au microenvironnement des deux objets biologiques est différente, ainsi que les signaux chimiques impliqués dans l'adhésion et le détachement. Une surface peut également être modifiée, en changeant son groupement terminal X, afin de la rendre hydrophobe ($X = CH_3$), hydrophile ($X = OH$ ou $X = COOH$) ou pour promouvoir l'adhésion des protéines et des cellules de façon spécifique ($X =$ molécules d'adhésion)^{71,72}. Les molécules d'adhésion correspondent principalement à des protéines de la MEC comme le collagène, laminine, élastine et fibronectine⁷³ ou plus précisément le peptide RGD⁷⁴ comme décrit dans la section I-1-A. En plus de jouer un rôle important dans la mise en place des propriétés de surface du substrat, il a également été démontré que le choix du groupement terminal fonctionnel pouvait jouer un rôle dans la fonction cellulaire en guidant la différenciation de cellules souches mésenchymateuses (CSM) par exemple (Figure 13).

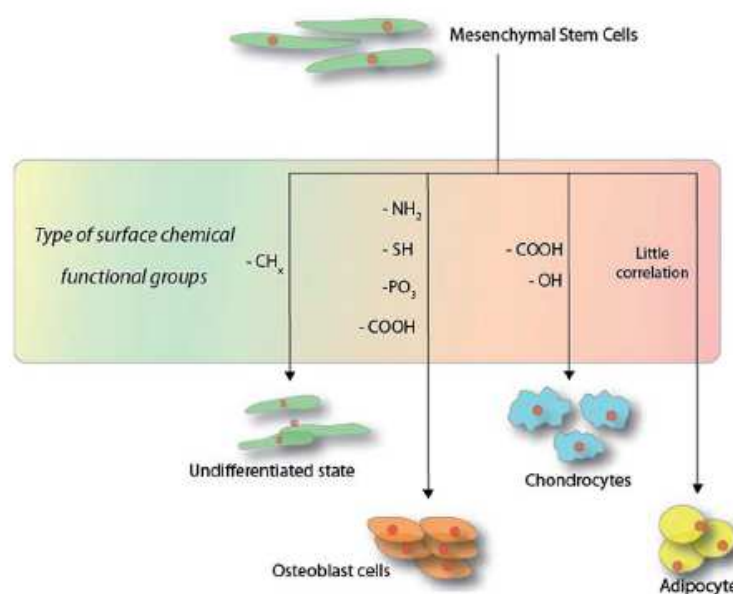


Figure 13: Schéma d'ensemble de la différenciation de CSM en fonction des groupements terminaux fonctionnels à la surface pendant 14 jours de culture cellulaire sur un substrat⁷⁵.

Conclusion partielle : La modification chimique de la surface des substrats dans le cas des applications de biocapteurs *in vitro* présente des avantages en termes de sélectivité et de sensibilité de mesure. Cependant elle adresse des défis notamment par rapport à la stabilité de la couche chimique recouvrant les surfaces qui tend à devenir moins stable au cours du temps et par conséquent à perdre en efficacité de passivation ou d'accroche (Les PEGS s'auto-oxydent au cours du temps à l'air libre). De plus, selon les applications souhaitées, il est nécessaire de faire des études préliminaires afin d'identifier le produit le plus optimal en fonction de son type, concentration et densité. Et finalement, la majorité de ces études *in vitro* prennent en compte un comportement cellulaire ou protéique en 2D, ce qui n'est pas complètement représentatif de ce qui se passe réellement *in vivo* en 3D. Dans le cadre de ces travaux de thèse, le choix s'est porté pour l'utilisation d'un PEG contenant une partie thiol permettant l'accroche à l'or, une chaîne alkyle courte contenant 11 carbones, et une partie terminale fonctionnelle contenant un groupement alcool (Figure 25). Ces molécules s'organisent en SAMs sur les substrats d'or et permettent de bloquer l'adhésion des cellules à la surface des substrats passivés (Chapitre 3 - section 1 – I). Cette étape correspond à la première étape de ce protocole de microstructuration développée dans cette thèse.

C- Technique de lithographie douce : Le microcontact printing

Le microcontact printing est une technique qui consiste à imprimer des molécules sur une surface à une échelle micro ou nanométrique en utilisant principalement du polydiméthylsiloxane (PDMS). Cet élastomère est à l'état liquide avant réticulation et

prend avec une grande fidélité la forme d'un moule plat ou structuré en polymérisant. Cette technique introduite par Whitesides et al.⁷⁶ nécessite l'utilisation d'un moule généralement en silicium fabriqué par des techniques de photolithographie. Lorsque le moule est négatif et présente différentes structures en creux, alors le timbre PDMS qui a été moulé présente ces mêmes géométries en relief. Le timbre ensuite est incubé dans la molécule d'intérêt qui sera encrée sur le réplica en PDMS. Le transfert des molécules sur le substrat d'accueil dans le cas d'un moule structuré ne se fera qu'au niveau des parties surélevées qui vont être en contact avec le substrat, reconstituant les géométries initiales du moule (Figure 14). Cette technique a été utilisée pour différentes applications, principalement dans un contexte d'adhésion cellulaire. Grâce à cette technique de structuration simple et rapide, plusieurs travaux ont mis en évidence le contrôle de l'adhésion de protéines et de cellules en déposant de façon organisée en surface des molécules de passivation avec des groupements terminaux PEG et des molécules d'adhésion. Cette technique permet de faire adhérer les cellules selon des géométries données et a mené à différentes études sur l'adhésion des cellules et la réorganisation de son cytosquelette sur la microstructure d'adhésion⁷⁷. Il s'agit d'une technique simple, rapide et à bas coût permettant de déposer des structures allant jusqu'à la dizaine de micromètres. Cependant cette technique est limitée par la diffusion des molécules de l'encre et la déformation élastique du timbre en PDMS, ce qui rend difficile d'avoir un contrôle global sur les dépôts qui sont faits et leurs spécificités.

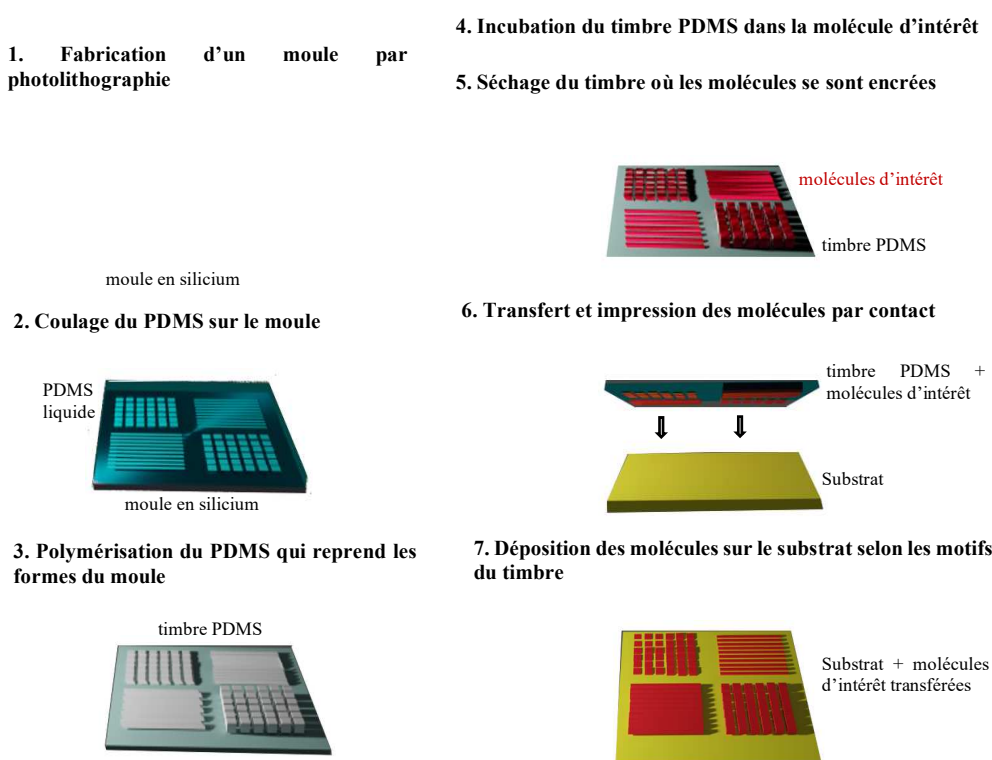


Figure 14: Les différentes étapes de la technique de microcontact printing.

D- Illumination Deep-UVs

Cette technique photochimique de structuration consiste à exposer aux longueurs d'ondes UV profondes (Deep-UV, ou DUV, $\lambda < 250$ nm) les groupements terminaux PEG des SAMs⁷⁸. Leur exposition à travers un masque de lithographie en chrome (opaque aux DUV) /quartz (transparent aux DUV) présentant la structuration surfacique souhaitée provoque des dégradations sélectives au niveau de la chaîne de PEG, provoquant la perte fonctionnelle de ce dernier à bloquer l'adhésion des cellules à la surface des substrats. De plus, pour augmenter l'affinité d'adhésion des cellules uniquement aux zones exposées où les PEG ont été photodégradés par les DUV, une protéine d'adhésion de la MEC comme la fibronectine est ajoutée par incubation du substrat⁷⁹. L'efficacité de cette technique repose sur l'homogénéité des SAMs de PEG déposés, sur leur sensibilité aux différentes longueurs de DUV entre 180 et 250nm⁸⁰, sur la propreté du masque chrome/quartz et sur la dose d'exposition de la lampe UV.

Conclusion partielle : la microstructuration est un outil qui permet de contrôler l'adhésion d'objets biologiques comme des protéines ou des cellules selon des géométries définies. Ainsi en contrôlant le paramètre géométrique, les expériences sont très reproductibles ce qui permet de quantifier, normaliser et comparer les réponses cellulaires mesurées. Dans ces travaux, la technique de microstructuration sélectionnée est l'illumination par DUVs. la microstructuration a été utilisée comme un outil pour isoler et confiner des cellules endothéliales selon des géométries hexagonales, pour ensuite rapprocher les microstructures entre elles afin d'induire de la connectivité entre les cellules et promouvoir la formation de jonctions entre elles, pour la fabrication d'une monocouche cellulaire endothéliale in vitro (chapitre 3 – section 1 – II). La mesure des réponses cellulaires peut être effectuée avec des techniques d'imagerie microscopique qui peuvent être séparées en deux catégories : avec marquage et sans marquage.

SECTION 3 : MESURE DE LA REPONSE CELLULAIRE EN SURFACE

I- Biocapteur pour la mesure cellulaire

Aujourd'hui les techniques les plus courantes pour observer des cellules et des bactéries nécessitent l'utilisation de marqueurs moléculaires et cellulaires fluorescents spécifiques permettant l'obtention d'images par microscopie à fluorescence en temps réel⁸¹. Cependant ce type de marquage, en plus de modifier chimiquement l'état physiologique du matériel vivant étudié, peut également causer la perte de contraste par photoblanchiment lorsque les marqueurs sont surexposés à la source lumineuse. Ainsi, on trouve aussi des méthodes de détection sans marquage qui ont pour avantages d'être non invasives, de ne pas modifier chimiquement les échantillons étudiés et qui

permettent un suivi et une quantification en temps réel des événements biologiques observés. Ces outils de détection impliquent généralement la combinaison de 3 éléments : la biopuce, le transducteur et le détecteur. La biopuce est un support physique contenant des ligands qui sont des molécules sondes censées reconnaître de manière spécifique les composés cibles à détecter. Ce signal biochimique, correspondant à l'absence ou la présence d'une espèce cible, est traduit en un signal physique mesurable grâce au transducteur, et quantifiable par les systèmes d'acquisition (Figure 15). Dans le cadre d'application cellulaire, il existe différentes techniques d'analyses de surface comme l'analyse par spectroscopie Raman exaltée en surface (surface enhanced Raman spectroscopy, SERS)⁸², la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) où les variations de morphologie cellulaire modifient la conduction et permettent la mesure en temps réel⁸³, et la résonance des plasmons de surface (SPR) qui présente un bon contraste et une bonne sensibilité⁸⁴. C'est cette dernière technique qui a été utilisée dans ces travaux de thèse.

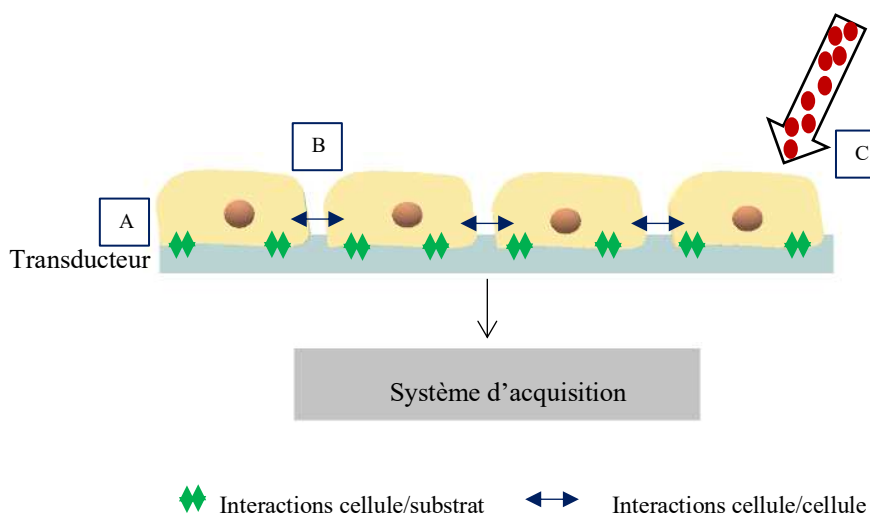


Figure 15: Principe d'un biocapteur cellulaire sans marquage et ses différentes études. A- étalement et adhésion des cellules sur le substrat. B- Interactions intercellulaires et formation d'une barrière cellulaire. C- Réponse cellulaire à différents stimuli comme des molécules de signalisation, virus et toxines. Cette réponse est mesurée par un système d'acquisition adapté.

II- Biodétection par marquage

Lorsqu'une molécule absorbe un photon à une certaine longueur d'onde, cela génère suffisamment d'énergie pour que l'électron passe d'un état fondamental stable (S_0) à un état excité instable (S_1). Cependant une molécule a tendance à toujours revenir à son état stable. Ce retour peut se faire soit de manière non-radiative ou radiative : Les processus non radiatifs correspondent à des processus de relaxations vibrationnelles, des conversions internes ou par des croisements inter-systèmes (CIS). Les processus radiatifs ou lumineux correspondent à la fluorescence et la phosphorescence. Les

processus non radiatifs sont en compétition avec les processus radiatifs. Lorsque l'électron retourne à un état stable en émettant un photon, il s'agit alors de la fluorescence (durée entre 10^{-12} et 10^{-6} s) (Figure 16).

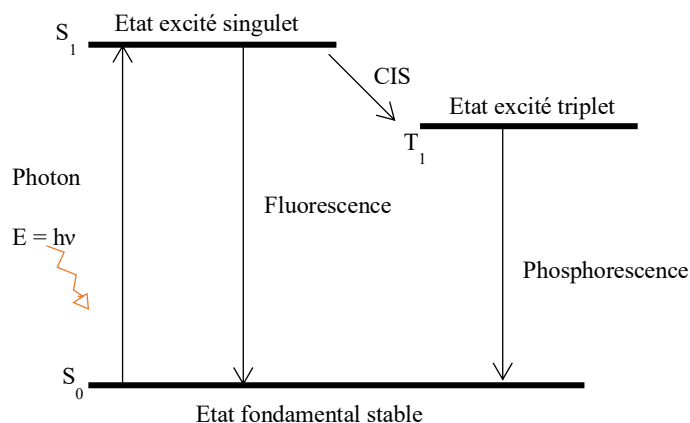


Figure 16: Diagramme de Jablonski simplifié pour l'absorption de 1 photon.

Une molécule fluorescente se caractérise par :

- Ses spectres d'absorption et d'émission : Les photons émis par fluorescence ont une énergie plus faible que celle des photons absorbés. Ainsi le spectre d'émission de fluorescence est décalé vers des longueurs d'ondes plus grandes que la longueur d'onde d'excitation. Le choix d'un bon fluorophore dépend du grand décalage entre le maximum d'absorption et le maximum d'émission appelé décalage de Stokes.
- Son rendement quantique : Il s'agit du rapport entre les photons émis par fluorescence et les photons absorbés. Il correspond à la probabilité pour qu'une molécule excitée émette un photon (valeur entre 0 et 1). Ce rendement rend compte de la compétition entre les différents processus radiatifs et non radiatifs.
- Sa durée de vie de fluorescence : Le temps passé par une molécule dans un état excité avant son retour à l'état fondamental stable.

L'utilisation de molécules fluorescentes est très commune en biologie car elle permet de marquer spécifiquement des protéines. Il existe deux types de fluorescence : soit par l'utilisation d'un fluorochrome qui se fixe directement à un endroit spécifique de la cellule comme le DAPI qui se lie fortement aux bases adénine (A) et thymine (T) et permet le marquage des noyaux des cellules à une longueur d'onde d'excitation spécifique. Soit par immunomarquage. Il y a deux types d'immunomarquage : l'immunomarquage direct où un anticorps couplé à un fluorochrome est dirigé vers

l'antigène que l'on souhaite quantifier ; l'immunomarquage indirect qui est basé sur l'utilisation successive de deux anticorps. Le premier anticorps est monoclonal et reconnaît spécifiquement la protéine d'intérêt, tandis que l'anticorps secondaire qui est conjugué au fluorophore est polyclonal et est dirigé contre l'anticorps primaire. Dans ce cas d'étude, le marquage des noyaux a été effectué avec le DAPI comme décrit précédemment. De la même manière, la phalloïdine conjuguée au fluorophore Texas-Red a permis de marquer le cytosquelette grâce à sa forte affinité pour les filaments d'actine. Concernant les marquages des jonctions cadhérines entre les cellules, un immunomarquage direct a été utilisé avec un anticorps monoclonal couplé avec le fluorophore FITC et qui est dirigé vers un type de cadhérines appelé CD144 (Cluster of Differentiation 144) ou VE-cadhérines. Le choix de ces 3 fluorophores a principalement été fait en fonction de leurs spectres d'absorption et d'émission afin de pouvoir visualiser les noyaux, les jonctions et les filaments du cytosquelette en même temps sans qu'il y ait de croisements.

L'extinction de fluorescence (ou *quenching*) désigne les phénomènes qui tendent à diminuer l'intensité de fluorescence. Cette extinction peut avoir plusieurs origines y compris la photodégradation de l'échantillon et sa photosaturation liée à une surexposition. Il est important de noter que la combinaison de la fluorescence sur des substrats d'or présente des défis. En effet, l'or est un matériau souvent utilisé dans le cadre d'imagerie plasmonique grâce à ses propriétés physiques et sa biocompatibilité. Cependant pour générer des plasmons de surface sur des substrats d'or, les échantillons sont excités à des longueurs d'onde entre 630 nm et 850 nm. Or la majorité des marqueurs fluorescents de jonctions disponibles doivent être excités à des longueurs d'ondes plus faibles. Or en dessous de 600 nm, l'absorption à la surface de l'or est très élevée, ce qui réduit la sensibilité de la SPR et l'intensité de fluorescence pouvant aller jusqu'à une extinction du signal⁸⁵.

Ici, sont décrites les techniques de microscopie utilisées dans le cadre de ces travaux de thèse : la microscopie optique à champs clair, la microscopie à épifluorescence et la microscopie confocale (Figure 17).

- La microscopie optique est composée principalement d'une source lumineuse qui consiste en une lampe halogène placée sous l'échantillon, une optique de formation de l'image qui correspond à une association de plusieurs lentilles assurant l'agrandissement (objectif), un détecteur permettant l'observation et l'enregistrement comme un tube binoculaire ou une caméra et finalement une partie mécanique permettant le déplacement et le positionnement précis de l'échantillon. La microscopie à fluorescence permet de visualiser les objets cellulaires (noyaux, jonctions...) qu'ils soient fixés ou vivants, marqués grâce à des fluorochromes, en les excitant à des longueurs d'ondes spécifiques. Cette technique utilise un microscope optique et est souvent couplée avec des techniques de microscopie en champs clair.
- La microscopie à épifluorescence utilise une lampe à mercure comme source lumineuse. Le faisceau lumineux traverse un filtre d'excitation qui permet

de ne transmettre que la longueur d'onde désirée. Le miroir dichroïque permet de séparer les faisceaux d'excitation et d'émission. La fluorescence émise par l'échantillon est collectée par l'objectif et est mesurée par un détecteur.

- La microscopie confocale utilise un laser monochromatique comme source lumineuse. Les faisceaux d'excitation et d'émission sont séparés par un miroir dichroïque. La fluorescence collectée par l'échantillon est collectée par l'objectif et est envoyée vers le détecteur en passant par un trou de confocal appelé « pinhole » qui est placé devant le détecteur et qui permet d'éliminer la fluorescence provenant des régions non focales. La microscopie confocale permet de réaliser des séries d'images en déplaçant le plan focal de l'objectif dans l'épaisseur de l'échantillon, ce qui permet de générer une représentation tridimensionnelle.

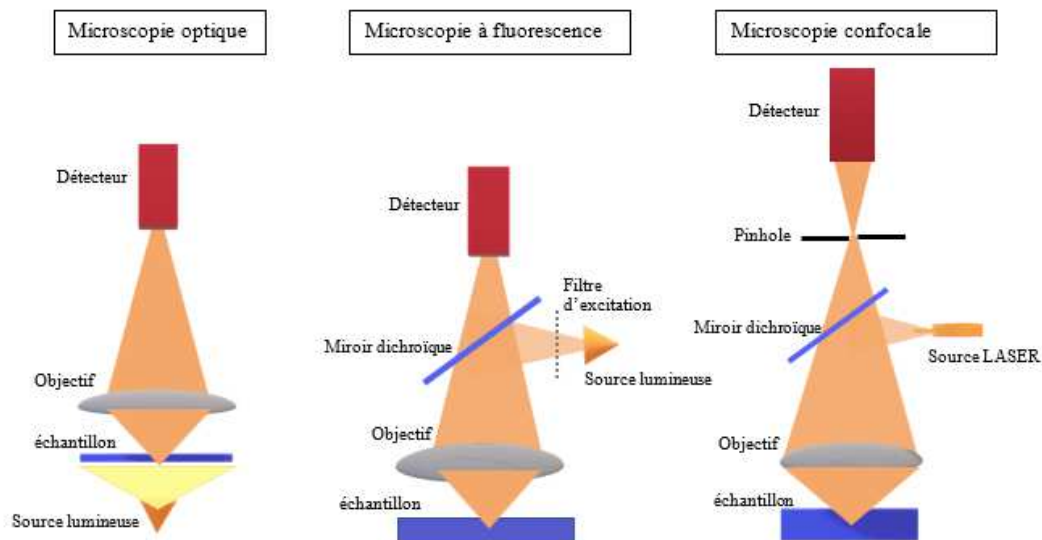


Figure 17: Schémas simplifiés d'un microscope optique, microscope à épifluorescence et microscope confocal.

III- Fonctionnement d'un biocapteur SPR

A- Théories et définitions de la SPR

1- Propagation des plasmons de surface à l'interface métal/diélectrique

Un plasmon de surface correspond à un mode guidé des électrons libres confinés à la

surface d'une couche métallique très fine (environ 50 nm d'épaisseur) et d'un milieu diélectrique. La résonance de ces plasmons de surface ne se produit que selon certaines conditions de couplage entre l'oscillation longitudinale collective des électrons libres et le champ électromagnétique d'une onde lumineuse. Deux types de plasmons de surfaces sont distingués : 1 – Les plasmons de surfaces délocalisés ou propagatifs ; 2 – les plasmons de surface localisés. Dans la suite de cette étude, uniquement les plasmons de surface propagatifs (PSP) excités par une lumière incidente polarisée transverse magnétique (TM) sont considérés. Les plasmons de surface font partie des solutions des équations de Maxwell en milieu linéaire et isotrope. dans des conditions de milieux non-magnétiques et en l'absence de charge électrique et de courant électrique :

- 1) Description du champ électrique : équation de Maxwell-Gauss selon laquelle la divergence du champ électrique (E) est proportionnelle à la distribution de charges électriques.

$$\nabla \cdot \mathbf{E} = \frac{\rho}{\epsilon_0 \epsilon}$$

Avec ρ la densité de charges en un point donné, ϵ_0 et ϵ les permittivités respectives du vide et du matériau.

Or $\rho = 0$, d'où :

$$\epsilon_0 \epsilon \nabla \cdot \mathbf{E} = 0 \quad (1.1)$$

- 2) Description du champ magnétique : équation de Maxwell- Thomson ou flux selon laquelle le champ magnétique (H) entrant est toujours égal au champ magnétique sortant.

$$\mu_0 \nabla \cdot \mathbf{H} = 0 \quad (1.2)$$

Avec μ_0 la perméabilité magnétique du vide

- 3) Interactions entre le champ électrique (E) et le champ magnétique (H) :

- Variations de E en fonction de H : équation de Maxwell-Faraday

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\mu_0 \frac{\partial \mathbf{H}}{\partial t} \quad (1.3)$$

- Variations de H en fonction de E : équation de Maxwell-Ampère

$$\nabla \times \mathbf{H} = \varepsilon_0 \varepsilon \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} \quad (1.4)$$

A partir des équations 1.3 et 1.4, en utilisant : $\nabla \times \nabla \times \mathbf{E} = \nabla(\nabla \cdot \mathbf{E}) - \Delta \mathbf{E}$, et comme la divergence de $\mathbf{E}$ est nulle : on déduit **l'équation de Helmholtz** dans le vide :

$$\Delta \mathbf{E} - \left(\frac{n}{c}\right)^2 \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} = 0 \quad (1.5)$$

Avec Δ l'opérateur Laplacien, n l'indice optique tel que $n = \sqrt{\varepsilon}$ et c la vitesse de la lumière dans le vide tel que $c = \frac{1}{\sqrt{\mu_0 \varepsilon_0}}$.

Il s'agit d'une équation de propagation qui contient un aspect spatial qui dépend de l'opérateur Laplacien Δ , et un aspect temporel qui dépend de $\frac{\partial^2}{\partial t^2}$.

Maintenant, s'il s'agit d'une onde plane, progressive et monochromatique. Alors cette onde s'écrit :

$$A(r, t) = A_0 e^{i(k \cdot r - \omega t + \varphi_0)} \quad (1.6)$$

Avec A_0 qui représente soit le champ électrique ($\mathbf{E}$) ou le champ magnétique ($\mathbf{H}$), k est le vecteur d'onde, ω la pulsation et φ_0 la phase.

On considère une onde électromagnétique qui se propage à l'interface entre un milieu diélectrique et un métal noble selon l'axe x . Elle est évanescence, selon l'axe z , d'un côté dans le métal et de l'autre, dans le milieu diélectrique. Cette onde reste invariante selon l'axe y (Figure 18). En considérant la phase comme nulle, cette onde s'écrit :

$$\text{Dans le diélectrique où } z > 0 : A_d(r, t) = A_{0,d} e^{-k_{z,d} z} e^{i(k_{x,d} x - \omega t)} \quad (1.7)$$

$$\text{Dans le métal où } z < 0 : A_m(r, t) = A_{0,m} e^{k_{z,m} z} e^{i(k_{x,m} x - \omega t)} \quad (1.8)$$

Avec k_x la projection du vecteur d'onde selon l'axe x et k_z la projection du vecteur selon l'axe z . Ce même raisonnement peut être appliqué au champ magnétique.

La résolution des équations de Maxwell pour une onde électromagnétique à l'interface entre un milieu diélectrique et un métal donne une solution qui prévoit l'existence de l'onde de surface caractérisée par son vecteur d'onde k_{SP} tel que $k_{SP} = k_{x,d} = k_{x,m}$. Cette conservation de la composante tangentielle est liée aux conditions aux limites à l'interface métal/diélectrique. De plus, en polarisation TM, l'équation 1.4 donne :

$$\begin{cases} ik_{z,d}H_{0,y,d} = \omega\epsilon_0\epsilon_d E_{x,d} \\ -ik_{z,m}H_{0,y,m} = \omega\epsilon_0\epsilon_m E_{x,m} \end{cases}$$

Pour $z = 0$, les relations de continuité à l'interface impliquent que $H_d = H_m$ et que $E_d = E_m$. Ainsi, en réécrivant l'équation (1.9) :

$$\frac{\epsilon_m}{k_{z,m}} = \frac{-\epsilon_d}{k_{z,d}} \quad (1.10)$$

Cette égalité démontre que le respect des conditions de limites implique que les plasmons de surface ne peuvent être excités qu'à l'interface entre deux milieux avec des composantes réelles diélectriques opposées ce qui est le cas entre un métal dont la permittivité est négative, et un diélectrique dont la permittivité est positive.

En utilisant l'équation de Helmholtz (1.5) selon l'axe z du vecteur d'onde :

$$\begin{cases} k_{z,d} = \sqrt{k_{sp}^2 - \epsilon_d \frac{\omega^2}{c^2}} & (1.11) \\ k_{z,m} = \sqrt{k_{sp}^2 - \epsilon_m \frac{\omega^2}{c^2}} & (1.12) \end{cases}$$

En remplaçant les solutions de $k_{z,d}$ et $k_{z,m}$ dans l'équation (1.10) :

$$\boxed{k_{SP} = k_0 \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}}} \quad (1.13)$$

Avec : $k_0 = \frac{\omega}{c}$: le vecteur d'onde de la lumière dans le vide, ω la fréquence angulaire et c la vitesse de la lumière. Et avec : ϵ_m, ϵ_d les permittivités électriques respectives du métal et du diélectrique.

Il est important de noter que pour les métaux, la permittivité est complexe, alors k_{SP} peut être décrit comme : $k_{SP} = k'_{SP} + ik''_{SP}$. Avec :

$$k'_{SP} = k_0 \sqrt{\frac{\epsilon'_m \epsilon_d}{\epsilon'_m + \epsilon_d}} \quad (1.14)$$

$$k''_{SP} = k_0 \left(\frac{\epsilon'_m \epsilon_d}{\epsilon'_m + \epsilon_d} \right)^{3/2} \frac{\epsilon''_m}{2 (\epsilon'_m)^2} \quad (1.15)$$

Dans ces équations, la relation qui relie la partie réelle du vecteur d'onde et la fréquence

ω est appelée la relation de dispersion.

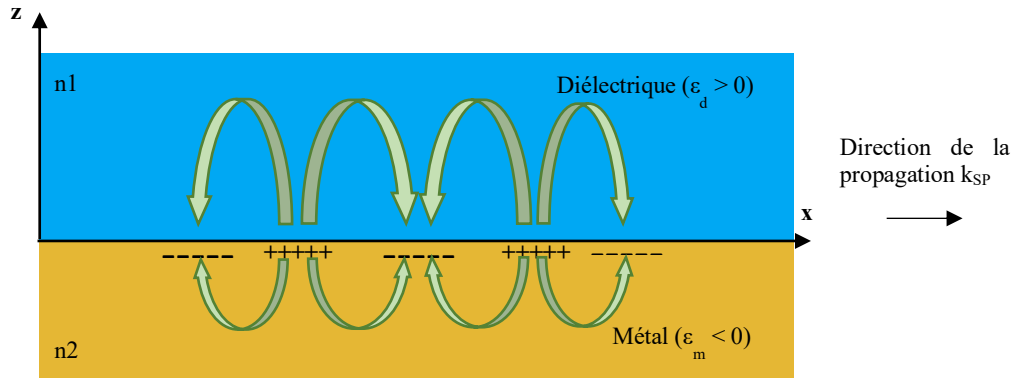


Figure 18: Schéma des ondes de plasmons de surface se propageant à l'interface entre un diélectrique et un métal. L'intensité de l'onde décroît proportionnellement en fonction de la distance à l'interface. (+) et (-) correspondent à l'oscillation collective des électrons de conduction à la surface d'un métal semi-infini.

2- Couplage de l'onde incidente et excitation des plasmons de surface propagatifs

En se basant sur les courbes de dispersion de chaque mode électromagnétique (photons en propagation libre, plasmons de surface), les conditions d'existence peuvent être extraites et les possibilités de couplage entre ces modes peuvent être déterminées. La conversion d'un mode vers un autre n'est possible que si s'il y a conversion de l'énergie d'un photon vers un mode plasmon et que l'accord des phases est respecté tel que :

$$k'_{SP} = n_d k_0 \sin(\theta_{\text{incident}}).$$

Avec k_0 le vecteur d'onde dans le vide tel que $k_0(\omega) = \frac{\omega}{c} = \frac{2\pi}{\lambda_0}$, et tel que $n_d k_0 \sin(\theta_{\text{incident}})$ le vecteur d'onde de l'onde incidente dans un milieu diélectrique d'indice n_d avec un angle d'incidence θ .

Cette équation n'est vérifiée que si l'onde incidente provient d'un milieu d'indice plus élevé tel que $k > k'_{SP}$. En effet, il est impossible d'exciter les plasmons de surface directement avec une onde électromagnétique en propagation libre dans le milieu diélectrique à l'interface métal/diélectrique. Il faut donc implémenter des techniques particulières de couplage afin d'exciter le mode plasmon de surface reposant sur l'augmentation du vecteur d'onde de l'onde électromagnétique incidente.

La technique la plus utilisée dans les capteurs à lecture plasmonique disponibles actuellement pour assurer l'égalité des constantes de propagation d'une onde libre incidente et du mode guidé du plasmon est le couplage par prisme en configuration de Kretschman (Figure 19). Cette méthode consiste à utiliser un prisme de verre d'indice de réfraction plus élevé que le diélectrique sondé (typiquement $n_p > 1.5$), sur lequel est

déposé une couche métallique de quelques dizaines de nm d'épaisseur. La lumière incidente traverse le prisme avec des angles supérieurs à l'angle critique θ_c générant des ondes évanescentes qui traversent la couche métallique et qui excitent les électrons libres à sa surface afin de former un mode plasmonique de surface à l'interface métal/diélectrique. Le couplage entre l'onde incidente et l'onde de plasmon de surface respecte la condition :

$$k_{SP} = n_p k_0 \sin(\theta_{\text{résonnance}}).$$

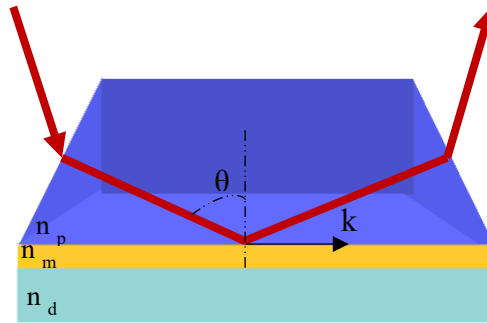


Figure 19: Excitation des plasmons de surface en configuration de Kretschmann avec un prisme d'indice n_p recouvert d'une couche métallique d'indice n_m et d'épaisseur e_m de quelques nanomètres.

3- Propriétés fondamentales des plasmons de surfaces propagatifs

La partie réelle du vecteur d'onde k'_{SP} correspond à la propagation de l'onde à l'interface. La partie imaginaire k''_{SP} , quant à elle, traduit la perte et l'énergie dissipée dans les milieux. Elle permet de calculer l'atténuation qui est utilisée pour définir la longueur de propagation du plasmon à l'interface (L_x). Elle correspond à la distance à laquelle l'intensité du plasmon de surface est diminuée jusqu'à $\frac{1}{e}$. Elle s'exprime en fonction de l'équation (1.15), avec :

$$L_x = \frac{1}{2 k''_{SP}}$$

Le plasmon de surface est guidé à l'interface métal/diélectrique selon l'axe x et est évanescent dans les directions perpendiculaires selon l'axe z. Ainsi, les profondeurs de pénétration de l'onde de plasmon de surface et dans le milieu diélectrique ($L_{z,d}$) et dans le milieu métallique ($L_{z,m}$) peuvent être calculées. Cette profondeur de pénétration définit la pénétration maximale du champ électrique E, qui décroît exponentiellement, selon l'axe z dans chacun des substrats (Figure 20). Dans chacun des deux milieux, la profondeur de pénétration est définie comme la distance à laquelle l'intensité de l'onde

vaut $\frac{1}{e}$ de l'intensité maximale, et s'écrit, en fonction des équations (1.7) et (1.8) tel que :

Dans le diélectrique :

$$L_{z,d} = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{\frac{|\epsilon'_m| + \epsilon_d}{\epsilon_d^2}}$$

Dans le métal :

$$L_{z,m} = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{\frac{|\epsilon'_m| + \epsilon_d}{\epsilon'_m^2}}$$

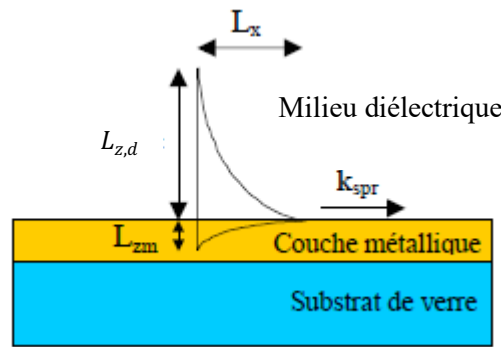


Figure 20: Illustration de l'atténuation exponentielle de l'intensité du champ électrique à l'interface métal/diélectrique.

Il est important de noter que le modèle utilisé suppose que la couche d'or est semi-infini. En pratique, les longueurs de pénétration et de propagation calculées par les formules ci-dessus seront assez bien vérifiées pour des films d'or de 50 nm, typiquement utilisés en SPR. Pour un film d'or plus fin, la longueur de propagation en particulier sera nettement plus faible. La profondeur de pénétration aura tendance elle à légèrement augmenter.

De manière générale, la profondeur de pénétration dépend de la longueur d'onde et des permittivités des matériaux utilisés. La Figure 21 montre la profondeur de pénétration et la longueur de propagation d'un plasmon de surface à l'interface entre l'or et un milieu diélectrique en fonction de la longueur d'onde. Pour une longueur d'onde $\lambda = 700$ nm, la partie réelle de la permittivité de l'or $\epsilon'_m \approx -16$, et partie réelle de la permittivité du milieu diélectrique est $\epsilon'_d \approx 1.77$. Une profondeur de pénétration dans l'eau de 238 nm a été calculée (Figure 21 – a), ce qui permet ainsi de détecter des changements ayant lieu uniquement au voisinage de l'interface métal/diélectrique, i.e. de ne quantifier que les événements ayant lieu à la surface du substrat au niveau des points d'accroche cellule/substrat.

De son côté, la longueur de propagation augmente en fonction de la longueur d'onde. Dans le cadre de l'imagerie cellulaire par SPR, les longueurs d'onde utilisées se situent entre 700 nm et 800 nm. Avec une lame d'or de 50 nm d'épaisseur qui est l'optimum en terme de couplage, la longueur de propagation serait de l'ordre de quelques dizaines de micromètres (Figure 21 – b). Cela serait beaucoup trop limitant pour imager les activités cellulaires à la surface des substrats pour des cellules d'environ 30 μm de large. C'est pourquoi, comme il sera démontré plus loin, des films d'or de 30 nm ont été utilisés afin d'abaisser la longueur de propagation à un peu moins de 4 μm .

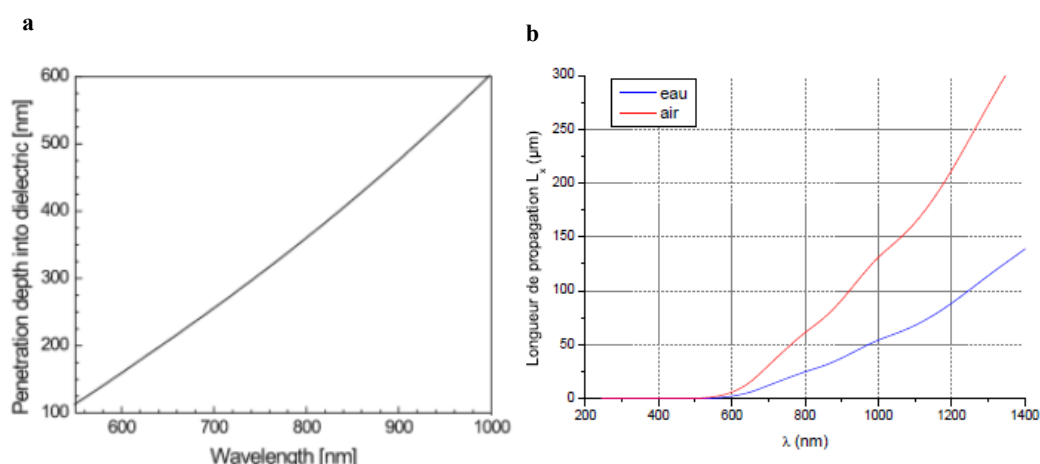


Figure 21: **a)** Profondeur de pénétration d'un plasmon de surface ($L_{z,a}$) à l'interface entre le métal (= or) et un milieu diélectrique (= eau) (en nm) en fonction de la longueur d'onde⁸⁶. **b)** Longueur de propagation L_x en (μm) en fonction de la longueur d'onde à l'interface entre un substrat d'or et soit un milieu diélectrique soit l'air. [figure extraite de la thèse de JF Bryche]

4- Biocapteur plasmoniques

L'utilisation principale de la résonance des plasmons surface est la détection d'interactions biologiques à la surface de métal. Plusieurs configurations de biocapteurs SPR ont été conçues pour la biodétection et permettent la quantification de toutes perturbations à la surface du métal/diélectrique engendrant un changement dans le profil de résonance. Le choix de l'or dans les études plasmoniques appliquées à la biodétection est lié à sa stabilité chimique et sa biocompatibilité. Il est possible de calculer l'angle de résonance lorsque plusieurs couches sont déposées, aussi bien pour des couches métalliques ou organiques, grâce à la méthode de Rouard⁸⁷.

Ainsi, la mesure de ce signal SPR peut se faire soit par une simple mesure de réflectivité, soit par un balayage angulaire ou spectral. En effet, lorsqu'il y a une perturbation au niveau du milieu couvrant, l'indice optique du diélectrique change, ce qui impacte les conditions de couplage. Ces perturbations se traduisent par un changement de l'intensité lumineuse de l'onde réfléchie. La Figure 22 montre qu'il existe deux types d'interrogations possibles afin de quantifier la surface : Soit un balayage angulaire en mesurant la réflectivité normalisée en fonction de l'angle de la

lumière incidente (Figure 22 – b). Un décalage angulaire de l'angle de résonance est observé, dû à la formation d'un film biomoléculaire d'indice de réfraction 1.41 de différentes épaisseurs (0, 5 ou 10nm) sur la lame d'or. Ici le couplage est fait avec un prisme en verre SF10 en contact avec un milieu diélectrique liquide (eau) à une longueur d'onde fixe de 660nm⁸⁸. Soit un balayage spectral où la réflectivité est représentée en fonction de la longueur d'onde incidente (Figure 22 – b). Dans ce cas, l'interrogation spectrale est effectuée entre 500 à 850 nm pour la configuration de Kretschmann avec un prisme en verre BK7 en contact avec l'eau. Le calcul de réflectivité se fait à angle fixe et montre un décalage spectral de la longueur d'onde de résonance entre les zones où il n'y a que de l'or nu et les zones fonctionnalisées avec des oligonucléotides⁸⁹.

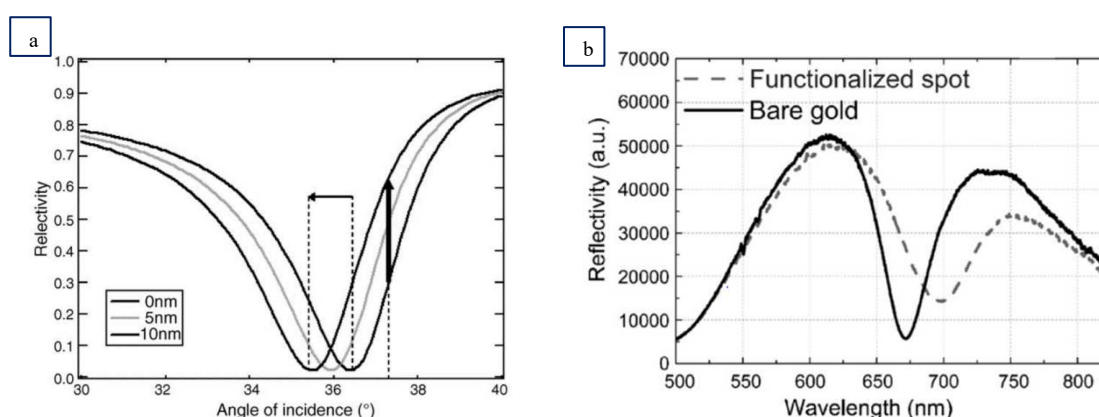


Figure 22: *(a)* Décalage angulaire dû à la formation d'un film biomoléculaire de différentes épaisseurs⁸⁸. *(b)* Décalage spectral dû à un changement de l'indice de réfraction à la surface de l'or⁸⁹.

B- Imagerie SPR à haute résolution

1- Imagerie SPR : SPRI

La plupart des systèmes plasmonique utilise un système d'imagerie optique permettant de faire de l'imagerie (SPRI) sur les substrats plasmoniques et ainsi de suivre en temps réel dans le plan de l'interface métal/diélectrique les interactions se passant à la surface de ce dernier en mesurant les différents changements de réflectivité au cours du temps avec une caméra⁹⁰. Il est ainsi possible d'imager le film métallique et, par traitement des images, extraire les variations locales d'intensité lumineuse⁹¹.

En raison de la longueur de propagation du plasmon (plusieurs microns) et de la présence d'un prisme qui limite l'ouverture numérique (NA) et le grossissement du système d'imagerie, la résolution spatiale en SPRI est très inférieure aux limites de résolution obtenues en microscopie conventionnelle⁹² ($\sim 0,2\mu\text{m}$ pour un microscope

optique à lumière blanche). Les sources d'optimisation possibles dans ce domaine vont du choix du métal, à la source d'excitation du plasmon, en passant par la conception du prisme, la structure ou les paramètres d'épaisseur et de multicouches.

2- La microscopie SPR

La microscopie SPRI est une approche utilisant un objectif de microscope à forte ouverture numérique au lieu du prisme pour le couplage de la lumière incidente⁹³. Cette configuration permet d'atteindre de forts grossissements et une résolution à la limite de la diffraction (environ 300nm), uniquement dans la direction perpendiculaire à la propagation des plasmons, la résolution restant mauvaise dans l'autre direction. Il s'agit d'une configuration de type TIRF ou l'angle d'incidence élevé du faisceau sur le film d'or nécessaire aux plasmons est obtenu en focalisant le faisceau sur le plan focal arrière de l'objectif à forte ouverture numérique. Ainsi le substrat est éclairé par le faisceau collimaté à la sortie de l'objectif à un angle choisi calibré autour de l'angle de résonance, et il est possible d'obtenir directement des images de la surface du substrat avec peu d'aberrations géométriques. La Figure 23 montre le montage expérimental d'un microscope SPR avec un objectif à forte ouverture numérique dont l'huile d'immersion a un indice de réfraction plus élevé que celui du milieu. Ainsi quand le faisceau incident sera décalé au bord de l'ouverture arrière de l'objectif, il atteindra l'échantillon à un angle supérieur que l'angle critique.

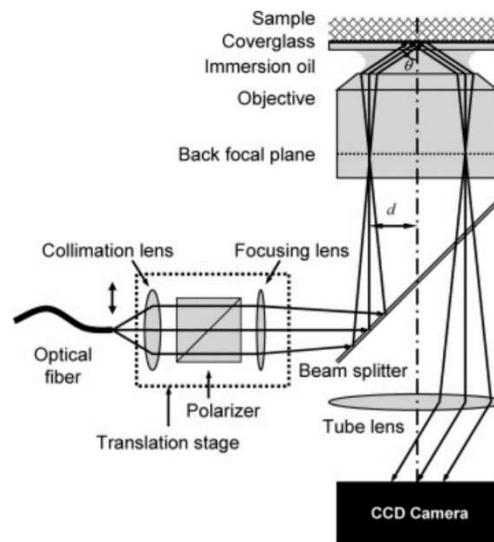


Figure 23: Principe d'un microscope SPRI avec objectif à forte ouverture numérique ($NA=1,40$)⁹³.

Dans un cadre de caractérisation de la mesure cellulaire, la spectroscopie de résonance

des plasmons de surface conventionnelle (sans imagerie) a été utilisée comme outil de détection de processus cellulaires pour observer des variations d'indice de réfraction associées à l'adhésion ou pas de cellules vivantes à la surface métallique⁹⁴. Cependant cette technique reste peu adaptée à l'étude de phénomènes cellulaires à l'échelle de cellules individuelles ou de monocouche car elle ne permet d'obtenir que la réponse moyenne d'une large population cellulaire sans donner d'informations sur l'homogénéité de cette dernière. Pour cela plusieurs études ont utilisé l'imagerie par résonance des plasmons de surface (SPRI) pour pouvoir imager des cellules en milieu de référence et en présence de différents agents externes^{95,96}. Généralement, ces systèmes sont en configuration de Kretschmann. Or, plusieurs aberrations sont générées par l'utilisation d'un prisme. Ainsi, dans le but d'améliorer la résolution spatiale des images obtenues afin de clairement distinguer les cellules les unes des autres⁹⁷, un microscope SPR comme décrit dans la Figure 23 a été utilisé pour ces travaux de thèse. Cette amélioration de la résolution et de la qualité du signal obtenu permet d'imager les activités cellulaires, leur adhésion, changement de morphologie et de détachement^{98,99}. Cependant, l'utilisation de la microscopie SPR limite le champ de vision à des fenêtres de maximum 200 x 200 μm^2 .

Conclusion partielle : Dans le but de développer un biocapteur plasmonique permettant de quantifier les dysfonctions endothéliales qui ont lieu en présence de toxines bactériennes, il faudrait assembler des cellules endothéliales afin de fabriquer une monocouche cellulaire endothéliale fonctionnelle. De ce fait, la microstructuration a été utilisée comme un outil permettant de contrôler, dans un premier temps, l'adhésion des cellules individuelles sur des substrats d'or fonctionnalisés selon des géométries définies. Puis dans un deuxième temps, elle permet d'induire de la connectivité entre les cellules en contrôlant les espacements entre les microstructures dans lesquelles les cellules sont confinées. La mise en place d'une connectivité entre les cellules permet d'établir des jonctions endothéliales entre les cellules. Le phénotype fonctionnel de la monocouche cellulaire fabriquée sera ensuite évalué par imagerie SPR.

CHAPITRE 3 : CONTROLE DE L'AUTO-ASSEMBLAGE DES CELLULES ENDOTHELIALES

SECTION 1 : CONTROLE DE L'ADHESION DE CELLULES ENDOTHELIALES INDIVIDUELLES

Dans le but d'étudier et de moduler l'intégrité de la barrière endothéliale dans un cadre d'imagerie plasmonique, l'adhésion et l'auto-assemblage de cellules endothéliales sur des substrats d'or sont contrôlés afin de développer un modèle endothélial *in vitro*. Un protocole de microstructuration combinant des techniques de chimie de surface et de photolithographie douce a été développé [Figure 24]. Ce protocole s'inspire des travaux de Whitesides et al. (1997) qui utilisent des molécules de PEG afin de bloquer l'adhésion cellulaire ont guidé le choix des molécules de passivation. Dans ces travaux-là, l'accroche à la surface de l'or se fait via le dépôt d'une première couche d'hexadecane thiols et la microstructuration de la surface se fait par microcontact printing. Dans ces travaux, le choix s'est porté sur des molécules de PEG contenant initialement une partie d'accroche à l'or avec la présence de thiols et une terminaison fonctionnelle.

De plus, les études de microcontact printing sur les surfaces d'or présentent des inconvénients liés à la difficulté de contrôler le dépôt de différentes couches sur les surfaces d'or en comparaison avec les surfaces de verre. Ainsi, les travaux de Azioune et al. (2010) qui présentent une technique de microstructuration par illumination aux UV lointains ont guidé le choix de la technique de microstructuration dans ces travaux. En effet, ils travaillent sur des surfaces de verre et démontrent que les PEG-silanes se photodégradent selon les géométries des zones en quartz du photomasque qu'ils ont fabriqué. Ainsi en combinant des techniques de chimie de surface des travaux de l'équipe de Whitesides et al. et des techniques de microstructuration par illumination UV de l'équipe de Piel, Théry et al., un protocole de microstructuration a été développé afin de contrôler l'adhésion des cellules sur des substrats d'or.

Dans le premier chapitre de cette section, les différentes étapes du protocole de microstructuration des substrats d'or ont été décrites puis caractérisées afin de confirmer l'homogénéité du dépôt des molécules de PEG, puis de la bonne fonctionnalisation de la surface pour des applications biologiques. Ce protocole est représenté Figure 24, et a été développé pour le contrôle de l'adhésion de cellules endothéliales selon des géométries définies. Ensuite, les paramètres de confinement de cellules individuelles de deux types cellulaires endothéliaux en fonction de la surface des régions adhésives sont présentés.

I- Développement du protocole de microstructuration pour le contrôle de l'adhésion cellulaire

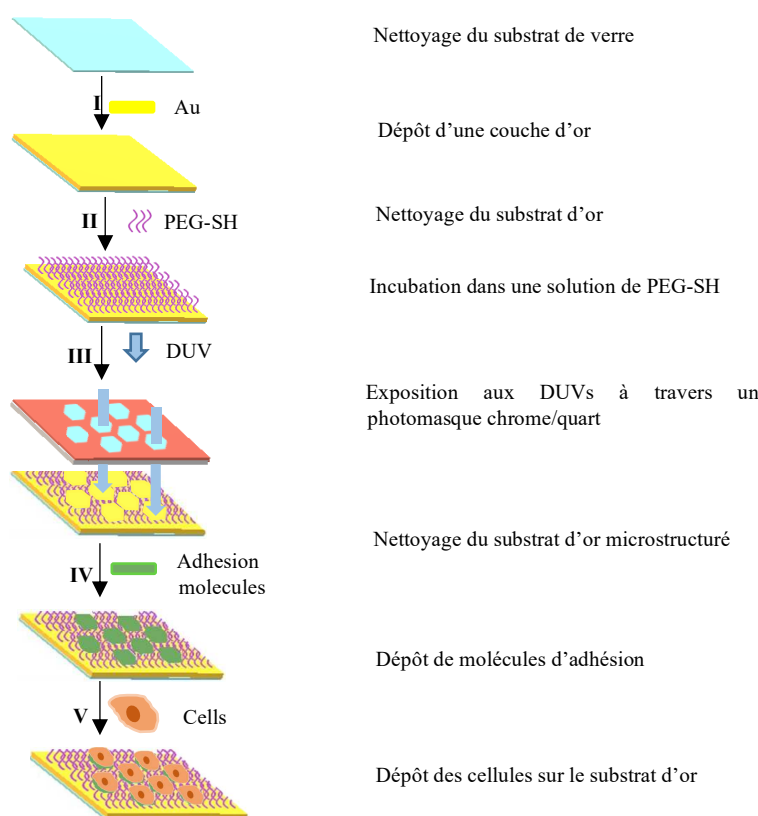


Figure 24: Schéma du protocole de microstructuration des substrats d'or en combinant des techniques de chimie de surface et microstructuration par illumination Deep-UVs. I- dépôt d'une couche d'or sur les substrats de verre nettoyés. II- Passivation des substrats d'or avec des molécules de PEG-SH. III- Photo dégradation des molécules de PEG par illumination Deep-UVs selon les géométries du photomasque. IV- fonctionnalisation des substrats d'or microstructurés avec des molécules d'adhésion. V- Dépôt de cellules sur les substrats microstructurés et contrôle de l'adhésion cellulaire.

A- Dépôt des substrats d'or

Des lamelles de verre de microscopie (BK7) de taille 22x22 mm sont utilisées comme base du substrat. Le nettoyage est effectué en salle blanche afin de réduire les risques de contamination des substrats par des poussières qui pourraient compromettre l'uniformité des dépôts de faibles épaisseurs (< 50 nm) des métaux par la suite. Un nettoyage aux solvants : Acétone (5 min), Isopropanol (5 min), eau déionisée (5 min) est effectué pour enlever tous les contaminants. Les lamelles sont ensuite séchées à l'azote avant d'être placées sous vide pour le dépôt des métaux (BOC Edwards evaporator, modèle : AUTO 306). Le dépôt se fait par évaporation thermique : les métaux sont portés à haute température jusqu'à leurs points d'ébullition par un faisceau

d'électrons focalisé ou par effet Joule. Les atomes diffusent alors sur le substrat fixé sur un support dont la rotation assure l'uniformité du dépôt. Pour les échantillons utilisés ici, une première couche de titane de 3 nm d'épaisseur a été déposée afin de permettre une bonne accroche de la couche d'or de 30 nm d'épaisseur ensuite. Le choix de 30 nm d'épaisseur du film d'or prend en compte des études précédentes de l'équipe en imagerie plasmonique où l'impact de l'épaisseur du film métallique sur le contraste et la longueur de propagation du plasmon a été modélisé¹⁰⁰. En effet, un film d'or plan de 30 nm d'épaisseur présente une perte de contraste dans les images SPR d'environ 25% par rapport à un film d'or de 50 nm d'épaisseur, mais correspond à une longueur de propagation 4 fois plus faible avec une meilleure résolution spatiale¹⁰¹. Cette épaisseur semble ainsi être la plus adaptée pour nos études d'imagerie par résonance des plasmons de surface de cellules nécessitant l'obtention d'images de bonne résolution pouvant atteindre des valeurs inférieures au micromètre.

B- Nettoyage des substrats d'or

La propreté du substrat est un paramètre critique pour la suite de la chimie de surface. Plusieurs contaminants peuvent être physisorbés et peuvent modifier la cinétique de formation des SAMs. Après le dépôt des métaux en salle blanche, les échantillons sont mis sous vide et transportés à l'Institut de Pharmacologie de Sherbrooke (IPS) où toutes les étapes de chimie de surface et de dépôt des cellules seront effectuées. La première étape de nettoyage des substrats est primordiale pour une bonne passivation de la surface d'or. Ce protocole de nettoyage a été développé au Laboratoire Charles Fabry¹⁰² et consiste à exposer les lames d'or à un plasma d'oxygène (45 W – 700 mTorr) pendant 10 min afin de retirer les résidus organiques et d'activer la surface d'or. Cette activation élimine les carbonés de contaminations à la surface et augmente la force d'interaction S-Au à l'interface métal-soufre¹⁰³. Puis un rinçage est effectué dans un mélange d'eau pure et de H₂O₂ à un taux de dilution de 3 : 1 à 70° pendant 10 min. Ensuite les lames sont rincées dans de l'eau pure puis dans une solution d'éthanol pur. Ces 3 étapes sont capitales pour un bon greffage de thiols à la surface par la suite.

C- Passivation des substrats d'or

Dans le but de contrôler spatialement l'adhésion des cellules sur les substrats d'or, la première étape consiste à déposer sur l'ensemble de la surface d'or des molécules de passivation qui vont bloquer l'adhésion cellulaire comme les polyéthylènes glycols (PEG). Le choix des molécules de passivation s'est porté sur un PEG ayant une accroche qui se fait par la fonction thiol (HS), l'espaceur est une chaîne alkyle composée de 6 éthylènes glycols, et le groupe fonctionnel est un alcool : HS-C₁₁-EG₆-OH (*Prochimia*) (Figure 25). Ce composé sera appelé, par simplification, PEG-SH dans la suite de l'étude.

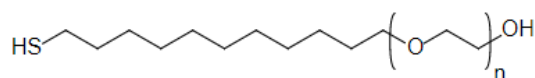


Figure 25: Structure chimique du PEG-SH utilisé pour la passivation des surfaces d'or.

Les lames sont incubées dans une solution de PEG-SH dans l'éthanol pur à 0.5 mM pendant 1h. Des tests, décrits juste en dessous, ont été effectués pour optimiser ce temps d'incubation des lames dans la solution de PEG-SH et 1h est suffisant pour l'autoassemblage des SAMs et la passivation des substrats.

Le dépôt des molécules de PEG-SH à la surface des substrats d'or est d'abord caractérisé par spectroscopie électronique des rayons X (XPS). Cette technique d'analyse permet de déterminer la composition chimique des surfaces de matériaux en excitant la matière par des rayons X. L'énergie cinétique des photoélectrons émis permet de déterminer l'énergie de liaison entre les électrons de cœur et les noyaux des atomes. Les caractérisations XPS ont été réalisées dans la plateforme de recherche et d'analyse des matériaux (PRAM) de l'Université de Sherbrooke.

Un premier échantillon a été caractérisé juste après l'étape de nettoyage (étape I schéma Figure 24), et deux autres échantillons après incubation pendant 12 h et 1h dans une solution de 0.5 mM de PEG-SH. Les spectres XPS des atomes de carbones (C(1s)) montrent que le substrat uniquement nettoyé présente un pic principal à 284.8 eV attribué aux carbones de contaminations (Figure 26 – a) tandis que les substrats incubés dans la solution de PEG-SH présente des pics à 285 eV et 286.6 eV (± 0.2 eV) caractéristiques de liaisons C – O (Figure 26 – b1 – b2). L'échantillon incubé pendant 1h dans la solution de PEG-SH (Figure 26 – b1) présente une intensité du pic pour la liaison C-C moins élevée que celle observée pour l'échantillon incubé pendant 12 h avec dans les deux cas une intensité des pics identique pour la liaison C-O (Figure 26 – b2). La caractérisation XPS confirme le dépôt des molécules de PEG-SH sur la surface nettoyée, de manière différente après 1h et après 12 d'incubation. L'autoassemblage des molécules de PEG-SH à la surface en Self-Assembled Monolayers (SAMs) nécessite une caractérisation plus poussée impliquant une étude des concentrations des différents éléments sur la surface. L'homogénéité de l'autoassemblage des PEG-SH est quant à elle vérifiée par l'ajout de cellules endothéliales EAhy926 sur les substrats d'or. En effet, les cellules se déposent partout à la surface des substrats après l'étape de nettoyage (Figure 26 – c) contrairement à ce qui a été observé après incubation de la lame dans la solution de PEG-SH : les SAMs de PEG-SH empêchent l'adhésion des cellules sur la totalité de la surface du substrat d'or (Figure 26 – d). Dans cette étude, le résultat final qui importe est l'adhésion des cellules à la surface de substrats d'or. En effet, les cellules n'adhèrent pas à la surface des substrats, aussi bien après 1h d'incubation dans la solution de molécules de PEG qu'après 12h.

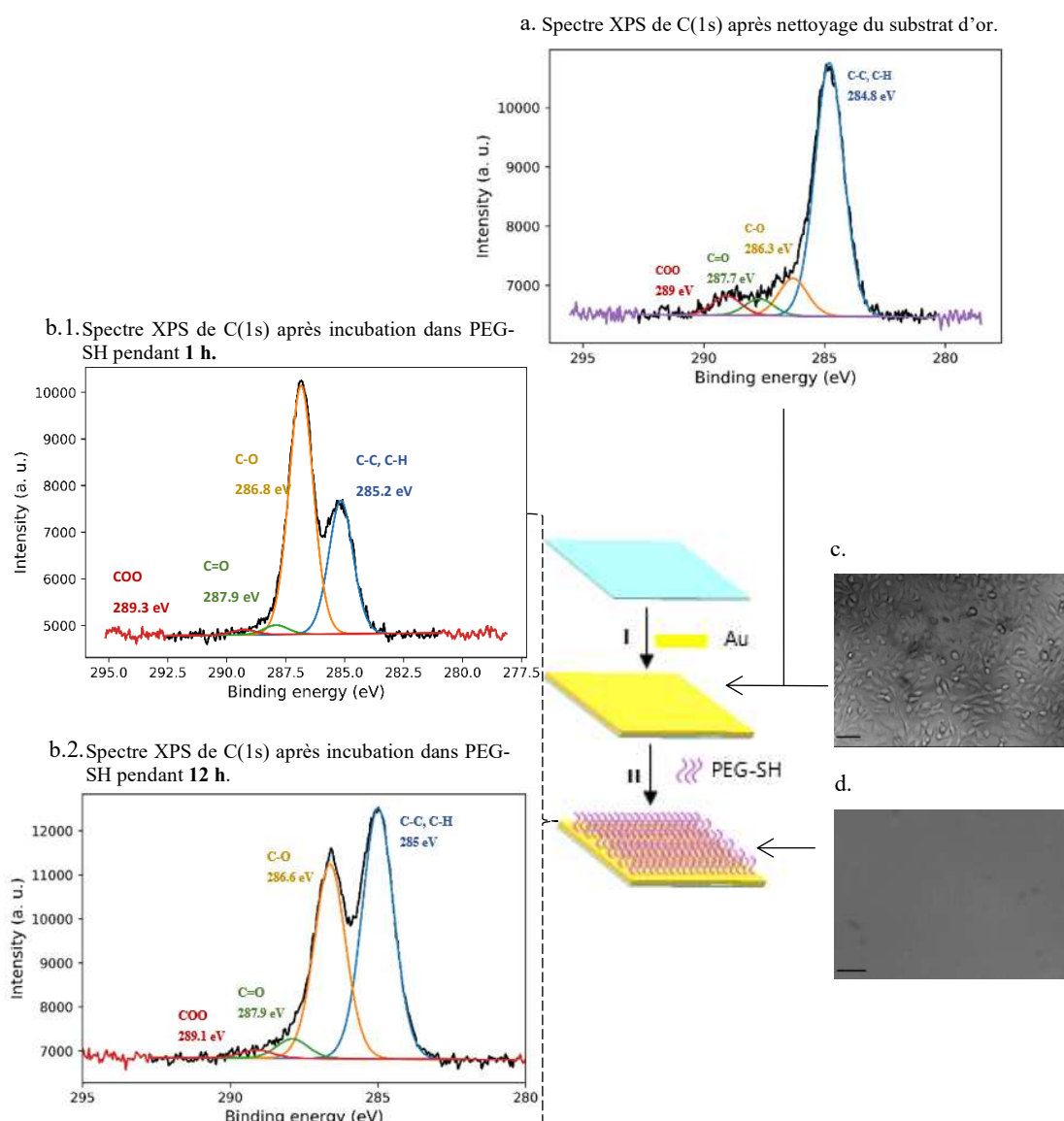


Figure 26: Caractérisation de l'étape de passivation des substrats d'or dans une solution de PEG-SH à 0.5 mM : Caractérisation XPS de la surface des substrats d'or : **a)** après nettoyage **b1)** après incubation dans la solution de PEG-SH pendant 1 h. **b2)** après incubation dans la solution de PEG-SH pendant 12 h. Caractérisations cellulaires et image en champs clair des échantillons d'or où les cellules endothéliales EAhy926 ont été déposées : **c)** après l'étape de nettoyage **d)** après incubation dans une solution de PEG-SH pendant 1 h. Les images ont été effectuées avec un objectif 10X permettant d'observer une grande surface de l'échantillon. (Barre d'échelle = 100 μ m).

D- Microstructuration de la surface par illumination Deep-UVs

Après passivation de l'ensemble de la surface de l'échantillon avec les PEG-SH empêchant l'adhésion des cellules en formant des SAMs à la surface des substrats, il est nécessaire ensuite de microstructurer par illumination UV lointain ($\lambda < 200$ nm) les substrats d'or afin de générer des zones adhésives et non-adhésives de façon contrôlée.

La première étape est la fabrication d'un photomasque chrome/quartz adapté aux études souhaitées. Le design des masques a été effectué sur Layout Editor avec des scripts Python. La fabrication a été faite par la compagnie PHOTOMASK PORTAL. (Annexes – Section 1 - A-). Le premier masque fabriqué contient des géométries différentes (hexagones, lignes et carrés) de tailles et d'espacements différents afin d'effectuer des premiers tests de microstructuration. La partie chrome du masque est opaque aux DUVs tandis que la partie quartz du masque est la partie transparente aux DUVs où les PEGS seront photodégradés en raison de leur photosensibilité à des longueurs d'ondes $\lambda < 200$ nm. Le photomasque est d'abord nettoyé dans une solution d'éthanol puis séché avec un jet d'azote, avant d'être exposé, face chromée orientée vers la lampe (UVO Cleaner model 342-220) pendant 5 min afin de le rendre hydrophile. Ensuite une goutte d'eau DI (3 μ L) est déposée sur le côté chrome du masque au niveau de la région d'intérêt où la lame d'or sera déposée avec le côté du film d'or passivé directement en contact avec le masque. Ensuite l'ensemble du masque et de la lame d'or est exposé aux DUVs avec la face quartz orientée vers la lampe pendant 5 min. Ce temps d'exposition correspond à une dose d'exposition de 900 J/m². Le temps d'exposition est un paramètre important pour la microstructuration des échantillons¹⁰⁴. Après l'illumination DUVs, environ 3mL d'eau DI est ajoutée sur le masque afin de décoller la lame d'or pour la sécher avec un jet d'azote. Les substrats sont ensuite rincés dans une solution d'éthanol pur pendant quelques minutes afin d'éliminer les molécules photodégradées par les DUVs et peuvent être stockés dans une cloche sous vide pour environ 3 semaines avant utilisation.

La caractérisation XPS de la surface des substrats d'or passivés puis exposés aux DUVs montre des spectres XPS des atomes de carbones différents pour les régions qui se trouvaient au niveau de la partie transparente en quartz du photomasque (que l'on appellera zones quartz), et celles qui se trouvaient au niveau des régions opaques chromées du photomasque (appelées zones chrome). En effet, dans les zones quartz exposées aux UVs, on observe une nette diminution du pic correspondant aux liaisons C-O, attribuées aux PEG-SH, tandis que le pic des liaisons C-C attribué aux carbones de contamination lui augmente (Figure 27 – a). Dans les zones chromes opaques aux UVs, on observe une nette diminution du pic des liaisons C-C (carbones de contamination) tandis que le pic des liaisons C-O attribués aux PEG-SH est plus élevé (Figure 27 – b). Ainsi, les polymères de PEG-SH ont été photodégradés au niveau des zones quartz. En revanche, les polymères de PEG-SH au niveau des zones chrome n'ont pas été photodégradés et sont encore accrochés à la surface d'or.

De plus, la surface des substrats d'or passivés puis exposés aux DUVs a été caractérisée par SPR dans le but d'observer les microstructures. En effet, l'utilisation d'un banc SPR à prisme en configuration de Kretschmann (décrit en détail dans la section matériels et

méthodes) permet, dans les bonnes conditions de couplage, de révéler les microstructures où les films moléculaires de PEG-SH ont été photodégradés. Les conditions de couplage ont été déterminées en réalisant un balayage spectral à un angle de résonance fixé à 26° dans l'air afin d'exciter les plasmons de surface se trouvant dans des régions de proche infrarouge pour lesquelles la caméra a une meilleure sensibilité. Le balayage spectral a été effectué entre 650 nm et 800 nm avec une longueur d'onde de résonance à 700 nm. Un léger décalage est observé entre les courbes de résonance des microstructures (rouge) et celles des régions passivées autour (bleu) (Figure 27 – c). Ainsi, vu que les microstructures résonnent à un angle de 26° et une longueur d'onde de 700 nm, elles ont un contraste différent des zones d'or passivées les entourant et peuvent être révélées par SPR (Figure 27 – d).

L'ensemble de ces caractérisations permettent de confirmer la génération de deux régions bien différenciées, une où les films de PEG-SH ont été photodégradés au niveau des microstructures en quartz du photomasque, et une autre où les films de PEG-SH n'ont pas été photodégradés par les DUVs.

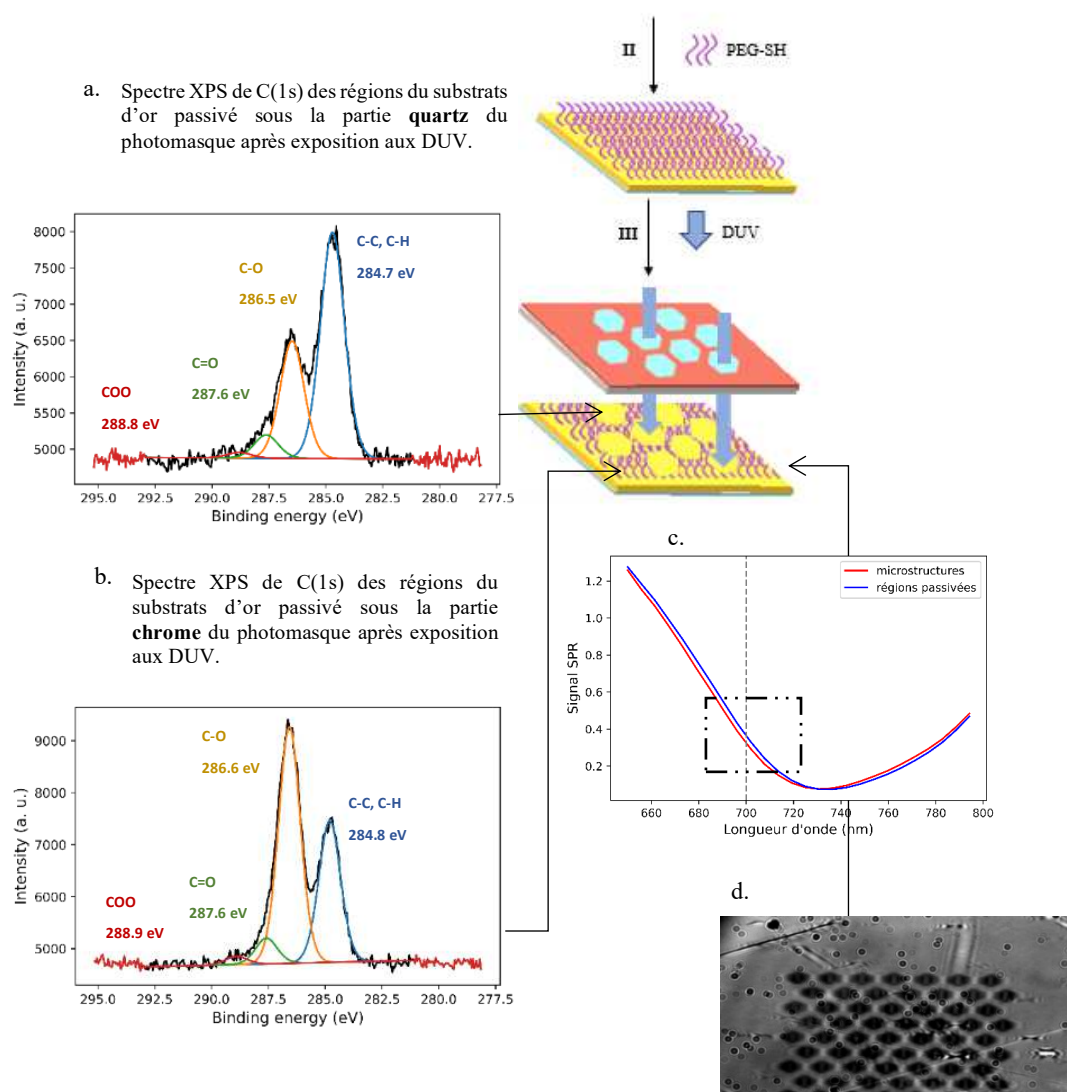


Figure 27: Caractérisation de l'étape de microstructuration de la surface des substrats d'or par illumination DUVs. Caractérisations XPS de la surface des substrats d'or : a) au niveau des régions quartz du photomasque et b) au niveau des régions chrome du photomasque. Caractérisations SPR de la surface des substrats d'or passivés après expositions aux DUVs à travers un photomasque : c) balayage spectral à un angle fixé à 26° dans l'air. d) Image SPR de la surface du substrat d'or à $\theta_{res} = 26^\circ$ et $\lambda_{res} = 700 \text{ nm}$.

E- Fonctionnalisation de la surface

1- Caractérisation SPR du dépôt des molécules d'adhésion

Après le nettoyage, la passivation des substrats d'or dans une solution de PEG-SH et la

microstructuration de leur surface par illumination DUVs, il faut enfin fonctionnaliser les zones où les films de PEG-SH ont été photodégradés avec des molécules d'adhésion afin de générer deux régions différentes : adhésives et non-adhésives.

Les dépôts de ces molécules d'adhésion ont été suivis en temps-réel par SPR afin de quantifier la fonctionnalisation des surfaces d'or. La fonctionnalisation de la surface est effectuée soit en incubant le substrat dans une solution de 500 μL de fibronectine à 5 $\mu\text{g/mL}$ (F0895 Sigma-Aldrich) pendant 1 h (Figure 28 – a), soit en déposant 200 μL d'un mélange d'une solution de fibronectine, collagène, laminine (Athena Enzyme Systems 0407) pendant 5 min (Figure 28 – b). Les molécules d'adhésion ont été injectées (flèches noires), puis incubées respectivement pour les figures 26, a et b, avant de rincer la surface (lignes pointillées rouges). Dans le but de quantifier le signal SPR dans les microstructures et dans les régions passivées qui les entourent, 5 régions d'intérêts ont été choisies, de même surface (ellipses de dimensions 3 μm et 7 μm), au niveau des zones de PEG-SH (cercles bleus dans les images SPR) et au niveau des microstructures (cercles jaunes dans les images SPR). Les cinétiques de dépôt des molécules d'adhésion dans ces régions sont représentées, dans les deux graphiques, par la courbe noire pour les régions au niveau des microstructures et par la courbe bleue pour les régions passivées. Après injection des promoteurs d'adhésion, on observe comme attendue une cinétique d'accroche au niveau des microstructures et rien sur les zones passivées en dehors d'un simple saut d'indice. Après rinçage de la surface du substrat microstructuré, le signal SPR au niveau des régions passivées retourne au niveau du signal de ligne de base. En revanche, le signal SPR au niveau des microstructures reste élevé. Il est intéressant d'observer qu'après rinçage, dans les deux conditions expérimentales, aucun plateau n'est atteint et que les cinétiques ne sont pas terminées. Cependant l'intérêt de cette expérience est de valider que les molécules d'adhésion se déposent uniquement au niveau des microstructures, et qu'un temps expérimental d'incubation de 5 minutes du mélange de la solution de fibronectine, collagène, laminine suffit pour fonctionnaliser les microstructures. De plus, en effectuant des calculs avec le code rouard, l'épaisseur de la couche de fibronectine déposée au niveau des microstructures après exposition aux DUVs a été déterminée. Pendant l'expérience, une variation de réflectivité de $\Delta R = 10^{-2}$ est mesurée. D'après nos calculs, cette variations correspond au dépôt d'une couche d'environ une centaine de nanomètres.

Ces deux expériences démontrent que les molécules d'adhésion se déposent, par adsorption, uniquement au niveau des microstructures où les films de PEG-SH ont été photodégradés lors de l'exposition aux DUVs. Ce protocole permet donc la génération de deux régions différenciées : une région adhésive et une région nonadhésive. Les expériences effectuées avec le mix d'une solution de fibronectine, collagène, laminine sont plus adaptées pour les applications cellulaires car elles nécessitent un court temps d'incubation. Ainsi, pour la suite des expériences, la promotion de l'adhésion cellulaire est effectuée en incubant les substrats d'or microstructurés dans la solution de mix de molécules d'adhésion pendant 5 min.

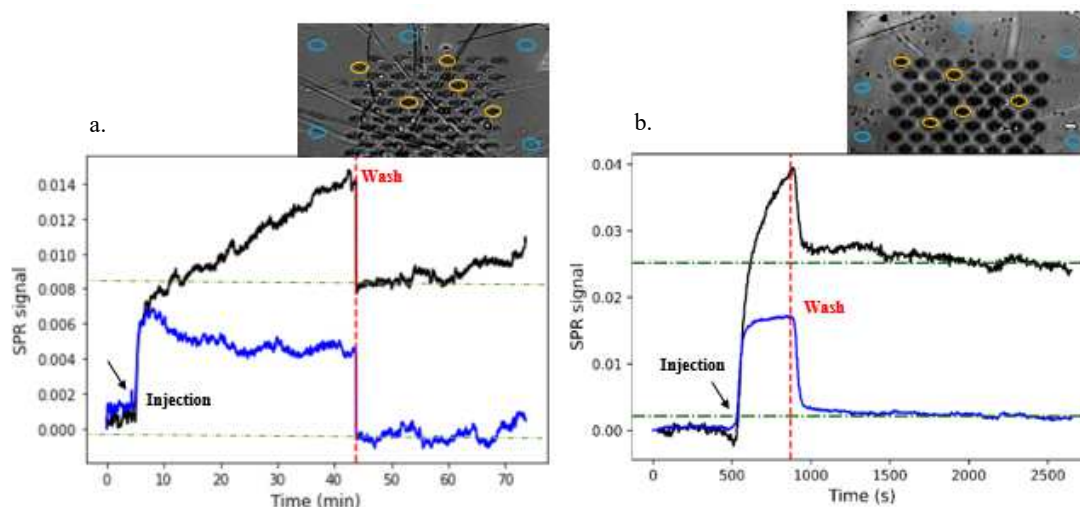


Figure 28: Cinétique en SPR de la déposition de molécules d'adhésion à la surface des substrats d'or passivés et exposés aux DUVs à travers un photomasque selon des structures définies : a) Incubation dans une solution de fibronectine (5 µg/mL) pendant 45 min. b) Incubation dans le mix d'une solution de fibronectine, collagène, laminine pendant 5 min. Les courbes noires représentent la moyenne dans les 5 régions d'intérêts choisies dans les microstructures (cercles jaunes dans les images SPR), tandis que les courbes bleues représentent la moyenne des 5 régions d'intérêts choisies dans les régions passivées (cercles bleus dans les images SPR). L'unité du signal SPR est en unité arbitraire (u.a.).

2- Caractérisation du dépôt des molécules d'adhésion par marquage au bleu de Coomassie

Après avoir démontré le dépôt des molécules d'adhésion uniquement au niveau des microstructures, il faudrait à présent confirmer que les microstructures observées ont bien les dimensions théoriques des géométries du photomasque utilisé pendant l'étape de microstructuration par illumination DUVs. La SPR n'a pas la résolution suffisante pour faire cette mesure, en particulier pour les espacements entre microstructures. Ainsi, les molécules d'adhésion déposées au niveau des microstructures ont été révélées par marquage au bleu de Coomassie, un colorant bleu spécifique aux protéines et observation au microscope en champ clair. Deux exemples d'un tel marquage sont montrés : l'un pour des hexagones de 35 µm de diamètre, espacés de 50 µm, dont le profil d'intensité au niveau de l'image confirme les dimensions théoriques du masque (Figure 29 – a) ; Ainsi que pour des hexagones de 35 µm de diamètre, espacés de seulement 3 µm (Figure 29 – b).

L'ensemble de ce protocole de microstructuration par illumination aux DUVs permet ainsi de générer des zones adhésives pour les cellules, en photodégradant les films de PEG-SH des surfaces de substrats d'or en contact avec les zones quartz du photomasque, avec une résolution qui peut atteindre quelques microns.

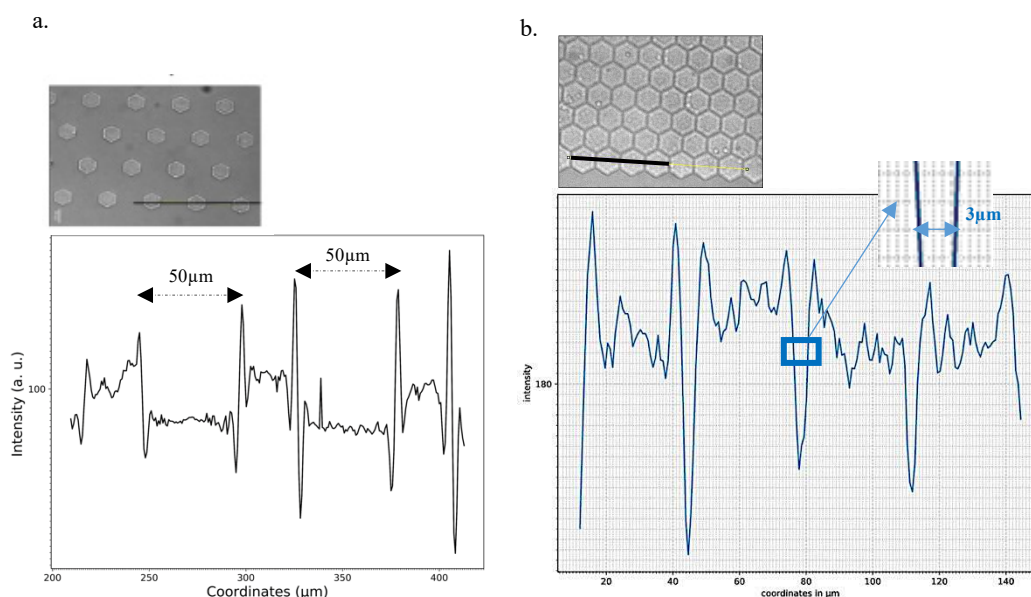


Figure 29: Marquage au Bleu de Coomassie des molécules d'adhésion déposées dans les régions adhésives où les films de PEG-SH ont été photodégradés selon les géométries du photomasque : a) hexagones de 35 µm de diamètre, espacés de 50 µm, observés en lumière en champs clair et le profil d'intensité correspondant à la ligne noire. b) hexagones de 35 µm de diamètre, espacés de 3 µm, observés en lumière en champs clair et le profil d'intensité correspondant à la ligne noire (en abscisse sont représentées les coordonnées (µm) et en ordonnées l'intensité des pixels (a. u)).

F- Applications cellulaires

La dernière étape de ce protocole de microstructuration consiste à déposer des cellules endothéliales sur les substrats d'or microstructurés et fonctionnalisés dans le but de contrôler leur adhésion selon les géométries définies du photomasque chrome/quartz. La caractérisation de l'étape de fonctionnalisation des surfaces d'or a permis de confirmer la génération de deux régions différenciées pour l'adhésion moléculaire. Cependant, il est important de noter que le dépôt des molécules d'adhésion n'est pas indispensable pour l'adhésion cellulaire. En effet, lorsqu'on dépose des cellules endothéliales EAhy926 sur les substrats d'or après l'étape III du protocole de microstructuration, juste après exposition de l'échantillon aux DUVs, sans aucune fonctionnalisation avec les molécules d'adhésion, les cellules adhèrent uniquement dans les microstructures (Figure 30 – a1). Mais l'ajout de l'étape de fonctionnalisation permet d'obtenir une meilleure adhésion des cellules dans les microstructures : Les cellules adhèrent plus dans les microstructures, en un temps plus court (Figure 30 – a2).

Ainsi, ce protocole de microstructuration développé permet de contrôler l'adhésion des cellules endothéliales selon des géométries différentes : carrés (Figure 30 – a2), lignes

(Figure 30 – b) et hexagones (Figure 30 – c).

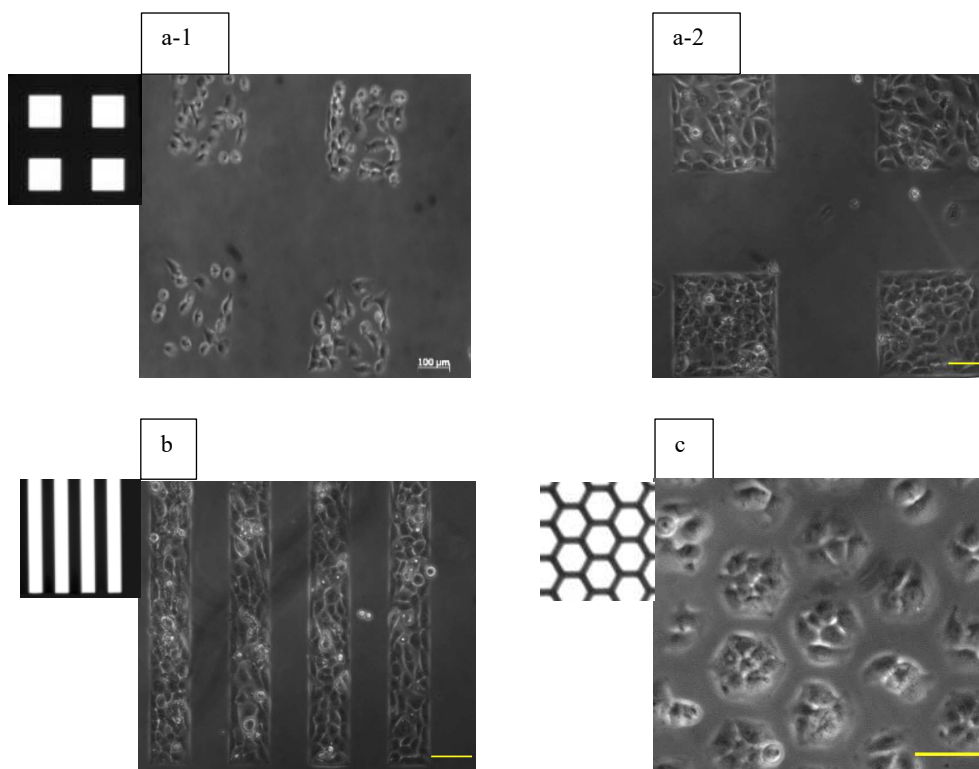


Figure 30: Images en champs clair de cellules EAhy926 adhérant sur les substrats d'or microstructurés selon différentes géométries des microstructures du photomasque (les microstructures en quartz sont représentées sur les images BF du photomasque en blanc) : a) géométries carrées de 250 μm de côté, espacées de 250 μm . ; 1) sans fonctionnalisation avec des molécules d'adhésion, 2) fonctionnalisation avec mix fibronectine/laminine/collagène. b) géométries en lignes : lignes de 100 μm d'épaisseur, espacées de 100 μm . c) géométries hexagonales : hexagones de 100 μm de diamètre, espacés de 25 μm . (Barre d'échelle = 100 μm).

Conclusion partielle : Un protocole de microstructuration de substrats d'or a été développé, en combinant des techniques de chimie de surface de thiols et de photolithographie par exposition aux DUVs. Les caractérisations des différentes étapes de ce protocole ont permis de valider sa reproductibilité et sa robustesse. Ce protocole a été développé dans le but de contrôler l'adhésion de cellules endothéliales selon des géométries définies, pour des applications plasmoniques.

A notre connaissance, lorsque ce protocole a été développé, la combinaison des techniques de chimie de surface de thiols et de photolithographie par exposition aux DUVs n'avait pas été effectuée auparavant dans les études de contrôle d'adhésion cellulaire sur des substrats d'or. Des travaux ont été publiés en septembre 2020 par Grandy et al.¹⁰⁴ qui combinent pour la première fois ces deux techniques. Une comparaison entre ces deux protocoles a été effectuée. La principale différence est le PEG-SH utilisé. D'ailleurs, dans leur article, Grandy et al. révèlent les limitations de

leurs travaux et concernant le PEG ils disent observer que la qualité de formation de SAMs dépend de la saison (hiver ou été) et du taux d'humidité. En effet, cette question a été discutée dans certains travaux qu'ils citent. Cependant, en démarrant ces travaux, deux PEG-SH différents ont été comparés : le PEG-SH de Sigma Aldrich comme utilisé par Grandy et al et le PEG-SH de Prochimia comme utilisé dans nos travaux. Dans leurs travaux, Grandy et al utilisent un PEG-SH (cat 729140 – Sigma Aldrich) contenant n chaînes de PEG : $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ incubé pour une durée de 48 heures. En prenant en compte l'information sur la masse molaire donnée par le fournisseur tel que $M_n = 2000$, il y a à peu près 44 unités de polyéthylènes glycols. Cependant, les différents paramètres nécessaires pour la formation d'un bon SAM ont été discutés dans l'état de l'art, et la longueur de la chaîne alkyle en fait partie. En effet, plus la chaîne alkyle est longue, plus il y a de chance de formation de complexes liés au fait que les chaînes s'agrègent ou se plient, et donc plus les probabilités d'avoir un dépôt homogène de SAMs baissent.

Dans les travaux présentés ici, le choix s'est porté sur le PEG-SH de Prochimia dont la chaîne alkyle est plus courte et contient 11 carbones et 6 éthylènes glycols. Les premiers tests de passivation pour l'adhésion cellulaire ont été effectués après 12 h d'incubation et ce temps a été optimisé à 1 h d'incubation des substrats d'or dans une solution de PEG-SH (Prochimia) d'une concentration de 0.5 mM. En comparant entre ces deux produits, une différence dans l'efficacité de passivation des deux produits a été observée. Les expériences effectuées avec le PEG-SH de Prochimia présentent 100 % de réussite pour bloquer l'adhésion cellulaire. Cependant les expériences faites avec le PEG-SH de Sigma-Aldrich avec une incubation de 48 h toujours dans les mêmes conditions présentaient un taux de réussite moins élevé d'environ une lame sur 3. ce choix s'est donc porté, sans surprise, sur le PEG-SH de Prochimia, afin de reproduire avec robustesse cette première étape de passivation nécessaire à la suite de l'étude.

En plus de la longueur de la chaîne alkyle, le groupement fonctionnel varie entre les deux produits : le PEG-SH de Sigma-Aldrich présente un groupement fonctionnel méthyle (CH_3), tandis que le PEG-SH de Prochimia présente un groupement fonctionnel alcool (OH). Dans la littérature, il a été démontré que le groupement fonctionnel des molécules de PEG jouait un rôle important dans la différenciation de cellules mésenchymateuses. Cependant, il reste à démontrer si en effet le fait que le groupement terminal fonctionnel soit différent dans ce cas impacterait sur l'adhésion cellulaire.

II- Confinement des cellules dans les microstructures en fonction des surfaces des régions adhésives

A- Paramètres expérimentaux

1- Choix de la géométrie hexagonale

Afin d'étudier l'impact de la surface des régions adhésives sur l'adhésion cellulaire, des géométries hexagonales ont été choisies pour les microstructures. En effet, les géométries hexagonales ont été sélectionnées afin de mimer le pavage hexagonal en nid d'abeille spécifique à un tissu endothélial *in-vivo*. Dans la suite de ces travaux, les hexagones seront caractérisés par le diamètre de leur cercle circonscrit, sachant que le rayon du cercle (r) circonscrit a la même taille que le coté d'un hexagone régulier. Les cellules adhèrent dans des régions surfaces adhésives hexagonales (S) de surface :

$$S = \frac{3\sqrt{3}}{2}(r)^2$$

2- Identification des paramètres expérimentaux

Les conditions expérimentales initiales pour étudier le lien entre l'adhésion des cellules et les surfaces des régions adhésives des microstructures sont, dans un premier temps, les paramètres de microstructuration : les molécules de passivation utilisées (ici du PEG-SH), de la dose d'exposition de la lampe UV (ici fixée à 900 J/m²) et le choix des molécules d'adhésion pour la fonctionnalisation des substrats d'or microstructurés (ici le mix de fibronectine, laminine et collagène). Ensuite, dans un deuxième temps, s'ajoutent les paramètres expérimentaux liés à la culture cellulaire : le type cellulaire (ici les cellules endothéliales EAhy926), la densité initiale de cellules déposées sur les substrats d'or microstructurés et fonctionnalisés, le pourcentage de facteurs de croissance dans le milieu de culture cellulaire (FBS : fetal bovine serum) et finalement, un paramètre temporel important qui est le temps initial d'adhésion des cellules. Ce temps initial d'adhésion correspond au temps nécessaire pour que le rendement d'occupation des microstructures par les cellules soit élevé. Le choix de la densité initiale des cellules déposées est très lié au choix du pourcentage de facteurs de croissance dans le milieu de culture ainsi que le temps initial d'adhésion. En effet, plus on augmente la densité de cellules en entrée sur le substrat, plus on augmente la probabilité d'occupation d'une microstructure par une cellule.

Les cellules sont en suspension dans le milieu de culture et se déposent par physisorption sur le substrat. Si elles se déposent au niveau d'une zone fonctionnalisée avec des molécules d'adhésion, alors elles y adhèrent. Si elles se déposent sur une zone passivée, alors elles resteront en suspension et seront retirées par la suite lorsqu'on changera le milieu après le temps initial d'adhésion. L'adhésion des cellules dépend du pourcentage de facteurs de croissance dans le milieu de culture. Plus on augmente le pourcentage de FBS, plus on augmente la qualité d'adhésion des cellules dans les microstructures, mais plus on augmente également la prolifération cellulaire. De même, plus on laisse les cellules dans l'incubateur à 37°C dans une atmosphère très humide à teneur en CO₂ contrôlée, plus les cellules se multiplient et se divisent. Il est donc important de trouver un compromis entre les paramètres expérimentaux cellulaires de densité initiale des cellules en entrée sur l'échantillon, le pourcentage de FBS et le

temps initial d'adhésion. Ces paramètres ont été modulés et il a été décidé de déposer une densité initiale de cellules EAhy926 de 550 000 cellules/mL, en suspension dans un milieu de culture cellulaire à 10 % de FBS pendant 2 h dans l'incubateur (Figure 31).

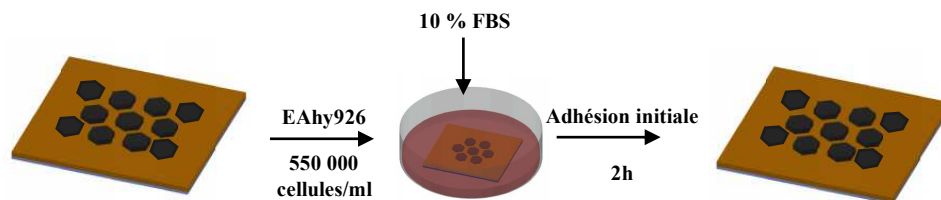


Figure 31: Résumé du protocole de dépôt et de culture des cellules dans les microstructures.

B- Distribution du nombre de cellules dans les microstructures hexagonales en fonction de leurs diamètres pour 2 types cellulaires

Dans le but d'optimiser les dimensions des microstructures hexagonales pour le confinement des cellules endothéliales individuelles, les surfaces d'adhésion pour deux types cellulaires ont été modulées : les cellules endothéliales immortalisées EAhy926 et les cellules de cerveau de rat immortalisées RBE4. Après le temps initial d'adhésion de 2 h [Figure 31], les cellules sont fixées et leurs noyaux sont marqués au DAPI afin de pouvoir quantifier le nombre de cellules par hexagone. Ces deux types cellulaires ont des tailles différentes. En effet dans des boîtes de pétri en culture cellulaire, les cellules EAhy926 ont une taille entre 25 μm et 35 μm tandis que les cellules RBE4 ont une taille entre 15 μm et 25 μm .

Dans le but de faciliter la lecture, le tableau ci-joint représente les surfaces équivalentes à certains diamètres des microstructures hexagones dans lesquelles les cellules adhèrent.

Diamètre (μm)	Surface (μm^2)
10	65
20	260
30	585
40	1039
50	1624
60	2338
70	3183
80	4157
90	5261
100	6495

Tableau 1: Correspondance entre les diamètres (μm) et les surfaces (μm^2) des microstructures hexagonales.

1- Etude des paramètres de confinement des cellules EAhy926

Les cellules adhèrent dans des régions dont la surface est fixée par le diamètre des hexagones. Les surfaces d'adhésion ont été variées entre $65 \mu\text{m}^2$ et $6495 \mu\text{m}^2$ avec un pas de $10 \mu\text{m}$ entre les diamètres. Les microstructures sont isolées les unes des autres afin d'éviter des contacts entre les îlots adhésifs et sont espacées par des régions passivées de $25 \mu\text{m}$. La distribution du nombre de cellules dans les hexagones dépend de leur surface. En effet, pour les grandes surfaces d'adhésion de $6495 \mu\text{m}^2$, il a été observé une occupation des microstructures entre 2 et 9 cellules, avec une loi de distribution normale. Plus on réduit la surface d'adhésion, plus le nombre de cellules dans microstructures baisse, et plus la variance de la distribution diminue. Ainsi, cette distribution va de 1 à 6 cellules dans les microstructures adhésives de $2338 \mu\text{m}^2$, qui descend à 0 à 3 cellules par microstructure avec une grande récurrence de 1 cellule par microstructure pour les plus petites surfaces à $585 \mu\text{m}^2$ (Figure 32).

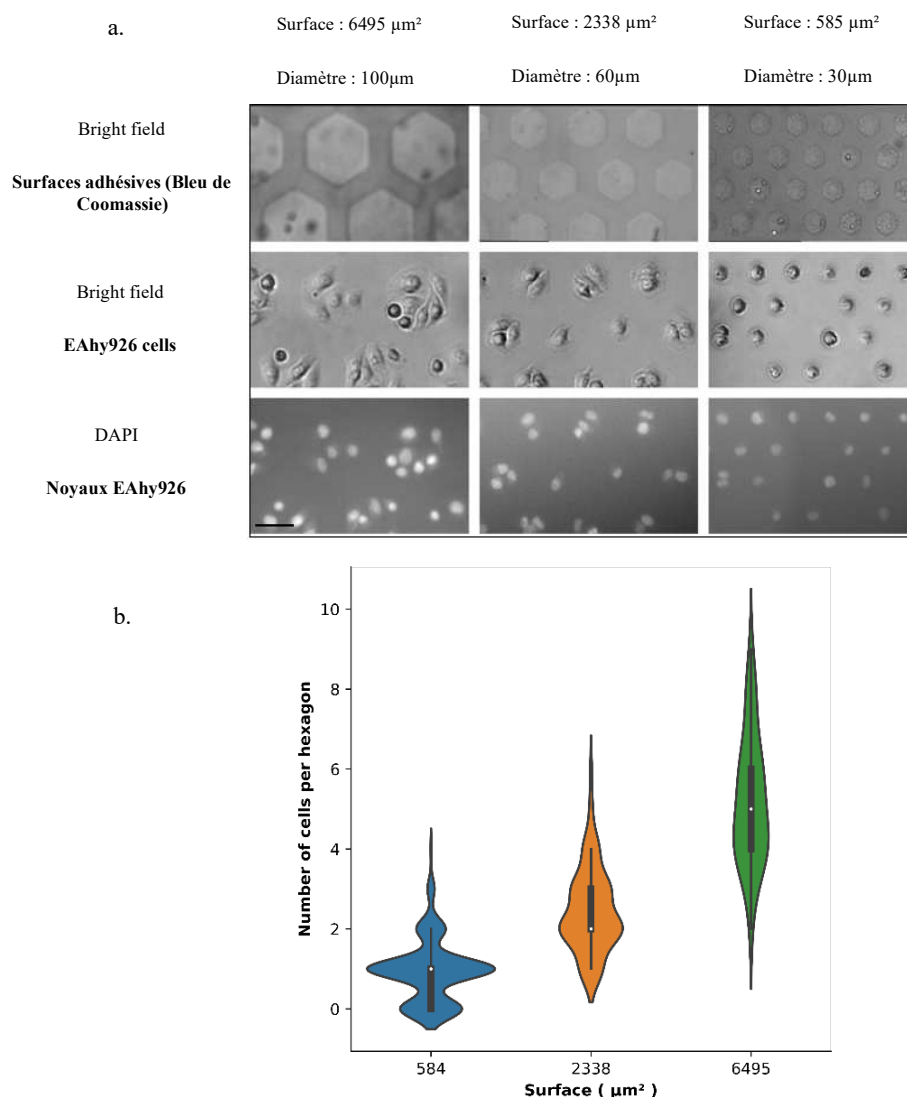


Figure 32: Distribution du nombre de cellules EAhy926 dans des régions adhésives de surfaces différentes : 6595 μm^2 , 2338 μm^2 et 584 μm^2 . (a) Les régions adhésives fonctionnalisées avec les molécules d'adhésion ont été révélées par lumière en champs clair (BF) au bleu de Coomassie. Après fixation, les cellules sont également observées en lumière en champs clair et leurs noyaux marqués au DAPI sont observées avec un microscope à fluorescence. (b) La distribution des cellules dans les 3 différentes régions adhésives est représentée par le graphique en violons. Les quantifications pour les surfaces 6595 μm^2 , 2338 μm^2 et 584 μm^2 ont été effectuées, respectivement, sur un nombre total $N = 43$, 224 et 690. les mêmes surfaces de travail ont été comparées, ainsi le nombre d'hexagones augmente lorsqu'on réduit leurs diamètres.

En moyenne, les microstructures dont la surface adhésive mesure 6495 μm^2 , 2338 μm^2 et 584 μm^2 sont respectivement occupées par 5 cellules, 2 cellules et 1 cellule. Le

nombre de cellules moyen par microstructure dépend quasi linéairement de la surface des régions adhésives. Ainsi, une surface d'adhésion pour les microstructures a été identifiée et permet d'obtenir en moyenne 1 cellule par microstructure autour de $585 \mu\text{m}^2$ (Figure 33 – a). De plus, plus on réduit la surface des régions adhésives, plus la probabilité d'adhésion des cellules dans les microstructures se réduit. Le graphique représenté en Figure 33 – b est classé en 3 régions différentes : la région orange montre le pourcentage d'occupation des microstructures par un nombre strictement supérieur à 1 cellule (donc au moins 2 cellules) pour différentes surfaces d'adhésion. Comme attendu, les grandes surfaces d'adhésion de $6595 \mu\text{m}^2$ à $2338 \mu\text{m}^2$ ont un pourcentage d'occupation des microstructures par les cellules de 100% avec une distribution supérieure à 2 cellules. À partir d'une surface d'adhésion de $2338 \mu\text{m}^2$, l'adhésion de exactement 1 cellule par microstructure est observée et est représentée par la région verte dans le graphique. Cependant, des microstructures vides sont également observées, où aucune cellule n'a adhéré comme le montre la zone rouge du graphique. Les régions vertes et rouges montrent que pour les petites surfaces de régions adhésives, la probabilité d'adhésion des cellules est plus faible mais la récurrence d'obtention de 1 cellule par microstructure est plus élevée.

Une gamme de surface de régions adhésives a été identifiée et donc de diamètres des microstructures hexagonales qui respecte le compromis entre une adhésion cellulaire avec une grande probabilité et le confinement de exactement 1 cellules par hexagone. Ce compromis est respecté pour des surfaces adhésives entre $406 \mu\text{m}^2$ (diamètre de $25 \mu\text{m}$) et $585 \mu\text{m}^2$. Il est intéressant de noter que ces valeurs de gamme de surface d'adhésion et de diamètres des microstructures sont cohérentes avec les dimensions en de cellules individuelles endothéliales EAY926 dans une boîte de pétri à confluence *in vitro* qui correspondent à des cellules de diamètre d'environ $30 \mu\text{m}$.

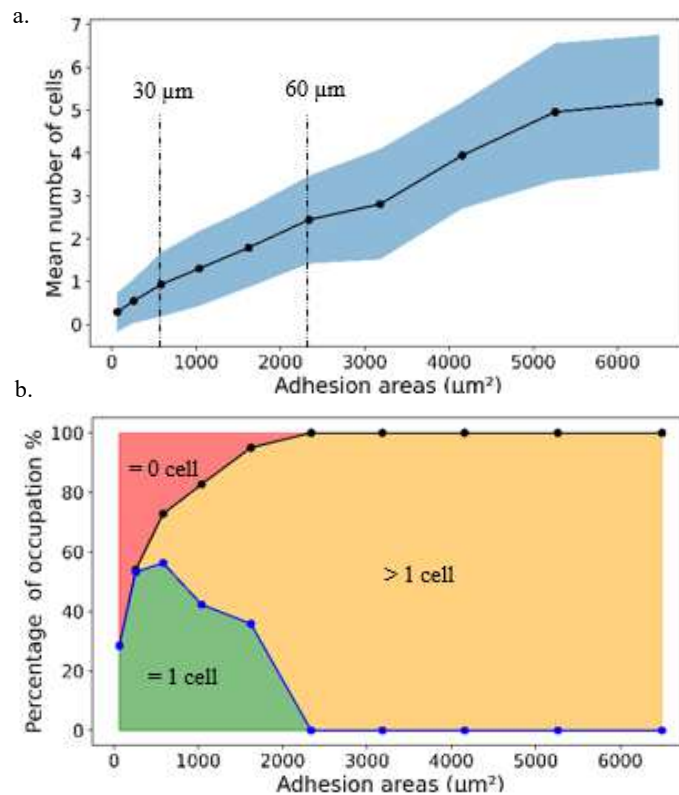


Figure 33: **a)** Distribution du nombre moyen de cellules EAhy926 dans des régions adhésives pour 10 surfaces différentes. Les points représentent les moyennes et l'ombre bleue correspond à l'écart type. **b)** Pourcentage d'occupation des microstructures par un nombre supérieur ou égal à 1 cellule (zone orange), par exactement 1 cellule (zone verte) et par exactement 0 cellule (zone rouge). Le nombre total de cellules pour a et b est, pour chaque point de mesure allant de $6495 \mu\text{m}^2$ à $65 \mu\text{m}^2$ avec un pas de $10 \mu\text{m}$ entre les diamètres est respectivement : $N = 45, 43, 55, 90, 156, 224, 340, 396, 525, 690$.

2- Etude des paramètres de confinement des cellules RBE4

La même étude décrite précédemment sur les paramètres de confinement des cellules EAhy926 a été effectuée pour les cellules RBE4. Les cellules ont été fixées après 2 h d'adhésion et leurs noyaux ont été marqués au DAPI (Figure 34 – a). Il s'agit de cellules endothéliales immortalisées de cerveau de rat, qui ont des dimensions de $20 \mu\text{m}$ de diamètre dans des boîtes de pétri à confluence dans les études *in vitro*. Ainsi, cette partie présente la distribution des cellules RBE4 dans des microstructures dont les surfaces d'adhésion varient entre $6495 \mu\text{m}^2$ et $65 \mu\text{m}^2$ avec un pas de $10 \mu\text{m}$, et un espacement de $25 \mu\text{m}$ entre les microstructures au niveau des régions passivées (même masque que pour les cellules EAhy926). Les microstructures dont la surface mesure $6495 \mu\text{m}^2$ présentent une distribution de cellules entre 8 cellules et 21 cellules. Pour les surfaces d'adhésion égales à $2338 \mu\text{m}^2$, les microstructures sont occupées par un nombre entre 3 cellules et 10 cellules. Plus la surface d'adhésion baisse, moins les microstructures

sont occupées par les cellules comme il a été observé pour les surfaces mesurant $584 \mu\text{m}^2$ ($d = 30 \mu\text{m}$) où 1 cellule et 6 cellules ont été comptées. De même pour les surfaces adhésives de $260 \mu\text{m}^2$ ($d = 20 \mu\text{m}$) qui elles sont occupées par un nombre entre 0 cellules et 5 cellules (Figure 34 – b). Ainsi, en moyenne, ces 4 surfaces d'adhésion ($6495 \mu\text{m}^2$, $2338 \mu\text{m}^2$, $584 \mu\text{m}^2$ et $260 \mu\text{m}^2$) sont, respectivement, occupées par 14 cellules, 6 cellules, 2 cellules et 1 cellule (Figure 34 – c). De plus, les cellules adhèrent moins dans les petites surfaces d'adhésion mais avec, néanmoins, une bonne probabilité d'adhésion (Figure 34 – d). Par conséquent, une gamme de surfaces d'adhésion a été identifiée et donc de diamètres des microstructures pour laquelle une forte probabilité d'adhésion des cellules avec exactement 1 cellule par microstructure est observée. Ce compromis entre l'adhésion des cellules RBE4 dans les microstructures et leur confinement est respecté entre $65 \mu\text{m}^2$ et $300 \mu\text{m}^2$.

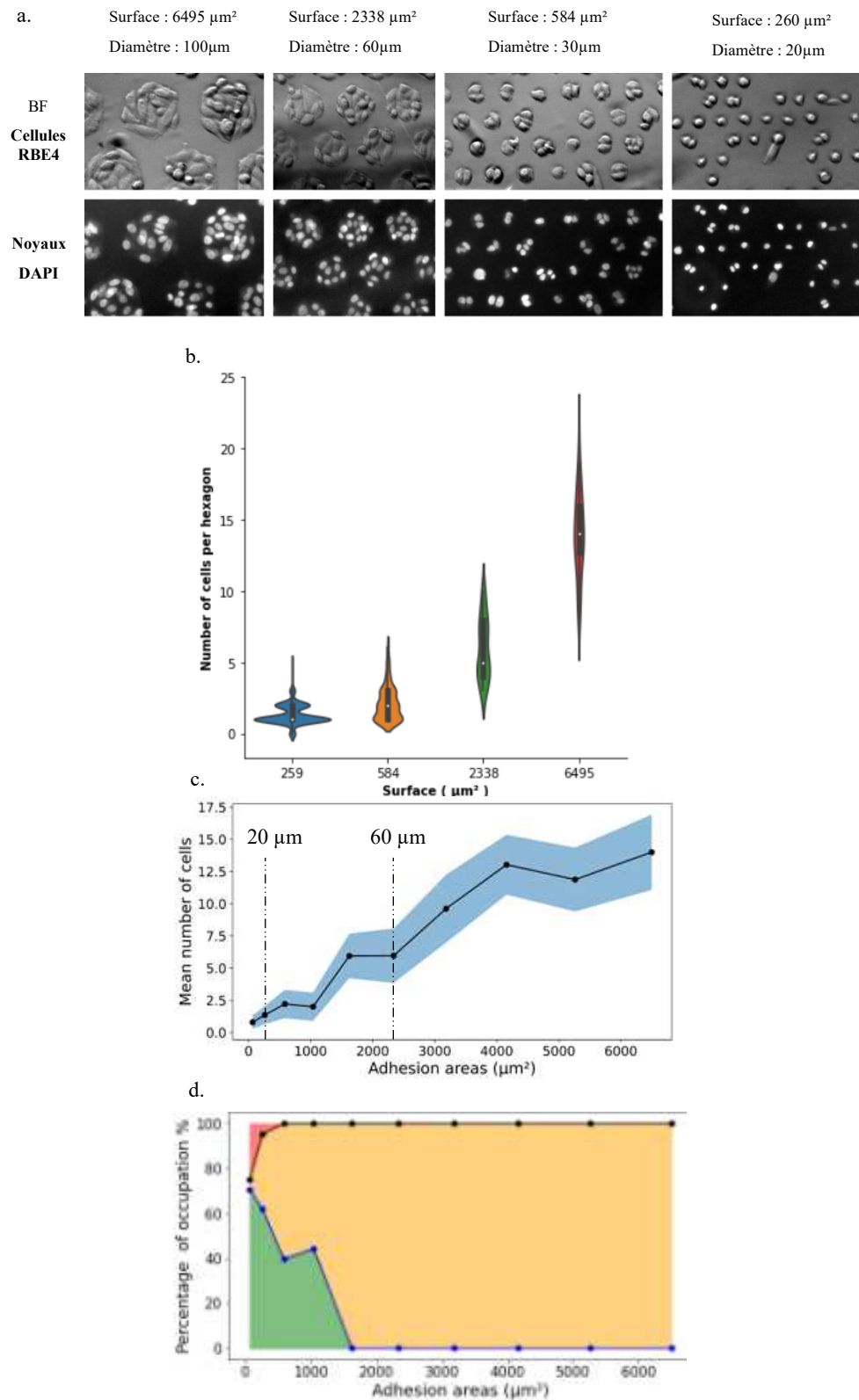


Figure 34: **a)** Distribution du nombre de cellules RBE4 dans des régions adhésives de surfaces

*différentes : 6595 μm^2 , 2338 μm^2 , 584 μm^2 et 260 μm^2 . Les régions adhésives fonctionnalisées avec les molécules d'adhésion ont été révélées par lumière en champs clair (BF) au bleu de Coomassie. Après fixation, les cellules sont également observées en lumière en champs clair et leurs noyaux marqués au DAPI sont observées avec un microscope à fluorescence. **b)** La distribution des cellules dans les 4 différentes régions adhésives est représentée par le graphique en violons. **c)** Distribution du nombre moyen de cellules RBE4 dans des régions adhésives de 10 surfaces différentes. Les points représentent les moyennes et l'ombre bleue correspond à l'écart type. **d)** Pourcentage d'occupation des microstructures par un nombre supérieur ou égal à 1 cellule (zone orange), par exactement 1 cellule (zone verte) et par exactement 0 cellule (zone rouge). Le nombre total de cellules pour b, c et d est, pour chaque point de mesure allant de 6495 μm^2 à 65 μm^2 avec un pas de 10 μm entre les diamètres est respectivement : $N = 40, 40, 64, 55, 52, 96, 135, 179, 213, 140$.*

Conclusion partielle : Cette étude comparative de l'adhésion de deux types de cellules endothéliales au niveau de régions adhésives de différentes surfaces, permet de confirmer l'importance et le lien entre l'adhésion cellulaire et la surface des microstructures. En effet, la gamme de diamètre qui respecte le compromis entre l'adhésion des cellules dans les microstructures et leur confinement est entre 406 μm^2 et 585 μm^2 pour les cellules EAhy926 et entre 65 μm^2 et 300 μm^2 pour les cellules RBE4. Ces gammes de diamètre dépendent et sont en accord avec la taille des cellules dans des boîtes de pétri *in vitro*. De par leur dimensions plus petites autour de 20 μm , les cellules RBE4 adhèrent dans un plus grand nombre d'hexagones avec un bon rendement de remplissage des microstructures par les cellules. De plus, la gamme de surfaces adhésives où le confinement des cellules est observé est plus large. Ainsi, il est important d'identifier la gamme de surfaces adhésives et donc les diamètres de microstructures spécifiques pour chaque type cellulaire étudié, permettant d'obtenir le meilleur compromis entre la probabilité d'adhésion des cellules sur les régions adhésives et l'obtention de exactement 1 cellule par microstructure.

SECTION 2 : DE LA CELLULE INDIVIDUELLE A UN GROUPE DE CELLULES ENDOTHELIALES

Les études sur le confinement des cellules dans les microstructures ont permis d'identifier une gamme de diamètres pour laquelle l'adhésion de exactement 1 cellule par microstructure hexagonale est observée. Dans le but de, à terme, fabriquer un modèle de monocouche cellulaire endothéliale *in vitro*, il faudrait rapprocher les microstructures hexagonales en réduisant les espacements entre elles afin d'induire de la connectivité entre les cellules qui y adhèrent via des jonctions intercellulaires.

Dans cette section, le confinement des cellules individuelles endothéliales dans chaque microstructure en fonction du nombre d'hexagones et en fonction des

espacements entre ces derniers est étudié.

I- Identification d'une gamme d'espacements pour la formation de jonctions cellule/cellule

Dans la stratégie de fabrication d'un modèle de monocouche cellulaire *in vitro*, il faudrait induire de la connectivité entre les cellules endothéliales individuelles qui sont confinées dans les microstructures hexagonales. Ainsi, un photomasque en chrome/quartz a été fabriqué où les espacements entre les microstructures individuelles ont été variés, pour la gamme de diamètres de confinement identifiés pour les cellules endothéliales EAhy926. Les diamètres varient entre 60 μm et 5 μm avec un pas de 2.5 μm et des espacements pour chaque diamètre qui varient entre 25 μm et 0 μm avec un pas de 1 μm (Annexe 1 – Masque 3). Ce masque a permis d'identifier la gamme d'espacements à partir de laquelle la connectivité entre les cellules commence à être induite. On observe que les cellules qui ont adhéré dans les hexagones individuels commencent à former des tissus confluent pour des espacements entre les hexagones qui varient entre 8 μm et 0 μm (Figure 35).

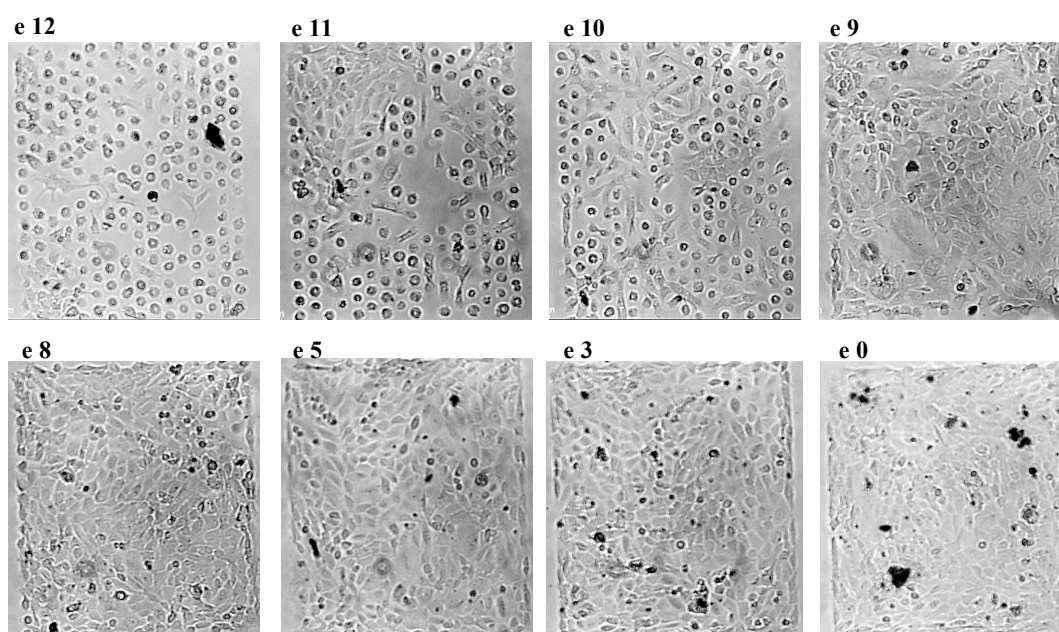


Figure 35: Images en lumière blanche de cellules EAhy926 fixées après 48 h d'adhésion sur des substrats d'or microstructurés selon des hexagones de 30 μm de diamètre et des espacements variants entre 12 μm et 0 μm .

Afin de valider cette observation au microscope, les cellules sont fixées et leurs jonctions VE-cadhérines sont marquées avec un marqueur fluorescent spécifique (FITC

anti human mouse CD144) après 48 h d'adhésion (Figure 36). Ce marquage permet de confirmer la formation de jonctions entre les cellules adhérant sur les hexagones de 30 μm de diamètres espacés de 0 μm à 8 μm , après 48 h d'adhésion dans l'incubateur.

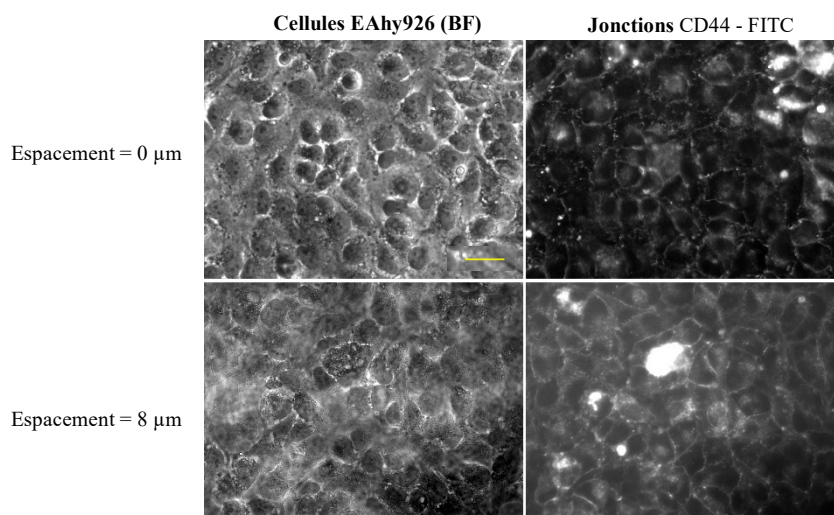


Figure 36: Formation de jonctions VE-cadhérines entre les cellules EAhy926 fixées après 48 h d'adhésion sur des substrats d'or microstructurés selon des hexagones de 30 μm de diamètres espacés de 0 μm et 8 μm . Les cellules fixées sont observées en lumière blanche (colonne de gauche) et leurs jonctions VE-cadhérines marquées sont observées par microscopie à fluorescence (colonne de droite) (Barre d'échelle : 20 μm - objectif 40X).

II- Prolifération des cellules en fonction du nombre de microstructures

Dans un premier temps, une gamme de diamètres des hexagones a été identifiée. Une gamme pour laquelle est observé le confinement d'une cellule endothéliale individuelle par microstructure hexagonale correspondant à des surfaces adhésives entre 406 μm^2 et 585 μm^2 . Ensuite, une gamme d'espacements entre les microstructures hexagonales a été identifiée. Une gamme d'espacements permettant d'induire la formation de jonctions cellule/cellule et qui se trouve entre 0 μm et 8 μm . Cependant, il est important de noter que travailler avec des cellules vivantes présente des défis liés au comportement très dynamique des cellules. En effet, lorsque les cellules adhèrent sur le substrat d'or microstructurés et fonctionnalisés, elles sont dans des conditions d'incubateur nécessaires pour les maintenir en vie mais également favorables à leurs divisions et leur prolifération. Les cellules ont été fixées et leurs noyaux marqués, après 48 h d'adhésion, afin de comparer le nombre de cellules ayant adhéré sur le substrat et le nombre théorique des hexagones du masque chrome/quartz sur lesquels les cellules se déposent.

La même surface de remplissage par les cellules est comparée pour les hexagones de

30 μm de diamètres espacés de 3 μm et de 6 μm . Pour les espacements 3 μm , 241 hexagones ont été comptés dans le masque chrome quartz, tandis qu'après adhésion des cellules et formation des jonctions entre elles, 816 noyaux et donc cellules ont été comptés. Pour les espacements de 6 μm , 425 hexagones du masque ont été comptés, tandis que le nombre de cellules après adhésion et formation des jonctions est de 1111 noyaux (Figure 37). Cette comparaison a permis d'évaluer le taux de division et de prolifération après 24 h d'adhésion des cellules dans l'incubateur : ce taux est élevé et correspond à environ 3 fois plus de cellules que de microstructures. Cette hétérogénéité cellulaire du vivant liée à la division et la prolifération ne peut être contrôlée, mais peut être réduite. Comme il sera démontré plus loin, en faisant varier les paramètres expérimentaux de culture cellulaire tels que les pourcentages de facteurs de croissance dans le milieu de culture et le temps d'adhésion et de formation de jonctions dans l'incubateur, il est possible de réduire la prolifération et la division cellulaire. A noter également que plus le pourcentage de facteurs de croissance est réduit, moins les cellules forment de jonctions.

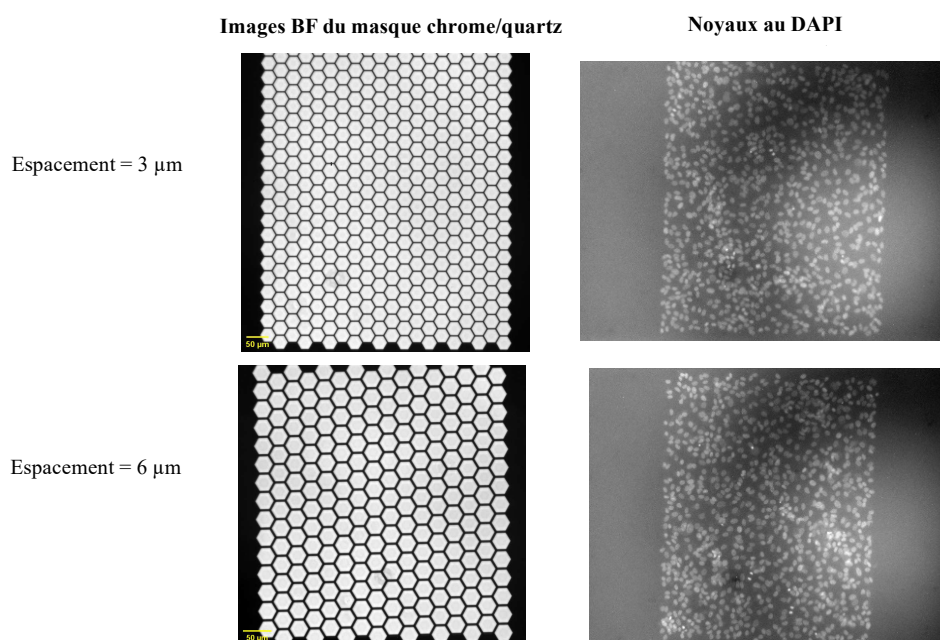


Figure 37: Prolifération et division cellulaire dans les groupes hexagonaux. Colonne de gauche : images en lumière blanche du masque chrome/quartz (les hexagones sont en quartz) pour les hexagones de 30 μm de diamètre et des espacements de 3 μm et 6 μm . Colonne de droite : Image en fluorescence de noyaux marqués au DAPI pour les deux espacements aussi.

III- Choix du groupe de 3 hexagones comme unité du modèle cellulaire *in vitro*

Dans le but de mieux contrôler l'ensemble des paramètres, le nombre des hexagones du masque sur lequel les cellules adhèrent a été réduit permettant ainsi de travailler sur un modèle plus simplifié. Ce modèle est composé de 3 hexagones et représente l'unité élémentaire de la monocouche cellulaire endothéliale *in vitro* à fabriquer (Figure 38).

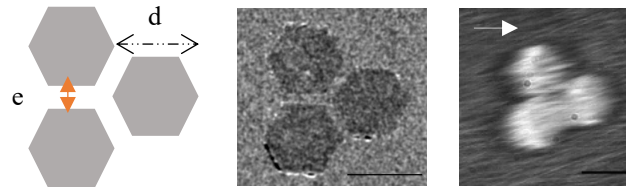


Figure 38: Unité élémentaire de la monocouche cellulaire endothéliale *in vitro* : Gauche : Patron du groupe de 3 hexagones définis par leur diamètre (d) et l'espacement entre eux (e). Milieu : Image en lumière blanche d'un groupe de 3 hexagones de $30\ \mu\text{m}$ de diamètres espacés de $3\ \mu\text{m}$ et révélés avec marquage au bleu de Coomassie. Droite : Image SPR du même groupe de 3 hexagones observé en lumière blanche (au milieu). La flèche blanche montre le sens de propagation du plasmon. (Barre d'échelle = $30\ \mu\text{m}$).

Pour la formation du modèle de monocouche cellulaire *in vitro* avec le groupe de 3 hexagones comme unité élémentaire, plusieurs tests et expériences ont été faits avant de finalement sélectionner les paramètres expérimentaux les plus optimaux pour ce cas d'étude. Ainsi, une densité initiale de 550 000 cellules/mL de cellules EAhy926 ont été mises en suspension dans un milieu de culture cellulaire à 10 % de FBS pendant un temps initial d'adhésion de 2 h dans l'incubateur. Ensuite, les cellules ont été fixées et leurs noyaux marqués au DAPI afin de quantifier la distribution des cellules dans les groupes de 3 hexagones en fonctions des espacements de régions passivées qui les séparent (Figure 39).

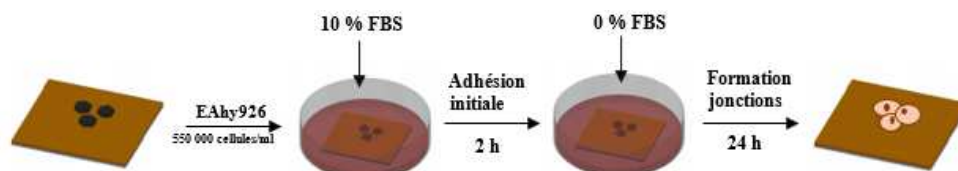


Figure 39: Protocole expérimental pour la fabrication d'un modèle de monocouche cellulaire endothéliale dans le groupe de 3 hexagones.

L'adhésion des cellules individuelles et leur confinement dans les microstructures dépendent des surfaces des régions adhésives, mais pas uniquement. Le confinement des cellules dans les microstructures dépend également des espacements qui séparent les hexagones entre eux. Pour vérifier cet effet, les cellules ont été fixées et les noyaux des cellules dans les groupes de 3 hexagones ont été marqués après leur temps initial d'adhésion de 2h. Le nombre de cellules dans les groupes de 3 hexagones a ensuite été quantifié en fonction des espacements variants entre $0\ \mu\text{m}$ et $7\ \mu\text{m}$ (Figure 40). Lorsque les 3 hexagones ne sont pas espacés ($0\ \mu\text{m}$), plus de la moitié des groupes de 3 hexagones contiennent 2 cellules. En effet, en absence d'espacements, la surface de la région adhésive s'étend à celle des 3 hexagones collés et les cellules sont uniquement

contraintes aux effets des bords extérieurs des hexagones. Les espacements pour lesquels une récurrence de 3 cellules dans les groupes de 3 hexagones est observée sont des espacements supérieurs à 3 μm . Plus les espacements sont grands, plus la probabilité d'obtenir une cellule par hexagone augmente. Cependant, il est important de respecter le compromis entre le confinement d'une cellule individuelle par microstructure hexagonale et la formation des jonctions entre ces dernières. Effectivement, plus les espacements entre les hexagones sont grands, plus la probabilité de formation de jonctions entre les cellules baisse.

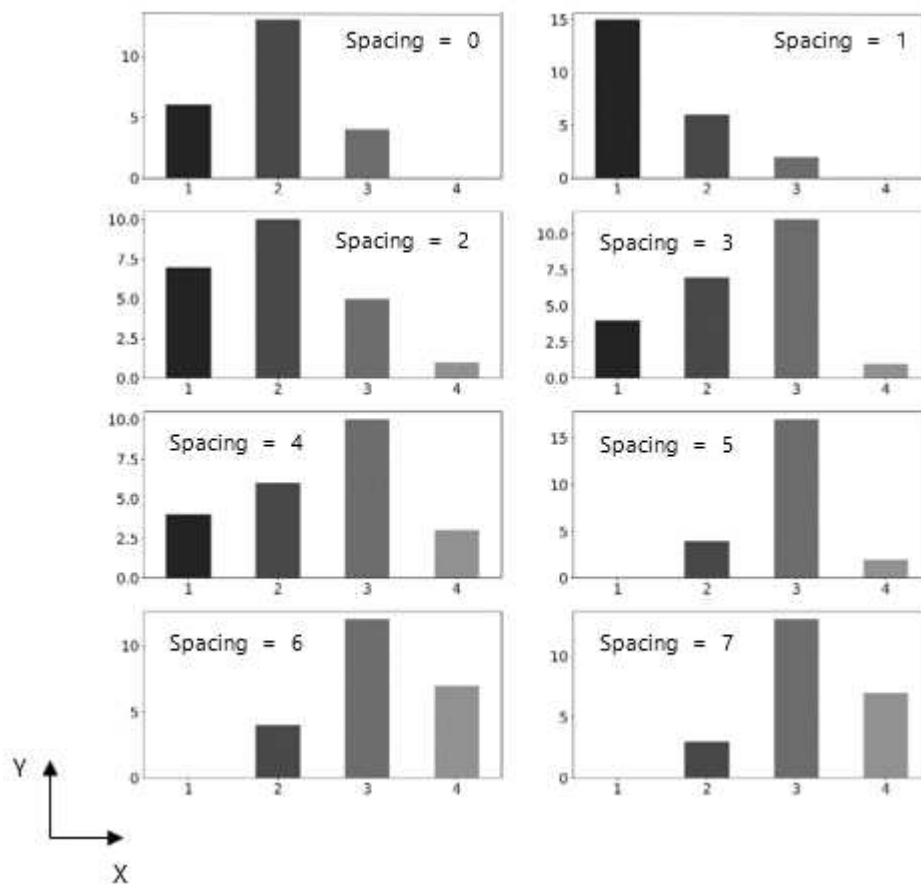


Figure 40: Distribution du nombre de cellules dans les groupes de 3 hexagones de 30 μm de diamètre en fonction de la taille des espacements qui les séparent. L'axe des coordonnées en X correspond au nombre de cellules dans les hexagones tandis que l'axe des coordonnées en Y représentent le nombre de groupes de 3 hexagones. Le comptage a été effectué sur 21 groupes de 3 hexagones pour chaque espacement.

CONCLUSION DE CE CHAPITRE

Dans la stratégie de fabriquer un modèle cellulaire endothélial *in vitro*, la première étape consiste à contrôler l'adhésion et l'autoassemblage de cellules endothéliales individuelles et de ensuite rapprocher les cellules entre elles pour mimer un

endothélium. Ainsi le raisonnement de ces travaux est fondé sur deux étapes importantes : 1) isoler les cellules endothéliales et individuelles et les confiner dans des microstructures hexagonales. 2) Rapprocher les microstructures hexagonales entre elles afin d'induire de la connectivité via des jonctions cellule/cellule.

Un protocole de microstructuration robuste et reproductible a été développé, permettant ainsi de contrôler l'adhésion des cellules individuelles sur des substrats d'or. Les paramètres géométriques d'adhésion permettant d'obtenir une cellule individuelle par microstructure ont été identifiés. Ensuite, en évaluant les paramètres d'espacements entre les microstructures hexagonales permettant la formation de jonctions VE-cadhérine entre les cellules, une complexité d'étude liée au grand nombre de microstructures dans les assemblages a été mise en avant. Cette complexité est due à l'hétérogénéité cellulaire liée au vivant (division et prolifération). Le modèle d'étude a alors été simplifié pour un modèle d'assemblage de 3 hexagones avec une intersection de 3 vecteurs à 120°. Il a ensuite été démontré que le confinement d'une cellule individuelle par microstructure dans les groupes de 3 hexagones ne dépendait pas uniquement de la surface des régions adhésives, mais dépend également des espacements non adhésifs entre les microstructures.

L'ensemble de cette étude a permis d'identifier une gamme de surface d'adhésion et d'espacements pour les cellules EAhy926 qui respecte le compromis entre un bon rendement d'occupation des microstructures par les cellules, le confinement d'une cellule par microstructure hexagonale et finalement la formation de jonctions intercellulaires. Pour les cellules EAhy926, ce compromis est respecté pour des surfaces adhésives entre 406 μm^2 et 585 μm^2 et des espacements entre 3 μm et 7 μm .

SECTION 3 : MATERIELS ET METHODES

I- Culture cellulaire

Les lignées cellulaires principales utilisées dans la majorité de cette étude sont les cellules immortalisées et différenciées EAhy926 (human umbilical vein cell line). Elles ont été mises en culture dans le milieu Dulbecco's Modified eagle's medium (DMEM) complété avec 10 % de facteurs de croissance (Fetal Bovine Serum FBS) et 60 U/mL de pénicilline. La mise en culture des cellules a été effectuée dans des boîtes de pétri stériles en polystyrène (100 mm de diamètre – Corning) dans un incubateur dont la température est contrôlée à 37° et le taux de CO₂ à 5 %. Après 3 jours dans l'incubateur, les cellules atteignent 80 - 90 % de confluence et sont prêtes pour les passages cellulaires. La trypsine (EDTA 0.25 %) est utilisée afin de décrocher les cellules de la boîte de pétri. Les cellules sont alors suspendues dans un milieu de culture DMEM avec 10 % de FBS. Afin de déposer la densité de cellules souhaitée sur les substrats d'or, les

cellules sont comptées avec un mini-kit de comptage cellulaire (MOXI Z). Cette densité cellulaire est déposée sur les substrats d'or microstructurés et fonctionnalisés qui se trouvent dans des boîtes de pétri de 35 mm de diamètre.

Etudes sur le confinement des cellules : Après un temps d'adhésion initial de 2 h, les cellules sont fixées et leurs noyaux marqués au DAPI.

Etudes sur la formation des jonctions intercellulaires : Après le temps initial de 2 h d'adhésion, le milieu de culture contenant 10% de FBS est changé et remplacé par un milieu de culture avec 0 % de FBS et 10 μ M d'HEPES. Les cellules adhèrent sur les substrats d'or microstructurés et fonctionnalisés pendant 24 h dans l'incubateur.

II- Marquages des jonctions et des noyaux

Les cellules déposées sur les substrats d'or microstructurés sont incubées pendant 1 h dans un milieu L-15 à 37°. Ensuite la lame est transférée dans une boîte de pétri de 35 mm de diamètre et incubée dans une solution de marqueur FITC mouse anti-human CD144 (BD Pharmingen™) selon un ratio 1 :3 dans le milieu L-15 pendant 30 min à 37° dans le noir. Ce fluorophore a pour longueur d'onde d'excitation $\lambda_{ex} = 488$ nm, et pour longueur d'onde d'émission $\lambda_{em} = 520$ nm. Après rinçage des lames avec du PBS, les cellules sont fixées dans une solution de 2% PFA-PBS pendant 10 min à 37° et les lames sont ensuite nettoyées 3 fois avec du PBS. Après fixation des cellules, les lames sont incubées dans une solution de 1 μ g/mL de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) dans du PBS pendant 15 min à 37 ° dans le noir. Ce fluorophore a comme spectre d'excitation et d'émission : $\lambda_{ex} = 372$ nm ; $\lambda_{em} = 456$ nm. Les lames sont ensuite rincées du PBS et montées entre lame et lamelle pour observation au microscope à fluorescence.

III- Techniques d'imagerie

A- Imagerie SPR à prisme en configuration de Kretschmann

Les caractérisations de la surface des substrats d'or à chaque étape du protocole de microstructuration développé dans cette thèse en cotutelle ont été effectuées avec un banc à prisme fabriqué au Laboratoire Charles Fabry (Institut d'Optique Graduate School, Palaiseau). Le banc à prisme est composé d'un système optique couplé à un circuit microfluidique. La longueur d'onde de la source lumineuse provenant d'une lampe halogène est balayée grâce à un monochromateur et la lumière injectée dans une fibre multimode. La sortie de la fibre est collimatée et le faisceau passe ensuite à travers un polariseur motorisé. Les bras source et caméra sont motorisés afin de choisir l'angle

du faisceau incident sur l'échantillon et l'angle du bras de la caméra. Le substrat est monté verticalement sur un prisme en verre de type BK7 et est serré contre la chambre fluïdique. L'épaisseur de la chambre fluïdique est fixée par une feuille de Mylar (d'épaisseur 90 μm) et d'ouverture circulaire (10 mm de diamètre). La solution à injecter est dégazée, elle circule dans une pompe péristaltique, jusqu'à la puce SPR avec un débit réglable. La température est maintenue constante grâce à un contrôleur de T° (Figure 41).

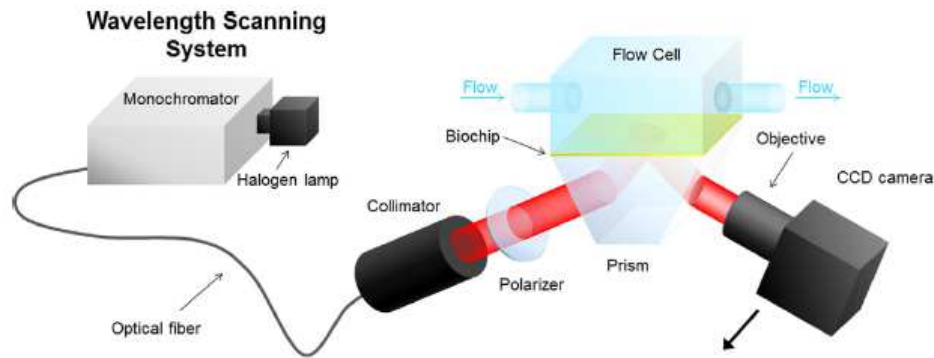


Figure 41: Schéma du banc SPR à prisme en configuration de Kretschmann disponible au Laboratoire Charles Fabry¹⁰⁵.

B- Microscopes à fluorescence

Les images en lumière blanche ainsi que les images en fluorescence ont été acquises en utilisant un microscope Zeiss Axiovert 200 inversé disponible à l'IPS à Sherbrooke.

IV- Traitement des images

A- Segmentation des images

La segmentation des images des cellules et des noyaux a été effectuée en utilisant une librairie sur Fiji (image J) appelé MorpholibJ¹⁰⁶. Il s'agit de plugins pour quantifier mathématiquement des changements de morphologies. Les images sont d'abord prétraitées avec un filtre 2D tel un filtre flou gaussien pour réduire le bruit, ensuite la segmentation est effectuée par watershed. Il s'agit d'un algorithme qui considère les niveaux de gris d'une image comme un relief topographique dont on simule l'inondation. C'est un algorithme de la ligne de partage des eaux qui est définie comme étant une crete format la limite entre deux bassins versants. Ainsi, chaque valeur de pixel est associée à une altitude permettant ainsi de détecter les contours des objets. La segmentation des images en lumière blanche des cellules permet de détecter les

contours de chaque hexagone isolé, tandis que la segmentation des noyaux des cellules permet de détecter les contours de chaque noyau individuel. Ainsi à chaque objet, hexagone ou noyau de cellule individuelle, est associé un *label* spécifique (label = référence de couleur) (Figure 42).

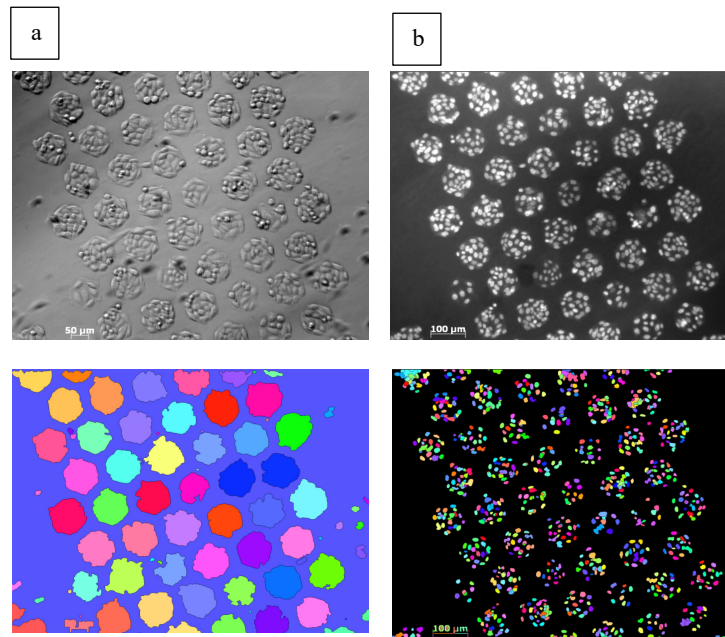


Figure 42: Segmentation des images : a) en lumière blanche des cellules, b) en fluorescence des noyaux en utilisant MorpholibJ.

B- Comptage des noyaux

La segmentation des cellules et des noyaux permet de compter les noyaux dans chaque hexagone. En effet, à chaque hexagone et à chaque noyau sont associées à des couleurs spécifiques. Les images en champ clair des cellules et les images de fluorescence sont acquises simultanément. Un script en python a été rédigé afin de quantifier le nombre de noyaux dans chaque hexagone. Le script utilise les bibliothèques Numpy, Matplotlib, scikit-learn, Scikit-image. Ce script permet de compter le nombre de couleurs spécifiques de noyaux dans chaque hexagone. Cependant, il est difficile d'estimer les erreurs liées à la segmentation, surtout des noyaux qui sont des petits objets très proches les uns des autres. Ainsi, une vérification précise est effectuée à la main pour vérifier que le résultat de l'image segmentée n'est pas très loin de celui observé dans l'image de fluorescence (Figure 43).

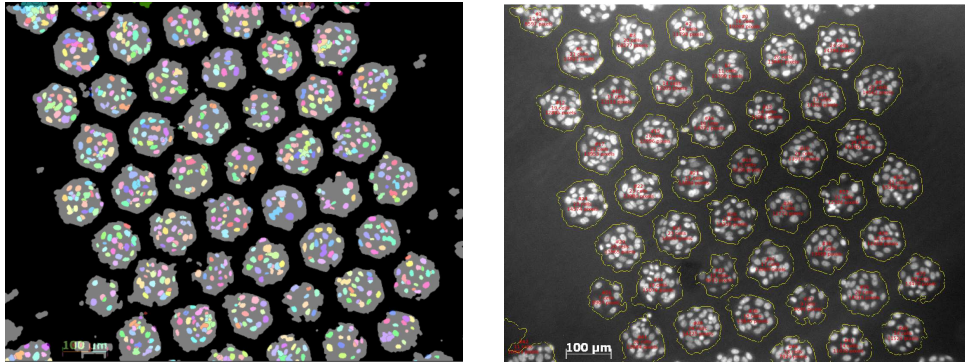


Figure 43: La segmentation des images en BF des cellules permet d'associer un label pour chaque hexagone (a). Ensuite, le nombre de couleurs (labels) de noyaux, segmentés également au sein des hexagones est quantifié.

CHAPITRE 4 : EVALUATION DU PHENOTYPE ENDOTHELIAL DU MODELE IN VITRO.

Le chapitre précédent porte sur l'optimisation du contrôle de l'autoassemblage de cellules endothéliales sur des substrats d'or microstructurés. Les paramètres de confinement pour obtenir une cellule endothéliale individuelle par microstructure hexagonale ont été identifiés. Ensuite les paramètres expérimentaux permettant de réduire l'hétérogénéité liée à la division et à la prolifération de cellules vivantes ont également été identifiés. Le modèle cellulaire a été réduit à un groupe de 3 hexagones comme une première preuve de concept pour la fabrication d'un modèle de monocouche cellulaire endothéliale pour les études *in vitro*. Finalement, une gamme d'espacements entre les microstructures a été mise en évidence pour laquelle le confinement d'une cellule par hexagone est observé dans les groupes de 3 hexagones.

Ce chapitre présente l'évaluation du phénotype endothélial fonctionnel des groupes de 3 hexagones afin de confirmer leur identité cellulaire, en particulier leur capacité à former des jonctions intercellulaires endothéliales spécifiques entre elles. De plus, est-ce que le groupe de 3 hexagones fabriqué répond-il comme une monocouche cellulaire endothéliale en présence d'agents externes ? Pour répondre à ces questions, le phénotype dynamique fonctionnel et la réponse des groupes de cellules à différents stimuli par microscopie de fluorescence et SPR sont évalués.

SECTION 1 : EVALUATION DU PHENOTYPE STRUCTUREL DES GROUPE DE 3 HEXAGONES

Les VE-cadhérines (Vascular endothelial) sont des molécules d'adhésion spécifiquement et uniquement endothéliales qui se trouvent au niveau des jonctions entre les cellules. Les VE-cadhérines jouent un rôle important dans le contrôle et le maintien des contacts entre les cellules et donc dans l'intégrité du tissu. Ainsi un marquage des jonctions VE-cadhérines se trouvant au niveau des jonctions d'adhérences est un premier marqueur du phénotype endothélial. Le phénotype structurel endothélial est défini comme étant la formation de jonctions cellule/cellule révélée par marquage fluorescent spécifique des cadhérines. Ce phénotype est dit structurel car les cellules sont fixées et marquées. Cette caractérisation du phénotype structurel des groupes de 3 hexagones fabriqués est la première étape de validation phénotypique du modèle artificiel fabriqué comme un modèle cellulaire *in vitro* de monocouche cellulaire endothéliale.

I- Protocole expérimental de formation des jonctions intercellulaires

A- Paramètres de fabrication de la monocouche cellulaire endothéliale

Les paramètres expérimentaux liés au protocole de microstructuration et à la culture cellulaire permettant d'optimiser le confinement pour les cellules EAhy926 sont les suivants :

- Identification de la gamme de surfaces des régions adhésives permettant d'obtenir le confinement d'une cellule individuelle par microstructure.
- Identification de la gamme des espacements entre les microstructures permettant d'observer 1 cellule par microstructure dans les groupes de 3 hexagones.

Cependant, l'observation du confinement de cellules individuelles dans les groupes de 3 hexagones ne permet de conclure sur la capacité des cellules à former des jonctions.

Ainsi, ils s'ajoutent aux paramètres expérimentaux identifiés précédemment le temps de culture cellulaire dans l'incubateur défini comme le temps à partir duquel les cellules forment des jonctions entre elles (Figure 44). Pour rappel, le temps initial d'adhésion des cellules correspond au temps nécessaire pour obtenir un bon rendement d'occupation des microstructures par les cellules. Le temps de culture cellulaire correspond au temps nécessaire pour que les cellules forment des jonctions entre elles.

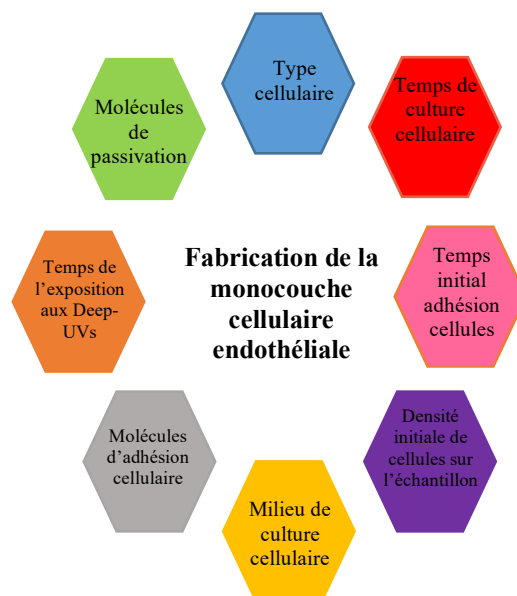


Figure 44: Résumé de tous les paramètres expérimentaux importants pour la fabrication de la monocouche cellulaire endothéliale.

B- Protocole expérimental de fabrication de la monocouche cellulaire

Les paramètres liés au protocole de microstructuration ont été fixés notamment les molécules de passivation et de fonctionnalisation et le temps d'exposition aux DUVs (paramètres vert, orange et gris de la Figure 44). Concernant les paramètres de culture cellulaire (tous les autres paramètres de la Figure 44), ils ont été modulés jusqu'à d'identifier les paramètres expérimentaux qui semblaient être les plus optimaux pour induire la formation de jonctions entre les cellules confinées dans chaque microstructure dans les groupes de 3 hexagones. Ainsi, une densité initiale de 550 000 cellules/mL de cellules EAhy926 ont été mises en suspension dans un milieu de culture cellulaire à 10 % de FBS pendant un temps initial d'adhésion de 2 h dans l'incubateur. Ensuite le milieu de culture cellulaire est changé afin d'enlever les cellules en suspension qui n'ont pas adhéré. Un nouveau milieu de culture est ajouté dans la boîte de pétri contenant 0 % de FBS afin de réduire les probabilités de prolifération et de divisions cellulaires. Les cellules confinées dans les groupes de 3 hexagones commencent à former des jonctions à partir de 24h d'adhésion dans l'incubateur. Ensuite les cellules sont fixées et les jonctions et les noyaux marqués avec des fluorophores spécifiques (Figure 45).

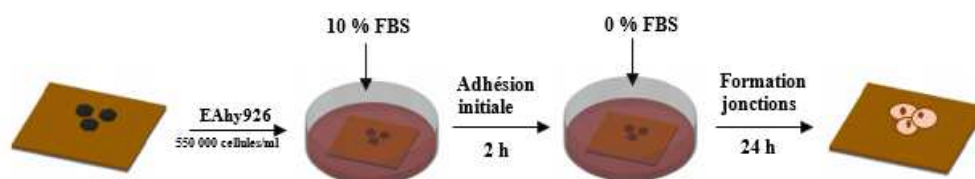


Figure 45: Schéma du protocole expérimental de formation des jonctions entre les cellules confinées dans les microstructures dans les groupes de 3 hexagones.

C- Vérification de la formation de jonctions cellule/cellule

Dans le chapitre précédent, la distribution du nombre de cellules dans les microstructures a été quantifiée en fonction des surfaces des régions adhésives (Figure 33 – a). Ainsi, les surfaces des régions adhésives pour lesquelles, en moyenne, 3 cellules confinées dans les hexagones ont été comptées, correspondent à des surfaces autour de 3400 μm^2 (Figure 46 – a). Avant de travailler avec les groupes de 3 hexagones espacés par des régions non adhésives de différents espacements, des tests ont été effectués pour vérifier si le protocole expérimental de formation de jonctions qui a été développé est optimal et si le protocole de marquage fonctionne. Des cellules EAhy926 ont été déposées sur un substrat microstructuré et fonctionnalisé selon un masque contenant des grands hexagones de 72.5 μm de diamètre, capable d'accueillir plusieurs cellules, correspondant à une surface adhésive d'environ 3400 μm^2 . Ces hexagones sont espacés les uns des autres d'une région passivée de 25 μm d'espacement afin d'isoler les microstructures les unes des autres (Figure 46 – b). Après un temps de 24 h d'adhésion dans l'incubateur pour être certain d'avoir plusieurs cellules par hexagone, les cellules ont été fixées, et leurs noyaux et jonctions marqués. Les échantillons sont ensuite montés entre lame et lamelle et observés par microscopie à fluorescence. Afin de

marquer les jonctions cellule/cellule, un anticorps monoclonal appelé 55-7H1 conjugué avec le fluorophore FITC (BD Pharmingen™) est utilisé. Cet anticorps se lie spécifiquement à un type de cadhérines appelé CD144 (Cluster of Differentiation 144) ou VE-cadhérines. La Figure 46 – c montre 4 hexagones de $3400 \mu\text{m}^2$ de surfaces d'adhésion où 3 cellules ont adhéré. Les cellules confinées dans ces hexagones ont formé des jonctions entre elles après 24 h d'adhésion dans l'incubateur.

Cette expérience permet de confirmer le protocole de formation de jonctions entre les cellules après 24 h d'adhésion dans l'incubateur, ainsi que le protocole de marquage fluorescent des cadhérines au niveau des jonctions d'adhérence.

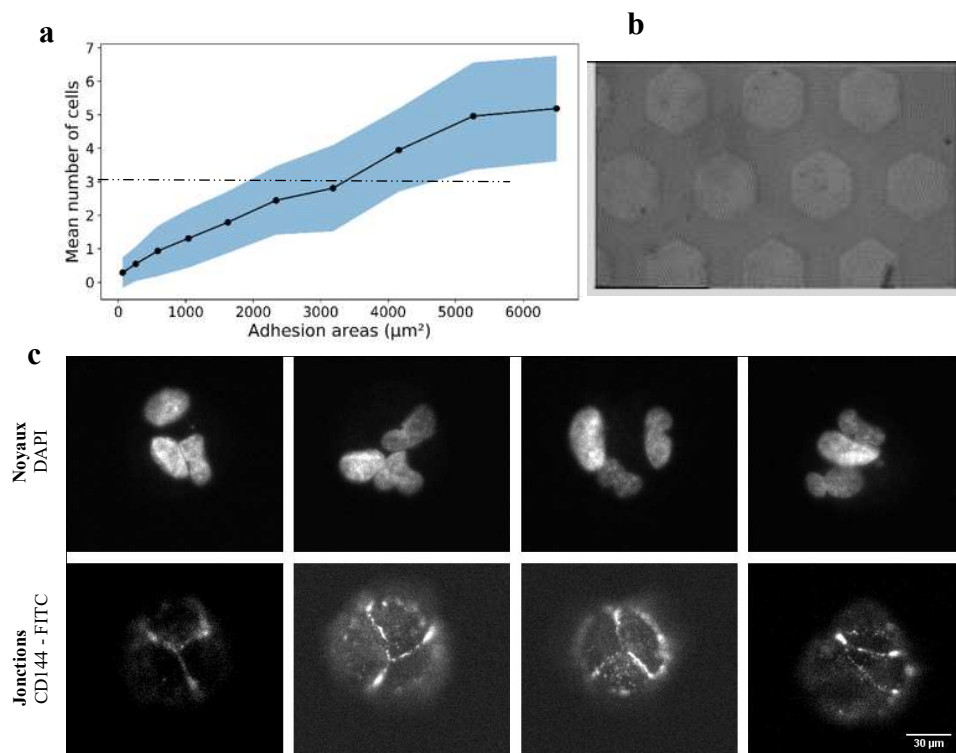


Figure 46: Vérification de la formation des jonctions cadhérines entre les cellules confinées dans des hexagones dont la surface d'adhésion est de $3400 \mu\text{m}^2$. a) Distribution du nombre de cellules dans les hexagones en fonction des surfaces des régions adhésives. Une surface de $3400 \mu\text{m}^2$ correspond à des hexagones de $72.5 \mu\text{m}$ de diamètre où, en moyenne, 3 cellules sont confinées. b) Marquage au bleu de Coomassie des hexagones de $72.5 \mu\text{m}$ de diamètre, espacés de $25 \mu\text{m}$. c) Images en fluorescence des noyaux marqués au DAPI et des jonctions marquées avec CD144-FITC de 4 hexagones.

II- Quantification du phénotype statique dans les groupes de 3 hexagones

A- Paramètres géométriques de formation des jonctions dans les groupes de 3 hexagones

Après avoir démontré la formation de jonctions VE-cadhérines, cette partie présente la formation des jonctions entre des cellules situées dans des hexagones distincts en fonction des espacements entre ces derniers. Afin de vérifier si les cellules confinées dans chaque microstructure dans les groupes de 3 hexagones forment des jonctions entre elles pour différents espacements, les cellules sont fixées après 24 h d'adhésion dans l'incubateur selon le protocole décrit dans la Figure 45. Ensuite, les noyaux sont marqués au DAPI et le cytosquelette, principalement les filaments d'actine sont marqués avec de la phalloïdine conjuguée au fluorophore Texas-Red. Les échantillons sont ensuite montés entre lame et lamelle, puis observés avec un microscope à fluorescence.

Pour les groupes de 3 hexagones espacés de 3 μm , les filaments d'actine sont localisés entre les cellules selon une forme en Y, comme montré par la flèche bleue (Figure 47 – a). Ces filaments montrent une colocalisation avec le marquage des jonctions VE-cadhérines, comme il sera présenté dans la partie suivante. En effet, il a été démontré que les interactions entre le complexe VE-cadhérine/caténines et les filaments d'actine du cytosquelette jouaient un rôle important dans la régulation des jonctions endothéliales et donc dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium¹⁰⁷. L'apparition de fibres de stress est également observée à l'intérieur des cellules (représentée avec les flèches orange Figure 47 – a). Les fibres de stress sont contractiles et représentent des filaments d'actine polarisés avec de la myosine II et de l' α -actinine. Même s'il est difficile de tirer des conclusions sur la dynamique exacte entre les filaments d'actine du cytosquelette et les jonctions VE-cadhérines, ce marquage des filaments d'actine indique que les cellules établissent bien des contacts entre elles pour les espacements de 3 μm .

A l'inverse, dans les groupes de 3 hexagones espacés de 7 μm , les cellules sont de façon évidente trop loin les unes des autres pour former des contacts via des jonctions entre elles (Figure 47 – b). Ainsi, une gamme d'espacements entre 3 et 7 μm a été identifiée pour les groupes de 3 hexagones pour lesquels la formation des jonctions est ensuite vérifiée.

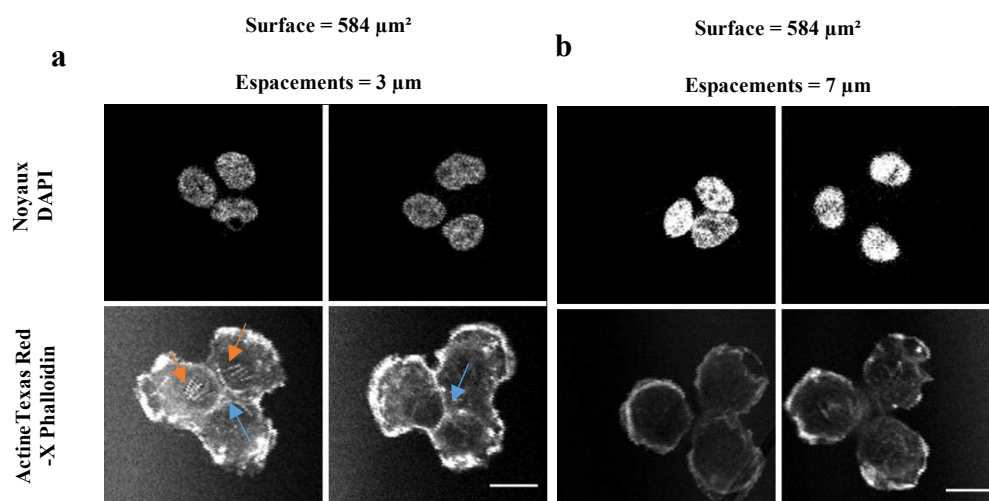


Figure 47: Images en fluorescence des filaments d'actine et des noyaux de groupes de 3 hexagones de surface identique égale à $584 \mu\text{m}^2$ et dont les espacements varient entre $3 \mu\text{m}$ (a) et $7 \mu\text{m}$ (b). La 1^{ère} ligne correspond aux noyaux marqués au DAPI, tandis que la 2^{ème} ligne correspond au marquage des filaments d'actine avec de la phalloïdine conjuguée au Texas-Red. Les flèches bleues correspondent aux filaments d'actine et les flèches orange correspondent aux fibres de stress.

B- Marquage des jonctions cellule/cellule dans les groupes de 3 hexagones

En respectant le protocole décrit dans la figure 45, les cellules sont déposées sur des substrats microstructurés et fonctionnalisés selon un masque contenant des groupes de 3 hexagones de $30 \mu\text{m}$ de diamètre, espacés par une gamme d'espacements entre $3 \mu\text{m}$ et $7 \mu\text{m}$. Après 24 h d'adhésion dans l'incubateur, les cellules sont fixées et leurs jonctions et noyaux sont marqués.

La Figure 48 montre des images de marquage pour 5 exemples de groupes de 3 hexagones pour des espacements de $3 \mu\text{m}$, $4 \mu\text{m}$ et $5 \mu\text{m}$. Pour les espacements de $1 \mu\text{m}$ et $2 \mu\text{m}$, il a été démontré, dans la Figure 40, que la probabilité d'obtention de exactement une cellule par hexagone pour ces espacements était plus faible. Cependant, dans les quelques groupes où deux ou trois cellules adhèrent, les cellules forment bien des jonctions VE-cadhérines entre elles. Pour les espacements de $6 \mu\text{m}$, aucuns résultats n'ont été obtenus afin d'évaluer la formation des jonctions entre les cellules.

Dans la Figure 48, le marquage des noyaux au DAPI permet de confirmer qu'il y a bien exactement 1 cellule par microstructure hexagonale. Tandis que le marquage spécifique des jonctions VE-cadhérines indique la formation de jonctions entre les 3 cellules. Ces images en fluorescence des jonctions révèlent un marquage en Y entre les cellules dans les groupes de 3 hexagones et confirme l'établissement de jonctions VE-cadhérines entre les cellules confinées dans les hexagones quel que soit l'espacement. Pour la suite de ces travaux, l'espacement sélectionné est le plus petit égal à $3 \mu\text{m}$.

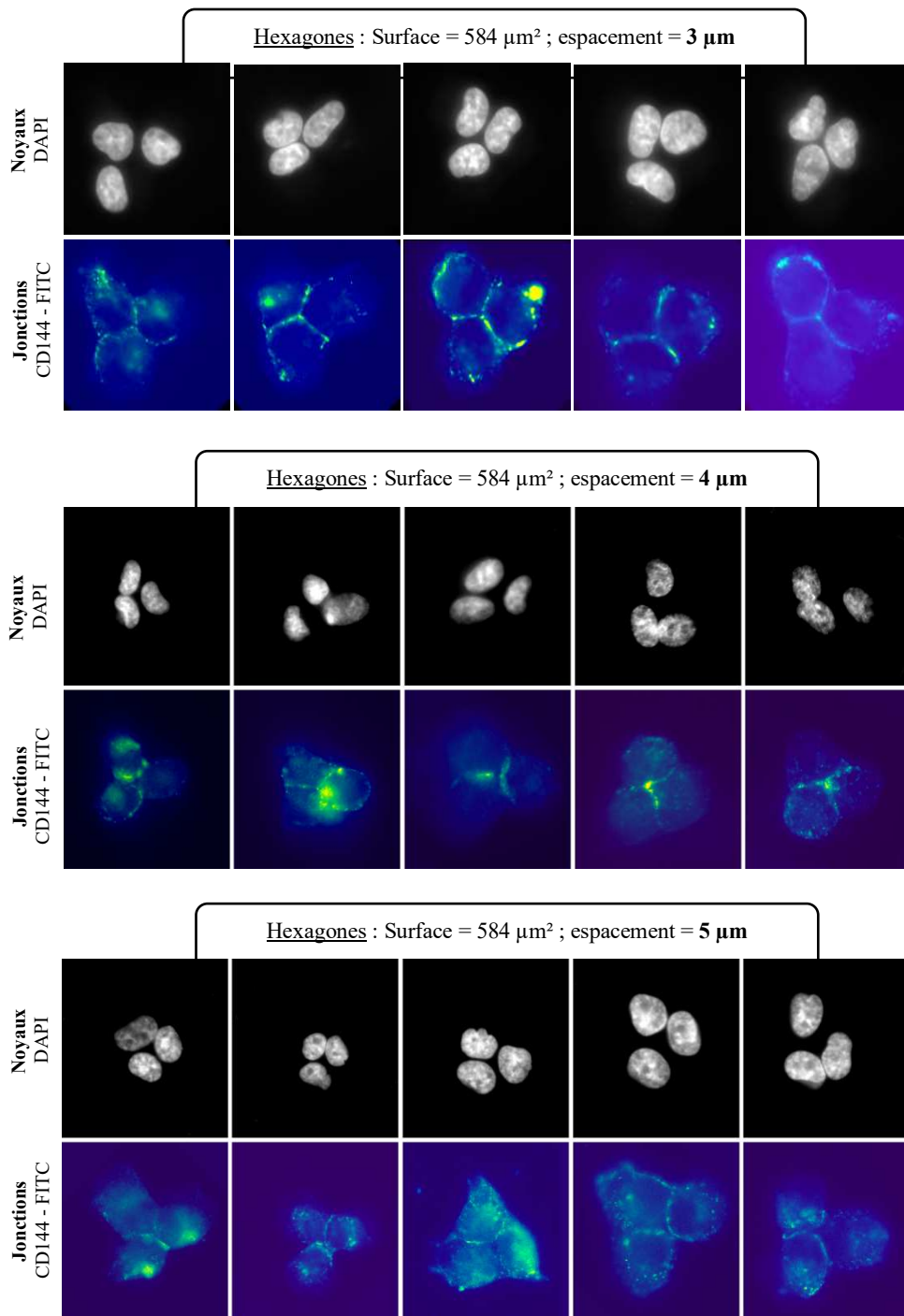


Figure 48: Images en fluorescence : des noyaux marqués au DAPI prises simultanément avec les images de fluorescence des jonctions cellule/cellule marquées avec un marqueur de VE-cadhérines conjugué au FITC de 5 groupes de 3 hexagones différents. Chaque hexagone a une surface adhésive de $584 \mu\text{m}^2$ soit $30 \mu\text{m}$ de diamètre et sont espacés soit de $3 \mu\text{m}$, $4 \mu\text{m}$ ou $5 \mu\text{m}$. Les cellules sont fixées après 24 h d'adhésion dans l'incubateur.

2.1.1.1 C- Etude statistique de la formation des jonctions

Dans le but de confirmer statistiquement la localisation des jonctions VE-cadhérines

formées en fonction des patrons d'adhésion et géométrie des microstructures, les images de fluorescence ont été superposées les unes sur les autres. Bien que les groupes de 3 hexagones, comme ils sont disposés en pavage hexagonal dans nos masques, présentent une symétrie avec une intersection de 3 vecteurs à 120° , la superposition de ces images est très difficile car il s'agit de superposer entre elles des images d'expériences différentes. En effet, les cellules sont fixées et marquées, puis les substrats d'or sont montés entre lame et lamelle afin d'observer les cellules en microscopie à fluorescence.

Malgré nos efforts pour toujours essayer d'orienter les substrats de la même manière, il est difficile de reproduire la même rotation et les mêmes translations entre toutes ces expériences différentes et indépendantes les unes des autres. De plus, comme observé dans les images de fluorescence des jonctions (Figure 48), certaines jonctions montrent une intensité de fluorescence plus élevée que ses voisines. Une superposition de ces cinquantaines d'images à la main aurait donc probablement ajouté un biais dans le choix des orientations des jonctions. Par ailleurs, non seulement une certaine variance de l'intensité de fluorescence est observée entre les différentes jonctions au sein d'un même groupe, mais ces images brutes présentent un rapport signal sur bruit assez faible, ce qui rend la tâche de travailler avec ces images très difficile. Pour ces raisons, un protocole de traitement des images a été mis au point permettant de superposer automatiquement les images de fluorescence des différentes expériences de groupes de 3 hexagones et ce à partir des images de fluorescence des noyaux, prises simultanément avec celles des jonctions (donc les images sont acquises selon la même orientation). Aucune hypothèse n'a été faite concernant la position de ces noyaux au sein de chaque hexagone mais le fait que les images des noyaux sont beaucoup plus contrastées permet de déterminer l'orientation des images. La position des noyaux au sein des hexagones, dans les conditions expérimentales où les jonctions sont formées, sera discutée dans la partie suivante (Chapitre 3, Section 1, III).

Après segmentation des noyaux marqués au DAPI sur le logiciel Fiji (Figure 49 – 1), un script python permet de calculer les centres de masse de chaque noyau et le barycentre des 3 noyaux en utilisant une méthode d'apprentissage supervisée appelée Support Vector Machine (SVM)¹⁰⁸. Dans le cas d'une séparation binaire, c'est à dire quand il faut séparer deux groupes de points appartenant à des classes différentes, l'algorithme au cœur du fonctionnement d'un SVM linéaire cherche la "meilleure" ligne (un hyperplan en dimension > 2) qui sépare les données. Dans ce cas d'étude, parce que les noyaux sont disjoints, il est certain qu'une telle ligne existe. La "meilleure" ligne est celle qui se situe le plus loin possible de chacun des points à séparer. Dans ce contexte, pour obtenir les trois droites séparant les noyaux de cellules, l'algorithme est exécuté itérativement 3 fois en considérant à chaque itération que les pixels d'un noyau correspondent à l'une des classes à séparer, et l'ensemble des pixels des deux autres noyaux correspondent à la seconde. On obtient ainsi, en considérant successivement chaque noyau, 3 lignes séparant optimalement les pixels ayant été segmentés comme appartenant à chacun des noyaux (lignes rouge, verte et bleue). En prenant le barycentre des 3 intersections de ces 3 lignes, on obtient ainsi le point O de la Figure 49 – 2. Lorsque le barycentre O calculé est tracé, sur les images de fluorescence des jonctions, les résultats montrent que le barycentre concorde avec l'intersection des 3 jonctions qui

forment un Y (Figure 49 – I). Ainsi, puisque les assemblages hexagonaux correspondent à des modèles de 3 hexagones avec une intersection de 3 vecteurs à 120°, le choix du calcul de l'angle de rotation est arbitraire et n'impacte pas le résultat final. L'une des 3 frontières optimales (lignes rouge, verte et bleue) entre les noyaux est choisie de façon aléatoire et l'angle de rotation entre cette droite choisie et l'horizontale est calculé. Cet angle de rotation permet de réorienter chacun des groupes de 3 hexagones afin de les superposer. Ainsi, une fois que l'angle de rotation est obtenu par ce traitement des images des noyaux segmentés (Figure 49 – 3), cet angle est appliqué aux images de fluorescence des jonctions (Figure 49 – II).

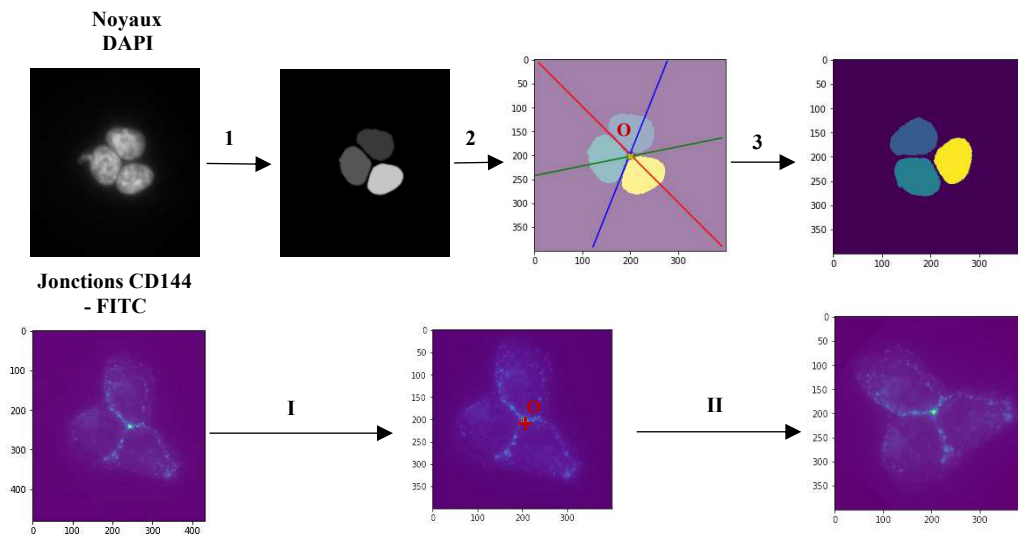


Figure 49: Traitement des images pour la génération de la carte d'intensité des jonctions formées entre les cellules dans les groupes de 3 hexagones.

La superposition de toutes les images de fluorescence des jonctions, traitées et tournées comme décrit précédemment, permet de générer une carte d'intensité (Figure 50 – a). où toutes les valeurs d'intensités des pixels sont représentées. Cette carte montre que, malgré le bruit de fond de fluorescence parasite, les valeurs d'intensités les plus élevées sont localisées au niveau des jonctions cellule/cellule. A noter que ces jonctions sont bien formées sur les régions passivées non adhésives au niveau des espaces entre les hexagones. Ceci est confirmée grâce à la superposition des hexagones estimés du photomasque de microstructuration sur la carte d'intensité de fluorescence des jonctions (Figure 50 – b). Ce traitement statistique automatisé sur plus de 50 groupes de 3 hexagones, afin de limiter au maximum les biais, confirme la présence de ce phénotype structural et valide le protocole pour créer une brique élémentaire d'un modèle *in vitro* de monocouche cellulaire endothéliale.

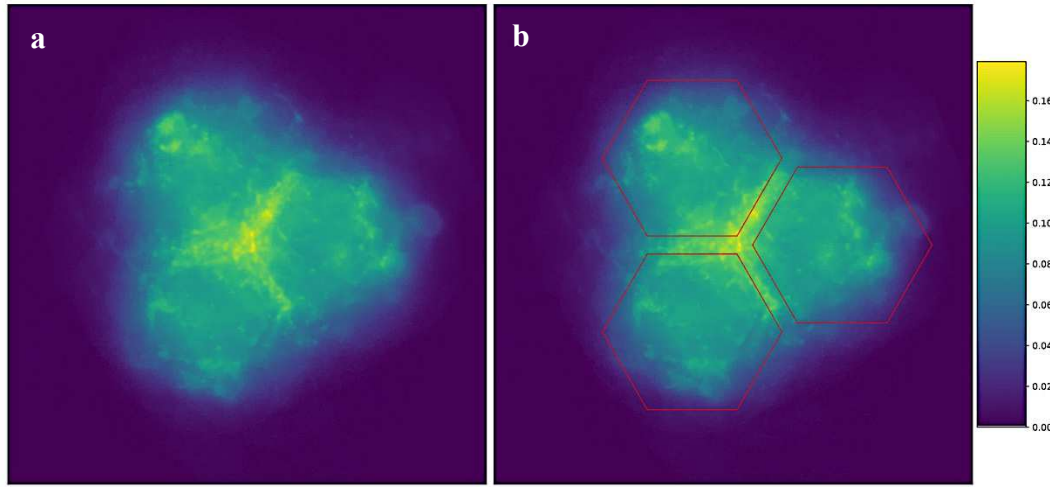


Figure 50: Carte d'intensité de la superposition des images de fluorescence des jonctions VE-cadhérines formées entre les cellules dans les groupes de 3 hexagones (diamètre = 30 μm , espacement = 3 μm). **a)** carte de la moyenne des intensités de 52 images de fluorescence de jonctions VE-cadhérines de groupes de 3 hexagones. **b)** La carte d'intensité représentée en (a) avec la reconstitution des hexagones estimés du photomasque de microstructuration. Les hexagones sont reconstitués à partir du barycentre des noyaux calculés précédemment et des dimensions théoriques connues des hexagones. Ils sont redimensionnés en fonction de la taille des pixels des images de fluorescence.

III- Déplacement des noyaux et polarité des cellules

Lorsque les cellules forment des jonctions entre elles dans les groupes de 3 hexagones, un apparition de fibres de stress qui représentent des filaments d'actine polarisés (Figure 47 – a) est observée. Dans la littérature, la polarité cellulaire est définie comme l'expression d'une asymétrie morphologique et fonctionnelle de la compartimentation cellulaire selon un axe ou un point¹⁰⁹. Il a été démontré que, dans le cas de cellules individuelles, la géométrie du microenvironnement adhésif des cellules guidait la polarisation cellulaire et l'organisation interne des cellules¹¹⁰. De plus, il a également été démontré que les changements morphologiques cellulaires impliquaient des changements au niveau des noyaux¹¹¹. Dans cette étude, les noyaux des cellules confinées dans les hexagones ne sont pas positionnés pareil après 2 h ou 24 h d'adhésion dans l'incubateur. Il est alors intéressant de comparer la distance entre les noyaux à la distance théorique entre les centres de gravité des hexagones dans le masque. Cette dernière s'exprime en fonction du rayon du cercle inscrit de l'hexagone (r) et de l'espacement entre les hexagones (e) par la formule suivante :

$$D_{n-n} = \sqrt{3}r + e.$$

Pour les hexagones de 30 μm de diamètre et espacés de 3 μm , la distance théorique entre les centres de masse des hexagones dans les groupes de 3 du photomasque est égale à environ 29 μm . Lorsque l'on mesure la distance moyenne entre ces noyaux après 2 h d'adhésion, elle est égale à 23 $\mu\text{m} \pm 1.9 \mu\text{m}$. Tandis qu'après 24 h d'adhésion, la distance moyenne entre les noyaux n'est plus que de 16.5 $\mu\text{m} \pm 1.8 \mu\text{m}$ (Figure 51). Cette étude effectuée sur 30 groupes de 3 hexagones montre ainsi le déplacement des noyaux au sein de chaque hexagone, préalablement à la formation des jonctions cellule/cellule. Les noyaux se déplacent dans la direction du barycentre des 3 hexagones du masque. Ce déplacement des noyaux, en plus de l'apparition de fibres de stress, démontrent l'importance de la polarité cellulaire dans la formation de jonctions cellule/cellule.

Ainsi, dans les assemblages à 3 hexagones, chaque cellule qui adhère dans un hexagone voit son noyau se déplacer à l'intérieur vers le barycentre de la structure globale, montrant ainsi une certaine anisotropie des cellules dans cette configuration. Il est intéressant de supposer ainsi la modulation des cellules, de leurs noyaux et de leur cytosquelette dans des assemblages de plus de 3 hexagones. Cette partie sera plus discutée dans le chapitre 5 – section 1 – II.

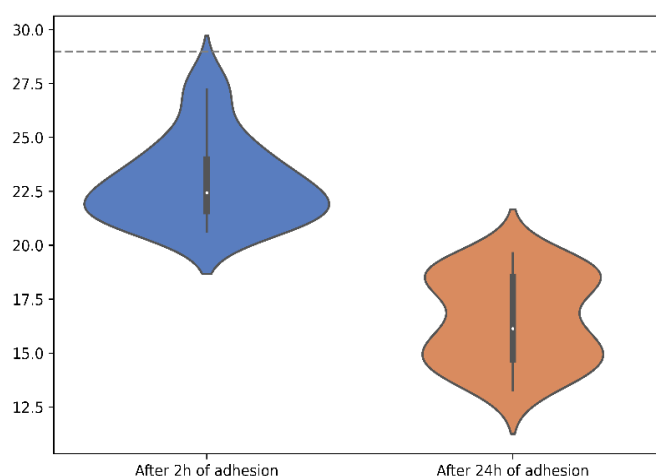


Figure 51: Distribution de la distance moyenne entre les noyaux des 3 cellules dans les groupes de 3 hexagones. En bleu : après 2 h d'adhésion ; En rouge : après 24 h d'adhésion. La ligne en pointillés correspond à la distance théorique entre les centres de masse des hexagones dans les groupes de 3 hexagones sur le photomasque. Les expériences ont été effectuées sur 30 groupes de 3 hexagones de 30 μm de diamètre, espacés de 3 μm .

SECTION 2 : EVALUATION DU PHENOTYPE DYNAMIQUE DU GROUPE DE 3 HEXAGONES

L'imagerie SPR permet de mesurer la réponse de cellules vivantes sur des substrats spécifiques pendant leur adhésion, leur motilité¹¹² et en présence d'agents externes tels des endotoxines et des agents bactériens⁹⁵. Dans cette section sont présentés les résultats

d'évaluation du phénotype fonctionnel des groupes de 3 hexagones artificiels fabriqués dans ces travaux de thèse. Pour répondre à cette problématique, la réponse des cellules dans les assemblages à 3 hexagones est mesurée selon différents stimuli pathophysiologiques, et ce en utilisant un montage d'imagerie par microscopie SPR. Ce microscope SPR a été développé dans le laboratoire de Michel Grandbois à l'Institut de Pharmacologie de Sherbrooke¹¹³. Cette configuration permet d'atteindre de forts grossissements et une meilleure résolution dans l'axe perpendiculaire aux plasmons. L'angle élevé d'incidence nécessaire à l'obtention de la résonnance plasmonique est obtenue en focalisant le faisceau incident sur le plan focal arrière de l'objectif à forte ouverture numérique. Le montage sera décrit en détails dans la section matériels et méthodes de ce chapitre.

I- Protocole expérimental pour l'imagerie par microscopie SPR de cellules vivantes

L'imagerie en temps réel de cellules vivantes présente des défis considérables, notamment concernant la stabilité de la fonction métabolique des cellules. En effet, afin de pouvoir mesurer les réponses cellulaires en présence de différents stimuli, il faut s'assurer que les cellules soient vivantes et maintenues dans des conditions métaboliques optimales. Les paramètres expérimentaux importants à prendre en compte sont la température, le pourcentage de facteurs de croissance dans le milieu de culture et le pH [détaillé dans la section matériels et méthodes de ce chapitre]. L'adhésion des cellules sur les substrats microstructurés et la formation de jonctions entre elles s'effectuent dans des conditions d'incubateur. Un moment critique pour l'imagerie de cellules vivantes commence dès la sortie des échantillons de l'incubateur afin de les installer sur le microscope SPR pour les imager. Il faut essayer de réduire au maximum ce stress subit par les cellules afin de leur permettre de se restabiliser le plus rapidement possible avant de lancer les expériences de cinétiques.

Dans ce but, un tampon appelé HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1-pipérazine éthane sulfonique) est utilisé, ce qui permet de réduire les changements de pH et qui maintient les cellules saines pour une durée maximale de 4 h à température et atmosphère ambiantes. Ce tampon est ajouté à une concentration de 10 μ M dans le milieu de culture à 0 % de FBS après le temps initial d'adhésion, lorsque le milieu de culture est changé afin de retirer les cellules qui n'ont pas adhéré sur le substrat. L'échantillon (substrat + cellules) est ensuite déposé dans un porte-échantillon hermétique, où environ 600 μ L de milieu de culture à 0 % de FBS supplémenté avec de l'HEPES (10 μ m) sont injectés. Le porte échantillon est ensuite recouvert avec un couvercle permettant de réduire l'évaporation. Afin de compenser les l'évaporation résiduelle pendant les expériences de cinétiques, une pompe à seringue permet d'alimenter le porte échantillon d'eau déionisée avec un faible flux afin de ne pas perturber l'expérience. Le porte-échantillon est ensuite déposé sur une plateforme dont la température est contrôlée par un contrôleur de température (Figure 52). De ce fait, les cellules sont maintenues le plus

possible dans un état métabolique stable, confirmé par une stabilisation du signal mesuré en SPRI (Figure 57). Une fois les paramètres expérimentaux liés à l'imagerie du vivant optimisés, il faut ensuite choisir les paramètres de couplage pour s'assurer des bonnes conditions de résonance des plasmons qui dépendent de la longueur d'onde et de l'angle de résonance. Cette étude est détaillée dans la section matériels et méthodes de ce chapitre. Pour toutes les études de cinétique présentées dans cette section, la longueur d'onde de résonance est égale à $\lambda_{res} = 740 \text{ nm}$. Avant chaque expérience, un balayage angulaire est effectué afin de sélectionner l'angle optimal de résonance.

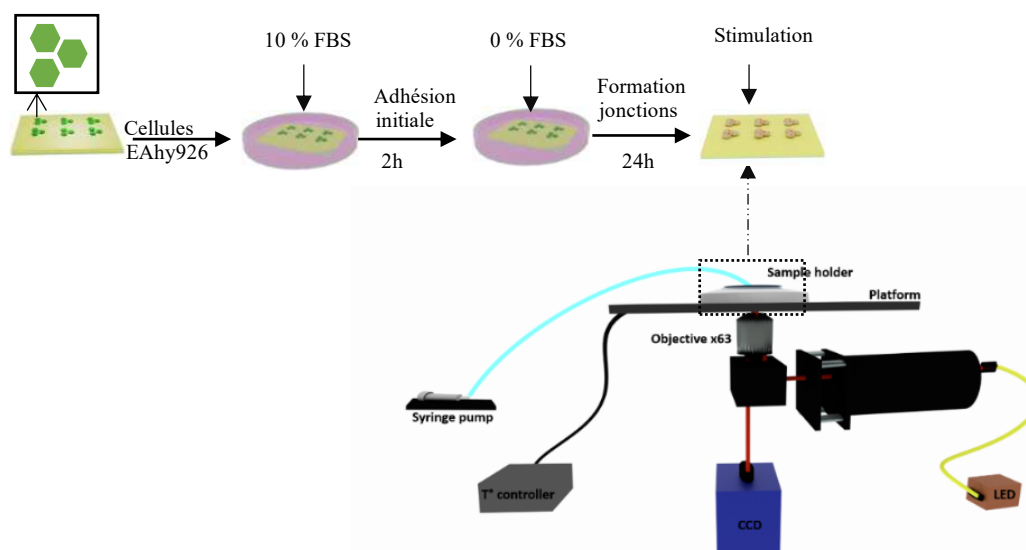


Figure 52: Protocole expérimental et imagerie par microscopie SPR des groupes de 3 hexagones microstructurés sur des substrats d'or.

II- Mesure de la réponse cellulaire après injection de la thrombine

A- Réponse de la monocouche cellulaire endothéliale à la thrombine

La thrombine est une sérine-protéase (enzymes qui coupent les liaisons peptidiques des protéines) multifonctionnelle qui se lie et active un récepteur protéique membranaire nommé PAR1. Elle est impliquée dans le clivage du fibrinogène en fibrine dans la cascade de coagulation, et active différents types cellulaires tels les plaquettes et les cellules endothéliales. La signalisation de la thrombine dans l'endothélium vasculaire induit plusieurs changements morphologiques et phénotypiques. Parmi ces changements sont cités : la contraction cellulaire, l'arrondissement des cellules, des changements au niveau des jonctions cellule / cellule, la perte de perméabilité, perte de la fonction de barrière endothéliale à cause d'une rupture au niveau des jonctions cellule/cellule et finalement la modulation de l'attachement et l'adhésion des cellules sur les substrats^{37,114,115}.

B- Stimulation des groupes de 3 hexagones avec la thrombine

Avant de débiter les expériences permettant de quantifier la réponse des cellules dans les groupes de 3 hexagones après injection d'agents externes par microscopie SPR, il est important de démontrer que les groupes de cellules répondent à la stimulation par la thrombine, d'abord dans des conditions d'incubateur, en temps réel, puis après fixation et marquage des jonctions et du cytosquelette. Les réponses observées sont plus qualitatives que quantitatives et permettent uniquement de confirmer que les groupes de cellules répondent bien à la stimulation, et que cette réponse est en corrélation avec celle observée dans un tissu endothélial confluent *in-vitro*.

1- Observations en contraste de phase de la réponse des cellules dans des conditions d'incubateur

Dans le but de comprendre la réponse des cellules après stimulation avec la thrombine, les cellules adhérant dans les groupes de 3 hexagones selon le protocole de la Figure 52, ont été suivies, en temps réel, dans des conditions d'incubateur. Les échantillons ont été observés avec le microscope à contraste interférentiel différentiel (CID) décrit dans la section matériels et méthodes de ce chapitre (Figure 64), disposant d'une chambre environnementale avec un contrôleur de température, d'humidité et de CO₂. L'observation de la réponse des cellules dans les groupes de 3 hexagones dans des conditions similaires à celles d'un incubateur de culture cellulaire, permet de vérifier que, dans ces conditions expérimentales idéales, les cellules adhérant dans les groupes de 3 hexagones artificiels ont une réponse similaire à celle d'un tissu confluent. En effet, après injection de 1 U/mL de thrombine, les cellules deviennent plus granuleuses et développent au niveau de leurs extrémités des bourgeonnement cellulaires comme représenté par les flèches vertes (Figure 53). La résolution des images obtenues ne permet pas de faire une quantification significative, mais cela indique de même une forte réponse des cellules à la thrombine, cohérente avec la littérature.

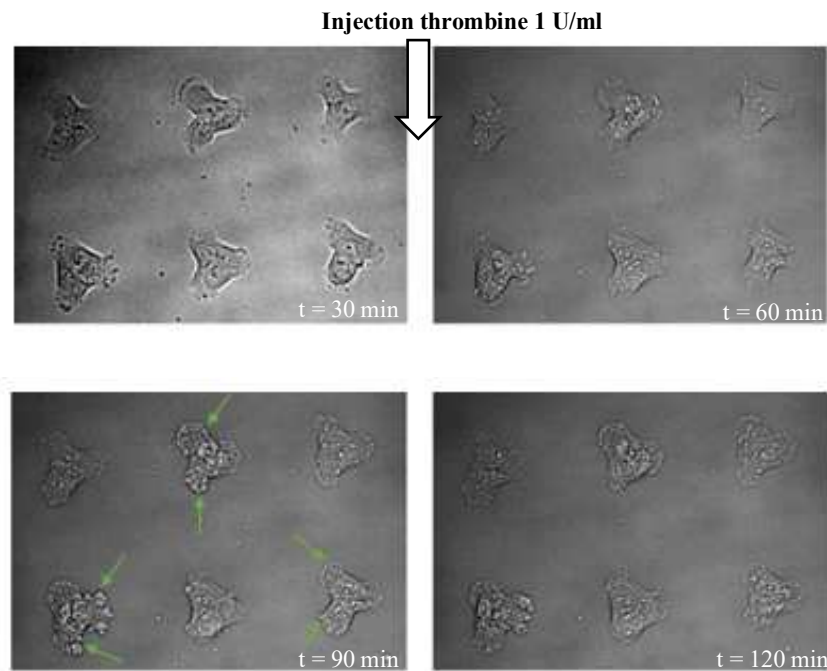


Figure 53: Cinétique des cellules dans les groupes de 3 hexagones (diamètre : 30 μm , espacement = 3 μm) après injection de la thrombine à une concentration de 1 U/mL. Les images en contraste de phase ont été acquises dans des conditions d'incubateur, pendant 2h. Ici, un aperçu de la cinétique est montré toutes les 30 minutes.

2- Observation en microscopie confocale de la réponse des cellules après injection de la thrombine

Dans le but d'explorer la réponse des cellules plan à plan, ces dernières ont été fixées après injection de la thrombine de 1 U/mL pendant 1h, comme décrit dans le protocole de la Figure 54. Ensuite, les jonctions et les filaments d'actines ont été marqués avec des marqueurs fluorescents spécifiques. Ces échantillons ont ensuite été observés avec un microscope confocal (LeicaDMI8) permettant d'obtenir des images de fluorescence en 3 dimensions (x, y, z).

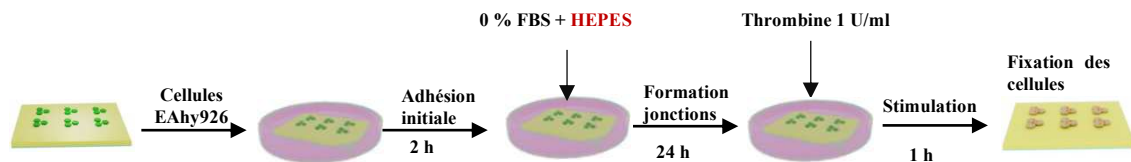


Figure 54: protocole expérimental pour les expériences de marquage des jonctions et des filaments d'actine après stimulation avec la thrombine.

• Jonctions cellule/cellule

Comme précédemment, des marqueurs fluorescents spécifiques aux jonctions

cadhérines et aux noyaux ont été utilisés. Grâce à la microscopie confocale, un balayage dans la dimension en Z est effectué, débutant au niveau de l'accroche des cellules sur le substrat avec un pas en Z de 0.3 μm entre les images, calculé automatiquement selon le critère de Nyquist. Après avoir réglé les paramètres d'acquisition selon les spectres d'excitation et d'émission de chaque fluorophore, on obtient des images acquises simultanément en lumière blanche, pour le marqueur de VE-cadhérines conjugué au FITC et pour les noyaux marqués au DAPI pour chaque groupe de 3 hexagones.

Les images de la Figure 48 montrent des groupes de 3 hexagones où les cellules endothéliales ont formé des jonctions entre elles dans des conditions expérimentales sans aucune stimulation, au niveau d'une coupe en Z où les jonctions et les noyaux sont nets. En comparaison avec ces images et après injection de la thrombine (1 U/mL), une nette baisse du signal de fluorescence est observée au niveau des jonctions représentée par un signal hétérogène et diffus comme l'indique les flèches bleues (Figure 55). L'impact de l'injection de la thrombine sur les cellules est visible tout au long de l'axe Z, allant du substrat au haut de la cellule. En prenant en compte la taille des voxels (x, y et z) des images confocales et le nombre d'images au total entre le substrat et le haut de la cellule, une épaisseur de cellule de 10.5 μm est calculée. Cette perte de signal de fluorescence au niveau des jonctions, en comparaison avec les images de la Figure 48, peut être corrélée avec une rupture des jonctions entre les cellules endothéliales après injection de la thrombine.

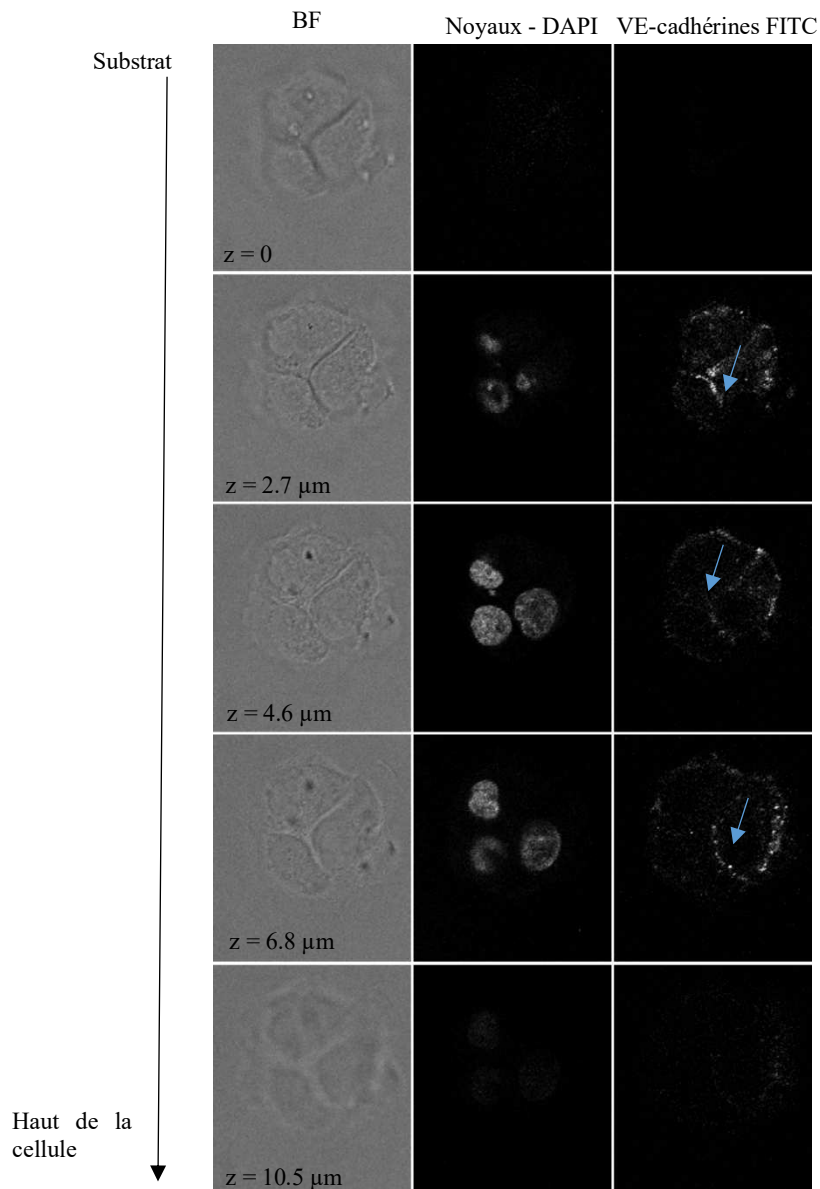


Figure 55 : Cellules dans les groupes de 3 hexagones de 30 μm de diamètre, espacés de 3 μm après stimulation avec de la thrombine à 1 U/mL. Les cellules sont fixées après 24 h d'adhésion dans l'incubateur et les jonctions VE cadhérines et les noyaux sont marqués. Les images 3D ont été obtenues avec un microscope confocal.

Hauteur de formation des jonctions pour les cellules

Il est intéressant de noter que ces images de microscopie confocale ont permis d'identifier à quel niveau du substrat d'or sont formées les jonctions intercellulaires. Il a été démontré que les jonctions sont formées entre les hexagones au niveau de régions passivées non-adhésives (Figure 50). A partir de la taille des voxels (x, y, z), il est

possible de calculer l'épaisseur de l'échantillon imagé ainsi que la localisation en Z des différentes composantes biologiques. Une épaisseur d'environ une dizaine de micromètre est mesurée pour les cellules (entre le substrat d'or sur lequel la cellule adhère et le haut de la cellule). Les jonctions sont observées, de façon nette, à une épaisseur entre 3 μm et 7 μm du substrat d'or. Cette information est importante pour la suite des travaux concernant la résolution de l'imagerie SPR pour la quantification des activités cellulaires des cellules vivantes et sera discutée plus loin.

- Filaments d'actine et cytosquelette

Dans l'exploration des cellules plan par plan, les filaments d'actine présentent également un cas d'étude intéressant. Le marquage des filaments d'actine dans la Figure 47 a montré que les cellules dans les groupes d'hexagones qui ont formé des jonctions entre elles présentent un marquage d'actine colocalisé avec celui des jonctions VE-cadhérines et une apparition de fibres de stress. Le marquage des filaments d'actine permet de visualiser la réponse du cytosquelette des cellules après injection de la thrombine. Les échantillons sont montés entre lame et lamelle puis observés au microscope confocal. Les images en 3 dimensions (x, y, z) permettent de visualiser les variations du cytosquelette à différents niveaux de la cellule en faisant l'acquisition de coupes allant du substrat à la partie supérieure de la cellule (Figure 56). En effet, à différents niveaux de l'axe Z, les extrémités cellulaires présentent des bourgeonnements (flèches vertes) comme observé dans l'expérience montrée dans la

Figure 53. Ces bourgeonnements sont visibles autour de chaque cellule individuelle et des espacements de 1 μm , 3 μm et 7 μm . Les cellules répondent à l'injection de la thrombine à la fois dans des conditions expérimentales où elles forment des jonctions (pour les espacements de 1 μm et 3 μm) et même dans le cas où elles n'en forment pas car les cellules sont trop éloignées pour établir des contacts (cas des espacements de 7 μm) (Figure 56). Sur les images correspondant à peu près au milieu de la cellule en Z, où les noyaux semblent être également le plus nets, une désorganisation est observée au niveau des contours des cellules avec toujours une colocalisation des filaments d'actine avec les jonctions VE-cadhérines, mais une disparition des fibres de stress. Ainsi les cellules semblent remodeler leur cytosquelette, mais il est difficile d'aller plus loin uniquement avec les images obtenues dans cette expérience.

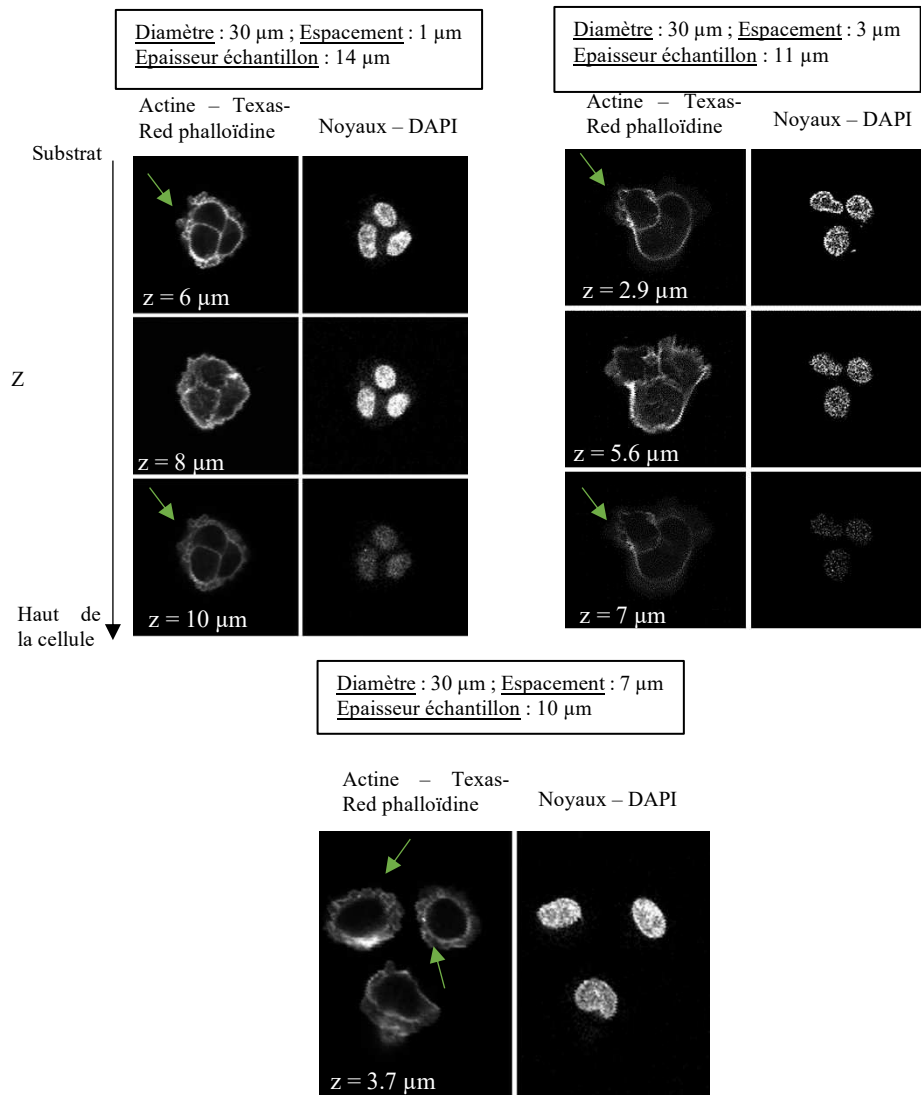


Figure 56: Cellules dans les groupes de 3 hexagones espacés de différents espacements (1 μm, 3 μm et 7 μm). Les cellules dans ces groupes ont été stimulées avec de la thrombine à 1 U/mL pendant 1 h dans un incubateur cellulaire. Les filaments d'actine et les noyaux sont marqués avec respectivement Texas-Red phalloïdine et du DAPI. Les images en 3D sont obtenues avec un microscope confocal.

C- Quantification de la réponse cellulaire à la thrombine des groupes de 3 hexagones par microscopie SPR

1- Suivi des groupes de 3 hexagones au cours du temps après injection de différentes concentrations de thrombine

Les cellules ont été déposées sur des substrats microstructurés comme décrit dans le protocole de la Figure 54. Après 24 h d'adhésion dans l'incubateur, les échantillons sont déposés sur la plateforme de microscopie SPR afin de suivre les cinétiques en temps réel. Cette partie présente la quantification des réponses des groupes de 3 cellules dans différentes conditions expérimentales : une condition contrôle où aucun antigène n'est ajouté et des conditions expérimentales où différentes concentrations de thrombine ont été injectées (from human plasma T6884 – Sigma-Aldrich). Les images en BF sont prises simultanément avec les images SPRI, avec la même caméra CMOS et le même objectif 63X d'ouverture numérique égale à 1.46. Pour les images en BF la résolution latérale selon le critère de Rayleigh pour une longueur d'onde de travail de 740 nm, est égale à 0.3 μm et la résolution en profondeur est égale à 1 μm . Le champ observé est de 200 μm x 200 μm (matrice de 2048x2448 pixels) permettant de faire le suivi au cours du temps d'un maximum de 6 groupes de 3 hexagones.

En ce qui concerne la SPR, la profondeur de pénétration du plasmon dans le milieu diélectrique, est environ égale à 280 nm. Cela montre la limitation du microscope SPR à suivre la cinétique des cellules vivantes à certaines profondeurs. En effet, il est possible de quantifier uniquement ce qui se passe au niveau de l'adhésion de la cellule sur le substrat, que ce soit en SPR ou en BF, mais pas de suivre ce qui se passe au niveau des jonctions qui sont à plusieurs microns au-dessus de la surface d'après les mesures précédentes. Toutefois, l'imagerie SPR permet d'évaluer et de quantifier, en temps réel et sans marquage, des événements biologiques ayant lieu à la surface du substrat. En effet, les cellules répondent à différents stimuli en se détachant ou en se contractant. Ces changements impactent les interactions cellules/substrat et peuvent être quantifiés par imagerie SPR.

L'expérience de contrôle, où aucun agent externe n'a été ajouté, illustre une activité cellulaire typique de cellules vivantes (Figure 57). Comme attendu, les images BF et SPR confirment que, en moyenne, les cellules adhèrent sur le substrat, tout au long de la durée de l'expérience. On peut malgré tout voir que les cellules dans le groupe 2 sont mortes et qu'il est inutile de les prendre en compte (gros bourgeonnement visible sur l'image BF après 1 h d'expérience). Le groupe 5 quant à lui montre une décroissance continue du signal SPR, malgré des images BF normales. Cela indique un problème au niveau de l'adhésion entre le début et la fin de l'expérience qu'il est difficile d'expliquer. A part ces deux groupes (qui montrent l'hétérogénéité de l'activité de cellules vivantes au sein d'une même population), les signaux SPR des autres cellules sont relativement stables avec des oscillations au cours du temps représentatives d'une activité cellulaire normale de cellules vivantes. De fait, un signal SPR trop plat et des cellules ne semblant pas bouger en BF indique souvent un problème de viabilité des cellules.

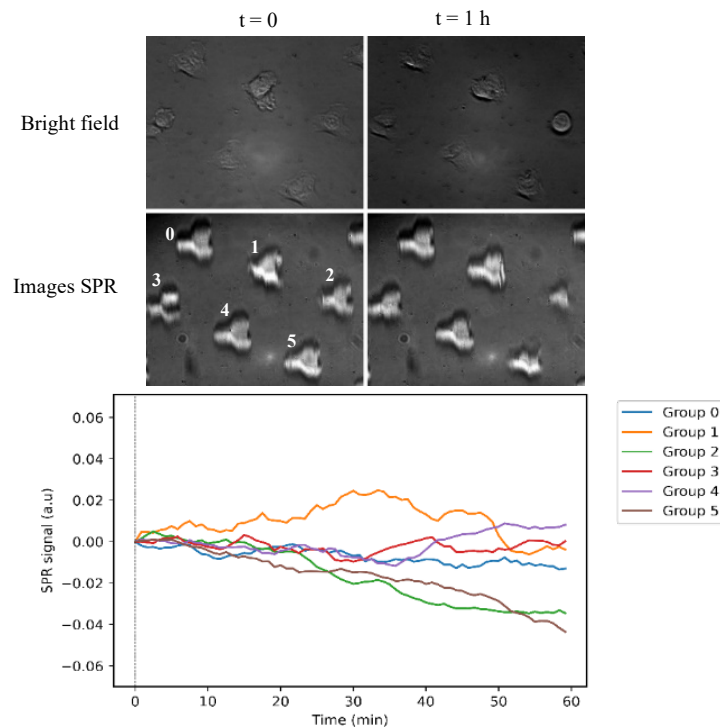


Figure 57: Suivi des réponses cellulaires au cours du temps des groupes de 3 hexagones dans une condition expérimentale de contrôle (aucune injection). Les images BF et les images SPR sont prises simultanément au début et à la fin de l'expérience. Le signal SPR moyen est représenté pour chacun des 5 groupes de 3 hexagones isolé (Matériels et méthodes).

Sur d'autres puces, la thrombine a été injectée à 3 différentes concentrations (en unités/mL) : 10 U/mL, 1 U/mL et 0.1 U/mL, dans la chambre microfluidique. Les images en lumière blanche (Bright field BF) ont été prises, pour chaque expérience, à deux temps : 1 – au début de l'expérience, avant injection de la thrombine pendant que les cellules se stabilisent. 2 – à la fin de l'expérience, environ 60 minutes après stimulation avec la thrombine. Lorsqu'une forte concentration de thrombine à 10 U/mL est injectée, les cellules répondent lentement (entre 10 et 20 minutes). Une décroissance du signal SPR est observée jusqu'à atteindre une sorte de plateau irréversible (Figure 58 – a). Ce plateau correspond au détachement (partiel ou total) des cellules du substrat que l'on observe clairement sur les images. Certaines cellules semblent plus granuleuses, plus contractées et un gros bourgeonnement apparaît au niveau du groupe C. En microscopie SPR, comme celle-ci est très sensible aux changements d'interactions entre les cellules et le substrat, et ce grâce à la profondeur de pénétration des plasmons dans le milieu diélectrique qui est limitée à quelques centaines de nanomètres de la surface, il est possible de voir que certains groupes n'adhèrent plus sur le substrat d'or (groupes B et E), même s'ils semblent encore adhérer sur le substrat en BF.

Lorsqu'une concentration de 1 U/mL de thrombine est injectée, les cellules répondent dans les 10 minutes qui suivent l'injection (Figure 58 – b) avec une décroissance du signal SPRI, suivie par un lent rétablissement du signal pour certains groupes de cellules qui reprennent leurs morphologies initiales. Cela est plus difficilement corrélable avec les images SPR ou BF où les cellules semblent être fortement impactées par l'injection de la thrombine. Il aurait fallu faire des expériences plus longues afin de voir que les cellules reprennent graduellement leur morphologie initiale. A noter que cette réponse cellulaire mesurée en SPR ressemble beaucoup à celle observée dans la littérature dans un tissu endothélial confluent après injection de la thrombine, où les cellules répondent mais sans forcément être détachées du substrat¹¹⁶.

Finalement, pour l'injection de 0.1 U/mL de thrombine, une réponse plus modérée que les autres concentrations est observée, avec un comportement réversible des groupes de cellules représenté par des variations du signal (Figure 58 – c). Ces variations sont très similaires à celles observées pour les groupes de cellules dans la condition de contrôle (Figure 57). Cette réponse modérée est également observée dans les images BF et SPR où les cellules ne perdent pas leur morphologie hexagonale du pavage de 3 hexagone initial. Il faut noter que pour chacune des conditions expérimentales, même si l'acquisition des cellules dans les groupes de 3 hexagones a été effectuée en même temps et de la même manière, sur le même substrat, une forte hétérogénéité de la réponse cellulaire est quand même observée. Cette hétérogénéité des réponses cellulaires à une même perturbation dans une même population a été observée et caractérisée dans différentes études^{117–119}.

Dans l'ensemble de ces études, cette hétérogénéité cellulaire à l'échelle d'une cellule individuelle ou d'une population est principalement liée aux différentes réponses des cellules aux mêmes perturbations, dans les mêmes conditions expérimentales. Même si l'étude de cette hétérogénéité est complexe et difficile à comprendre, il est important de développer des outils mathématiques et de traitements d'images et/ou d'imagerie à haute résolution afin de la quantifier. La caractérisation de cette hétérogénéité permettrait d'extraire des informations biologiques importantes, ou de classer une population en des sous populations de phénotypes distincts.

Dans ce cas d'étude, cette hétérogénéité de réponses cellulaires pourrait être liée au nombre de cellules dans les groupes de 3 hexagones. En effet, ces conditions expérimentales de travail ont permis d'observer une bonne probabilité d'adhésion et de confinement d'une cellule par hexagone dans les assemblages à 3. Cependant, sur les 6 groupes de 3 hexagones observés par imagerie SPR, il est possible que certains groupes ne contiennent pas exactement 3 cellules dans les assemblages, mais moins (Annexe – Section 4 – I). De plus, l'hétérogénéité des réponses cellulaires observée dans cette étude peut également être liée à la qualité d'adhésion des cellules sur le substrat à l'échelle individuelle puis à l'échelle d'un groupe de 3 hexagones, et surtout à la complexité des études avec des cellules vivantes.

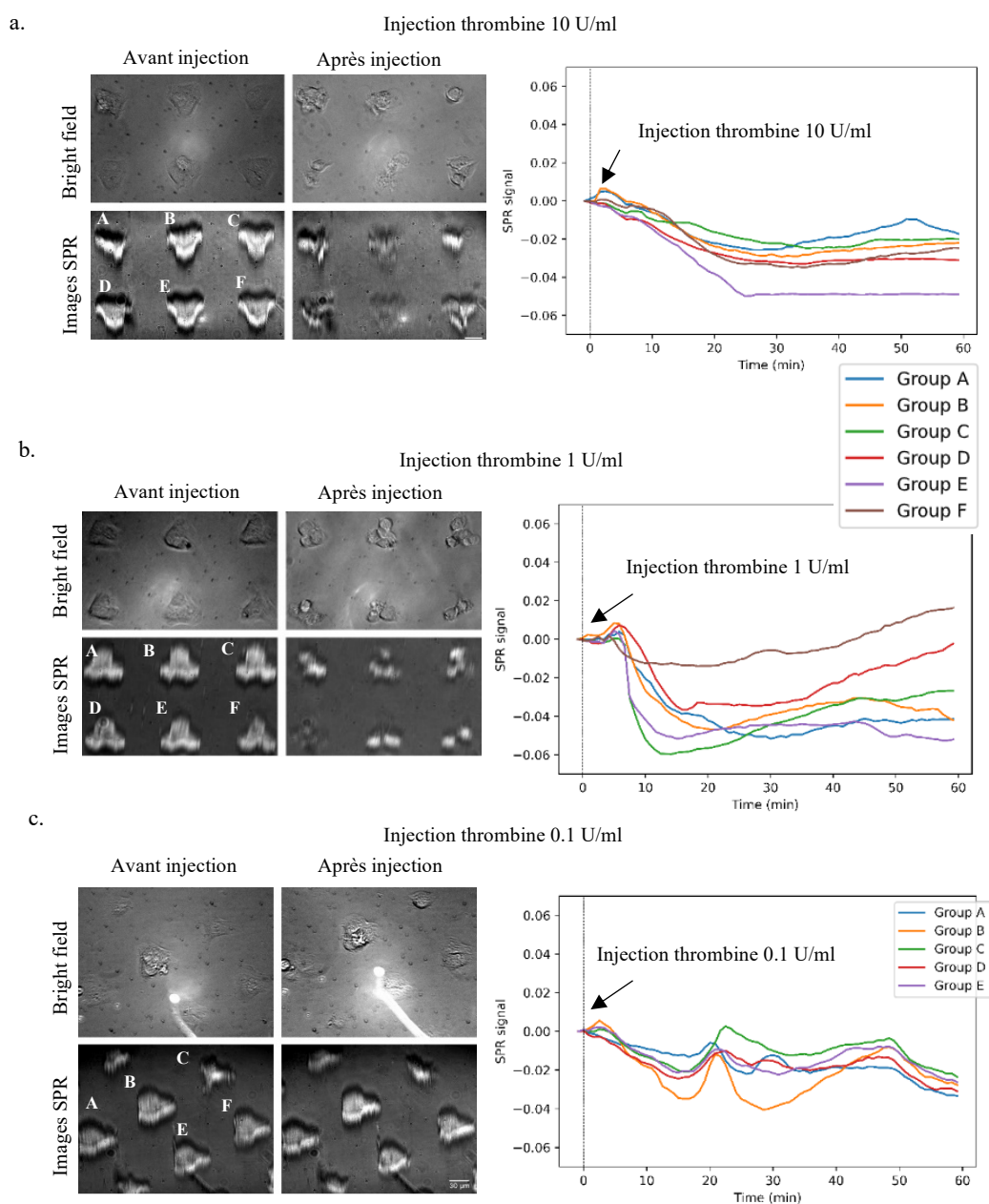
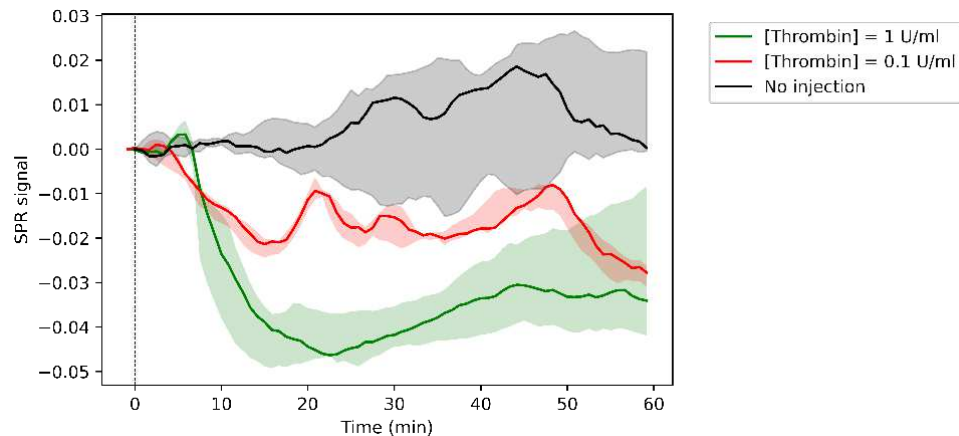


Figure 58: Suivi des réponses cellulaires au cours du temps des groupes de 3 hexagones après injection de différentes concentrations de thrombine. Pour chaque expérience, les images BF et les images SPR sont prises simultanément avant et après injection de la thrombine. Pour toutes ces expériences, le signal SPR moyen est représenté pour chaque groupe de 3 hexagones isolés (Matériels et méthodes). **a)** Injection de 10 U/mL de thrombine. **b)** Injection de 1 U/mL de thrombine. **c)** Injection de 0.1 U/mL de thrombine.

D'après ces résultats, même si une hétérogénéité au sein d'une même population de groupes de 3 hexagones est observée pour chaque condition expérimentale, il est possible de mettre en avant une tendance dans la réponse cellulaire mesurée par microscopie SPR dans chaque condition. L'injection d'une très forte concentration de la thrombine à 10 U/mL mène à une réponse très différente de celle observée dans un tissu endothélial confluent, avec un détachement des cellules du substrat de manière irréversible.

Comme il est difficile de comparer cette expérience aux autres conditions expérimentales, seules les expériences de contrôle où la thrombine n'a pas été injectée et les expériences où la thrombine a été injectée à 1 U/mL et 0.1 U/mL ont été comparées entre elles. Afin de mettre en évidence les différentes réponses, les médianes (calculées pour 6 groupes de 3 hexagones, comme observé dans la Figure 58) sont représentées et leurs quartiles figurés par les espaces colorés autour des courbes (Figure 59). Les médianes, ainsi que leurs quartiles supérieurs et inférieurs reflètent la distribution de 50 % des valeurs totales et séparent l'ensemble des données en deux. Ainsi la Figure 59 montre que les assemblages de 3 hexagones répondent bien différemment de la référence pour les injections de 0.1 U/mL et 1 U/mL de thrombine. Celles-ci induisent toutes les deux une décroissance du signal SPR qui correspond à un détachement partiel des cellules du substrat. Cependant, cette réponse est réversible, puisque les cellules reprennent leur morphologie initiale. Cependant, il faut être conscient que ces mesures ont été effectuées sur seulement 6 groupes de 3 hexagones pour 3 conditions expérimentales différentes, ce qui limite la significativité de ces



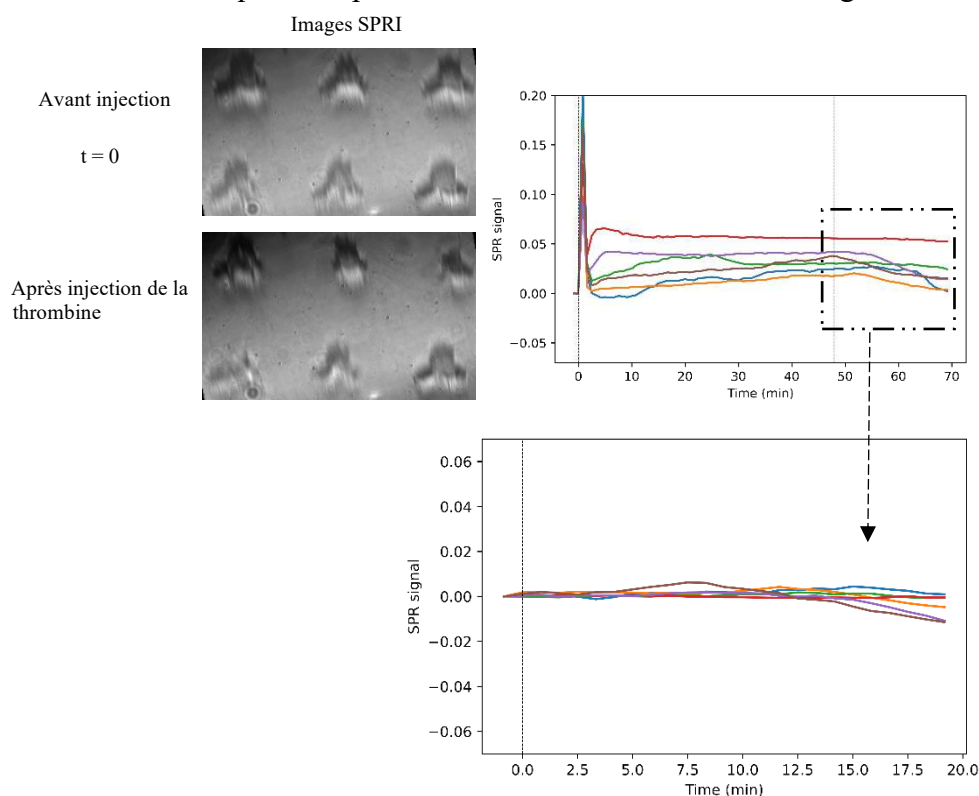
résultats. Ces résultats préliminaires permettent toutefois de montrer une tendance, mais nécessiteraient d'être répétés pour pouvoir être confirmés.

Figure 59: Graphique représentant les médianes et leurs quartiles figurés avec les espaces colorés autour des courbes après : En noir : Pas d'injection de thrombine ; En rouge : Injection de 0.1 U/mL de thrombine ; En vert : Injection de 1 U/mL de thrombine.

2- Contrôle négatif et antagoniste à la thrombine

Dans le but de confirmer le phénotype fonctionnel des groupes fabriqués dans les

assemblages de 3 cellules, 10 μM d'un antagoniste du récepteur PAR-1 appelé RWJ56110 (Tocris) a été injecté. Cet antagoniste se lie aux récepteurs de la thrombine, et par conséquent empêche la liaison de cette dernière à ces récepteurs. L'injection de l'antagoniste du récepteur PAR-1 est suivie par l'injection de 1 U/mL de thrombine (Figure 60). L'injection de l'antagoniste RWJ56110 induit une nette augmentation du signal SPR à cause du changement de l'indice de réfraction. Cependant, les cellules réussissent à se stabiliser au bout de quelques minutes et à reprendre leur morphologie initiale. Après injection de la thrombine à une concentration de 1 U/mL, la cinétique des cellules est mesurée pendant 20 min. Ce temps d'acquisition a été choisi par rapport aux expériences précédentes (Figure 58) où les cellules répondent dans les 10 minutes après injection de 1 U/mL. Après injection de la thrombine, les 6 groupes de 3 hexagones montrent un signal SPR faible et stable. Cette absence de signal SPR peut être corrélée à l'absence de réponses cellulaire à l'injection de la thrombine puisque tous les récepteurs de la thrombine sont déjà liés avec l'antagoniste. Cette expérience permet de démontrer que les réponses cellulaires mesurées dans la Figure 58 sont bien



induites par l'injection de la thrombine et l'activation du récepteur PAR-1.

*Figure 60: Injection de 10 μM de l'antagoniste des récepteurs PAR-1 appelés RWJ56110, suivie de l'injection de 1 U/mL de thrombine. Les images SPRI sont prises avant injection de l'antagoniste (haut) et après injection de la thrombine, à la fin de l'expérience (bas). Les courbes correspondent au signal SPR moyen des valeurs des pixels de chaque groupe de 3 hexagones. Dans le 1^{er} graphique, la normalisation est effectuée par rapport à l'injection de l'antagoniste, tandis que dans le 2^{ème} graphique, la normalisation est effectuée par rapport à l'injection de la thrombine (**matériels et méthodes**).*

Conclusion partielle : Dans cette partie de chapitre, le phénotype dynamique des cellules dans les groupes de 3 hexagones a été évalué en quantifiant leurs réponses après stimulation avec la thrombine. La réponse des cellules endothéliales à la thrombine est connue et bien référencée dans la littérature. Le but ici n'était pas de comprendre biologiquement ce qui se passe mais de vérifier si les cellules confinées dans les groupes de 3 hexagones et ayant formé des jonctions entre elles selon le protocole de microstructuration, répondent comme des cellules endothéliales dans un tissu confluent. Ainsi, les réponses cellulaires à la thrombine ont été évaluées par microscopie à contraste interférentiel différentiel, par microscopie à fluorescence et par imagerie SPR. L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre montrent que les cellules dans les groupes de 3 hexagones répondent à la stimulation par la thrombine, ce qui a permis de confirmer leur phénotype endothélial. De plus, la quantification des réponses cellulaires à différentes concentrations de la thrombine et en temps réel par SPR montre que cette réponse mesurée dépend de la concentration de thrombine injectée et qu'elle correspond à l'activation du récepteur PAR-1 par la thrombine.

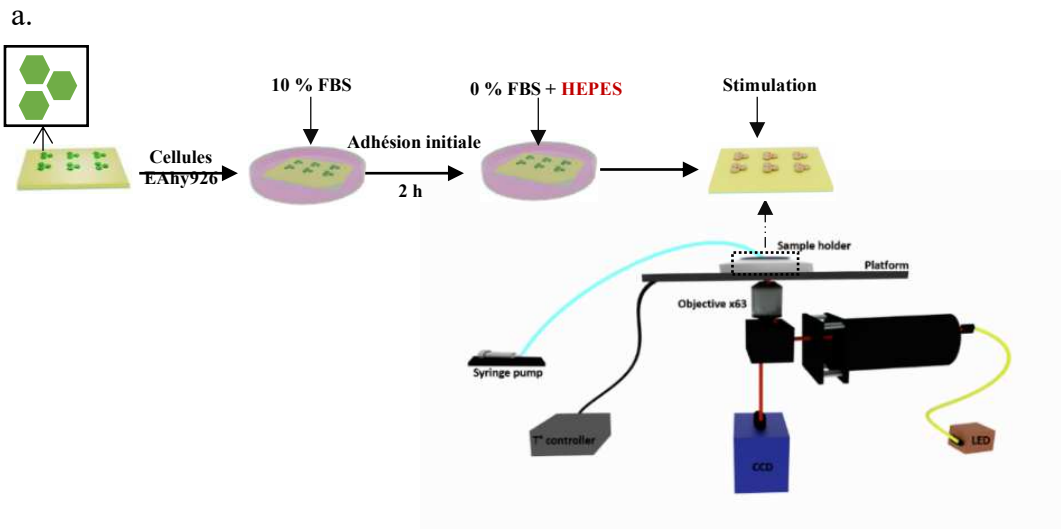
D- Stimulation par la thrombine des groupes de 3 hexagones après différents temps de formation de jonctions dans l'incubateur

Dans les résultats précédents, il a été démontré, grâce au marquage spécifique des VE-cadhérines, que les jonctions endothéliales se formaient après 24 h dans l'incubateur. Dans cette partie de section sont présentées les réponses cellulaires des groupes de 3 hexagones à la stimulation par une concentration de thrombine identique (10 U/mL), après 2 différents temps de formation de jonctions dans l'incubateur : directement après le temps initial d'adhésion de 2 h et après 24 h de temps de formation des jonctions dans l'incubateur.

1- Après 2 h de temps d'adhésion initiale dans l'incubateur

Il a été démontré dans les résultats précédents qu'après 2 h d'adhésion initiale dans l'incubateur, les cellules n'avaient pas encore formé de jonctions entre elles dans les assemblages à 3 hexagones. Cependant il est quand même intéressant de visualiser les réponses des cellules à l'injection de la thrombine, en absence de jonctions entre les cellules. Ainsi, après le temps d'adhésion initial, le milieu de culture cellulaire contenant 10% de FBS est changé et est remplacé par un milieu de culture réduit à 0 % de FBS avec de l'HEPES pour stabiliser le pH des cellules pour les expériences d'imagerie en vivant. Ensuite, les échantillons sont déposés sur le support du microscope SPR et après 30 minutes de stabilisation des cellules, 10 U/mL de

thrombine sont injectés (Figure 61 – a). Les cellules répondent environ 10 minutes après l’injection de la thrombine. Le signal SPR mesuré correspond à la moyenne des valeurs d’intensités des pixels de chacun des 6 groupes de 3 hexagones. Les 6 groupes montrent une baisse du signal, en même temps, suivie par un retour à des valeurs plus élevées au cours du temps. Cette baisse de signal correspond à quasiment le double de la valeur mesurée pour les cellules après 24 h d’adhésion dans l’incubateur. Cette évolution du signal est également observée sur les images SPR correspondant à un temps de 20 minutes après l’injection de la thrombine. Les cellules individuelles semblent se contracter, avant de se restabiliser et de reprendre la morphologie initiale du groupe de 3. Comme les images SPR informent sur l’adhésion des cellules au niveau des substrats, on peut en déduire que les cellules sont bien adhérentes au substrat et semblent répondre individuellement à l’injection de la thrombine (Figure 61 – b). Les cellules individuelles répondent plus à l’injection de la thrombine, ce qui mène à se poser des questions concernant la sensibilité de réponses des cellules aux stimuli, à deux échelles différentes : individuellement et à l’échelle d’une monocouche cellulaire.



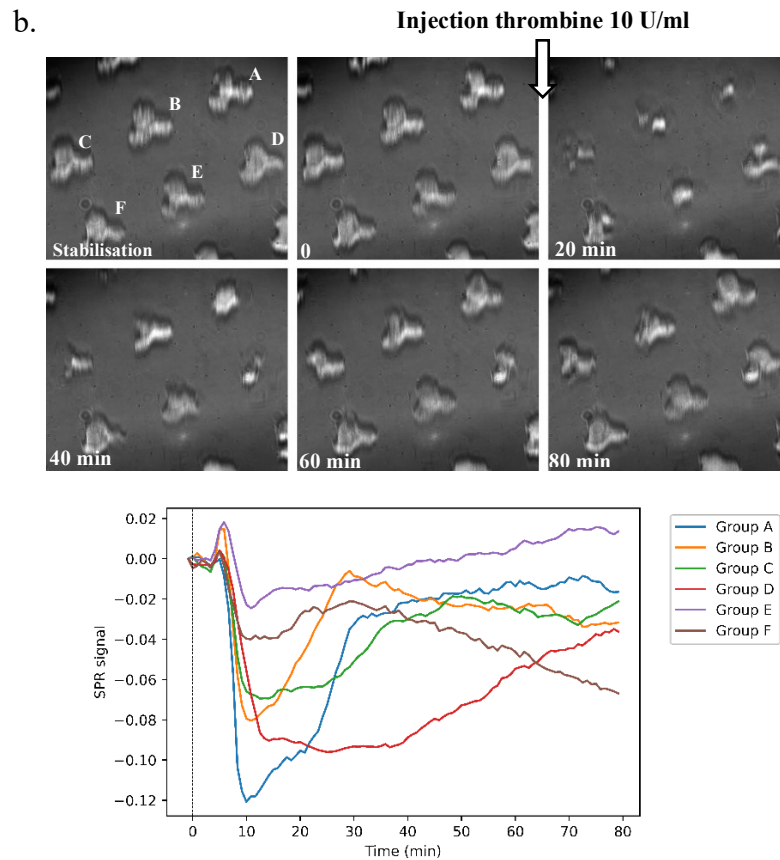


Figure 61: Cinétique des cellules dans les groupes de 3 hexagones après 2 h de temps d'adhésion initial dans l'incubateur. La thrombine est injectée après 30 minutes de stabilisation des cellules. **a)** Protocole expérimental et imagerie par microscopie SPR des groupes de 3 hexagones microstructurés sur des substrats d'or. **b)** Cinétiques après injection de 10 U/mL de thrombine. Les images SPR sont extraites de l'expérience de cinétique toutes les 20 minutes. Pour toutes ces expériences, le signal SPR moyen est représenté pour chaque groupe de 3 hexagones isolés (**Matériels et méthodes**).

2- Après 24 h de temps de formation des jonctions dans l'incubateur

Cette expérience est effectuée selon le protocole décrit dans la Figure 54, dans les mêmes conditions que la première expérience décrite dans la Figure 58. Dans ces conditions, les cellules ont formé des jonctions VE-cadhérines entre elles. Après injection de 10 U/mL de thrombine, les cellules dans les groupes de 3 hexagones répondent à la stimulation après 10 – 20 minutes. Les cellules répondent par groupe et mais ne se séparent pas. Le signal SPR correspondant à la moyenne des valeurs d'intensité des pixels de chaque groupe de 3 hexagones diminue jusqu'à atteindre un plateau (Figure 62). Il est intéressant de remarquer que la même réponse des cellules est observée que dans la 1^{ère} expérience de la Figure 58 et dans les résultats présentés ci-dessous. En effet, ces deux expériences indépendantes montrent des comportements cellulaires identiques, observés dans les images SPR, où les cellules tendent à se détacher du substrat, ce qui est en corrélation avec la baisse du signal SPR jusqu'à

atteindre un plateau où le signal n'évolue plus. La comparaison entre ces deux expériences indépendantes, effectuées dans les mêmes conditions expérimentales informe une fois de plus sur la robustesse de l'étude qui a été effectuée dans le cadre de ces travaux et de la reproductibilité des expériences. La réponse est significativement différente de celle observée dans la Figure 61 pour des cellules ayant adhéré 2 h dans l'incubateur.

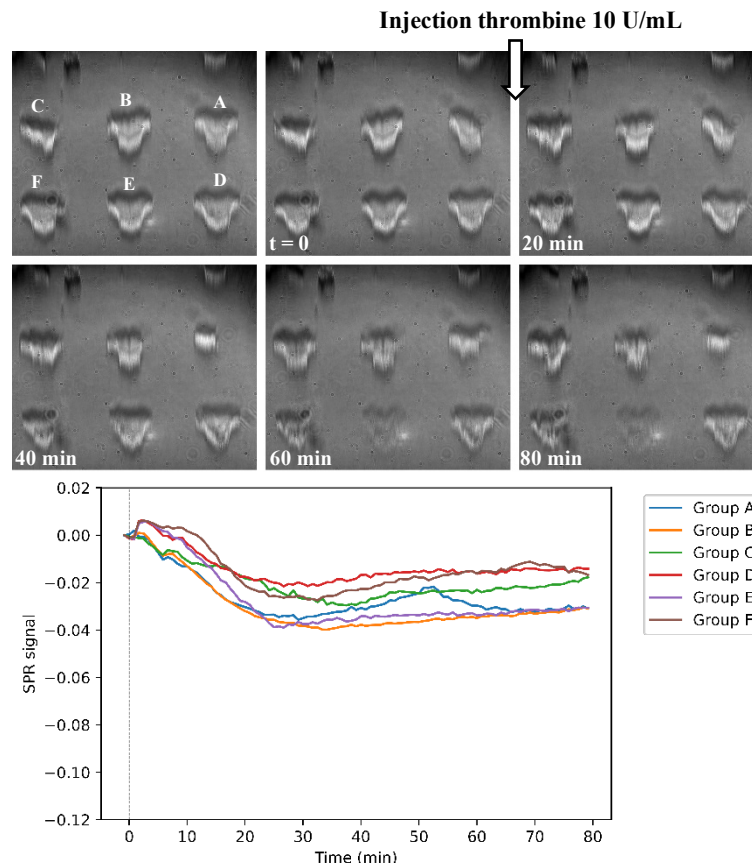


Figure 62 : Cinétique des cellules dans les groupes de 3 hexagones après 24 h de temps de formation des jonctions dans l'incubateur. à gauche : images SPR extraites de la cinétique des cellules toutes les 20 minutes. à droite : évolution du signal SPR au cours du temps pour chacun des 6 groupes de 3 hexagones.

Conclusion partielle : Dans cette partie, il a été démontré que le temps d'adhésion et de formation de jonctions dans l'incubateur joue un rôle crucial sur la réponse physiologique des cellules. En effet, les réponses des cellules dans les groupes de 3 hexagones ayant adhéré après 2 h dans d'incubateur semblent correspondre à des réponses de cellules individuelles à la thrombine, contrairement aux cellules observées après 24 h d'adhésion dans l'incubateur. Les cellules dans les groupes de 3 hexagones ayant adhéré 24 h dans l'incubateur montrent une réponse de groupe : tout le groupe se détache. Ceci peut être expliqué par la relation entre les jonctions VE-cadhérines et le cytosquelette des cellules, et par conséquent la modulation des cytosquelettes de toutes les cellules, les unes par rapport aux autres, après formation des

jonctions, et ce, suite à une stimulation.

III- Conclusion et discussion

Dans ce chapitre, le phénotype endothélial des modèles cellulaires a été évalué. Tout d'abord, le phénotype structurel endothélial des cellules dans les groupes de 3 hexagones de surface adhésive égale à $384 \mu\text{m}^2$ par hexagone a été validé. L'évaluation du phénotype endothélial structurel correspond à vérifier la présence de jonctions VE-cadhérines entre les cellules, spécifique à un tissu endothélial. Dans cette étude, les cellules établissent des contacts entre elles à des espacements strictement inférieurs à $7 \mu\text{m}$ entre les hexagones. En effet, dans des conditions expérimentales optimales de culture cellulaire (densité initiale de cellules déposées sur le substrat, pourcentage de facteurs de croissance dans le milieu de culture cellulaire, temps initial d'adhésion, temps de formation des jonctions), les cellules EAhy926 forment des jonctions entre elles pour des espacements de $3 \mu\text{m}$ à $6 \mu\text{m}$ entre les hexagones. Le marquage de ces jonctions avec un marqueur fluorescent spécifique confirme qu'il s'agit de jonctions VE-cadhérines. La superposition de plusieurs images de fluorescence de jonctions des cellules dans les groupes de 3 hexagones a démontré statistiquement la localisation et la formation de ces jonctions au niveau des espacements entre les hexagones correspondant à des régions non adhésives.

Ensuite, le phénotype dynamique endothélial des cellules dans ces groupes d'hexagones a été évalué. L'évaluation du phénotype dynamique endothélial a consisté à quantifier les réponses des cellules à l'injection de la thrombine, et à les comparer à celles référencées dans la littérature. En effet, la stimulation par la thrombine induit une contraction cellulaire, une rupture des jonctions intercellulaire et mène à l'apoptose cellulaire. Dans cette étude, le phénotype endothélial des cellules a été quantifié, après injection de la thrombine, en temps réel par microscopie à contraste interférentiel différentiel (CID), par microscopie à fluorescence en fixant les cellules et en marquant les noyaux et les jonctions après 1 h d'incubation dans la thrombine, et finalement en temps réel par imagerie SPR. L'ensemble de nos résultats présentés dans ce chapitre ont montré que les cellules dans les assemblages à 3 hexagones répondent à l'injection de la thrombine, en se contractant, en ayant une granulosité plus élevée et dans certains cas, en formant des bourgeonnements au niveau des terminaisons membranaires, principalement visibles par microscopie à CID et par microscopie à fluorescence.

La mesure par imagerie SPR, en temps réel, a permis d'évaluer l'adhésion, la contraction cellulaire ou le détachement des cellules du substrat. Ainsi, ces travaux démontrent que les cellules répondent différemment aux différentes concentrations de thrombine injectées, ce qui met en avant la sensibilité de mesure du biocapteur développé. De plus, les réponses cellulaires mesurées correspondent bien à l'activation du récepteur PAR-1 à la thrombine, comme référencé dans la littérature pour les cellules endothéliales dans des tissus confluent. Et finalement, le temps d'incubation pour l'adhésion et la formation de jonctions jouent un rôle crucial dans la réponse physiologique cellulaire, et cela semble dépendre de la modulation du cytosquelette des cellules dans des conditions expérimentales où elles ont formé des jonctions entre elles,

ou pas. L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre confirment le phénotype endothélial, structurel et dynamique, des monocouches cellulaires fabriquées dans les groupes de 3 hexagones. Ainsi, ces travaux justifient l'utilisation des groupes de cellules dans les assemblages à 3 hexagones comme modèle cellulaire endothélial *in vitro*.

SECTION 3 : MATERIELS ET METHODES

I- Problématique des études d'imagerie en vivant

A- Paramètres cellulaires

La problématique principale pour l'imagerie de cellules vivantes est de les maintenir dans un environnement physiologique optimal. Ainsi, les cellules doivent non seulement être vivantes, mais doivent également demeurer dans état métabolique stable. De ce fait, afin de pouvoir faire des expériences au cours du temps, il est important d'identifier les paramètres expérimentaux importants qui pourraient impacter la fonction métabolique des cellules. Ces paramètres correspondent à ceux pris en compte pour les cultures cellulaires de boîtes de pétri *in vitro* où plusieurs paramètres sont contrôlés :

- Température : maintenue à 37°.
- Nutriments : Ajout de facteurs de croissance (FBS) dans les milieux de culture.
- pH : Réglé par le contrôle de la concentration de CO₂ (5 % généralement) et une humidification de l'air grâce à un réservoir d'eau, tel que :



Le contrôle du pH des milieux de culture est un paramètre important pour le maintien des conditions expérimentales assurant les fonctions cellulaires. Or dans les conditions d'incubateur, les niveaux de CO₂ sont élevés (5 %) comparés aux niveaux de CO₂ mesurés dans les laboratoires (< 1 %). Ainsi les cellules vivantes vont être très impactées à leur sortie de l'incubateur à cause des changements de pH et de températures. On va utiliser typiquement le phénol rouge comme indicateur du pH des

milieux de culture, sa couleur informant sur le pH de ce dernier (Figure 63).



Figure 63: Le phénol rouge est utilisé comme un indicateur de pH. La couleur du milieu de culture informe sur la physiologie des cellules et les solutions à adopter.

B- Acquisition des cellules en temps réel dans différentes conditions

Problématique principale : Les études de cinétique permettant d'évaluer par imagerie SPR les réponses cellulaires des groupes de 3 hexagones à la stimulation par la thrombine sont effectuées avec un système d'imagerie SPR où seule la température est contrôlée. Il est donc important de choisir le meilleur tampon pour compenser le changement de pH et le taux de nutriments dans le milieu de culture cellulaire entre la sortie des cellules de l'incubateur et leur mise en place dans le système d'imagerie. Il s'agit de l'étape critique expérimentale où il faut maintenir les cellules dans un état métabolique stable et réduire les stress subits afin qu'elles se restabilisent rapidement.

1- Conditions expérimentales d'un incubateur cellulaire : T°, CO₂ et humidité contrôlés

Les réponses cellulaires induites par l'injection de la thrombine (1 U/ml) des groupes de 3 hexagones présentés dans la Figure 53, lorsque les cellules sont dans des conditions d'incubateur, ont été mesurées avec un microscope à contraste interférentiel disposant d'une chambre environnementale (Solent scientifique) avec un contrôleur de température, de CO₂ et d'humidité (Figure 64). Ainsi, les acquisitions sont effectuées dans des conditions d'incubateur où tous les paramètres expérimentaux sont contrôlés. Ces observations effectuées dans ces conditions expérimentales optimales et qui correspondent à celle d'un incubateur cellulaire informent sur les réponses cellulaires attendues pour les expériences de cinétique avec le système d'imagerie SPR.



Figure 64: Microscope à contraste interférentiel contenant une chambre environnementale pour les études de cellules vivantes (LSM Olympus FV1000 spectral)

2- Conditions expérimentales du système d'imagerie SPR : T° contrôlée (sans entrée de CO₂)

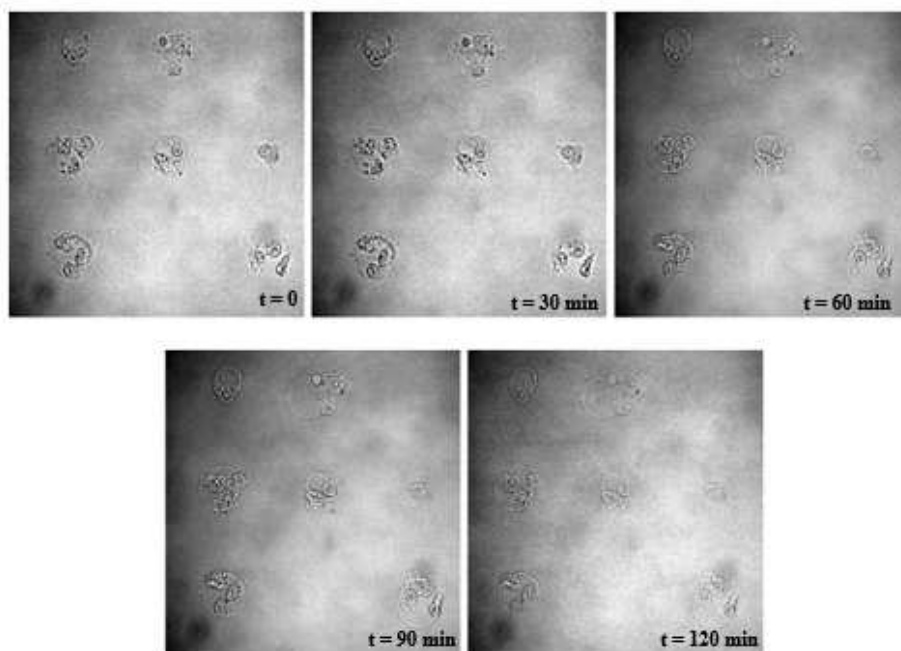
Dans le but de contrôler la température dans le système d'imagerie SPR, une chambre microfluidique a été fabriquée afin de stabiliser le substrat d'or et de l'immerger dans du milieu de culture contenant des nutriments. De plus, cette chambre microfluidique est déposée sur un support dont la température est contrôlée. De cette manière, les cellules sont maintenues à 37° pendant la durée des expériences de cinétique. Concernant les pourcentages de facteurs de croissance et le pH du milieu de culture, et puisqu'il n'y a pas de chambre environnementale pour le système d'imagerie SPR, différents types de tampons ont été évalués afin d'identifier les conditions optimales pour maintenir le pH des cellules vivantes adhérant sur les substrats d'or. Des tests ont été effectués avec du milieu L15 LEIBOVITZ qui est tamponné par des phosphates et des amino-acides de base libre au lieu du bicarbonate de sodium et qui est supplémenté par des facteurs de croissance. Ce milieu permet de favoriser la croissance de cellules dans des environnement où les niveaux de CO₂ ne sont pas équilibrés. D'autres tests ont également été effectués avec du milieu DMEM contenant 10 µM d'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique). L'HEPES est un tampon zwitterionique référencé dans la littérature comme étant un tampon très efficace pour le maintien du pH physiologique pour les études d'imagerie en vivant pour une durée de 3 h à 4 h¹²⁰.

a- Tampon L-15

Des tests ont été effectués avec le tampon L-15 afin de vérifier s'il est bien adapté aux expériences dans les conditions expérimentales du système d'imagerie SPR qui ne contient pas de chambre environnementale avec une entrée de CO₂. Les échantillons ont été déposés dans des boîtes de pétri transparentes après un temps de formation de jonctions de 24 h dans l'incubateur et des acquisitions cinétiques ont été effectuées en utilisant le microscope à contraste interférentiel décrit dans la Figure 64. Seul le

contrôleur de température a été allumé afin de mimer les conditions expérimentales du système d'imagerie SPR. Dans ces conditions expérimentales, les cellules ont une morphologie représentative d'un état métabolique non stable. Elles présentent une granulosité élevée avec des trous dans les groupes de 3 hexagones correspondant à des pertes de l'adhésion cellulaire. Ces cellules subissent un stress lié au changement de pH mais n'arrivent pas à se stabiliser au cours du temps. Le tampon L-15 ne permet pas de compenser ce stress (Figure 65 – a). De même, la même expérience est effectuée avec le système d'imagerie SPR où les images BF sont prises au début et à la fin après 2 h d'expérience. Après 30 minutes de stabilisation des cellules, 1 U/ml de thrombine est injectée. Cependant l'injection de la thrombine n'impacte pas les cellules. Les cellules ont la même morphologie que ce soit dans les images BF ou les images SPR avant et après injection de la thrombine (Figure 65 – b). Ceci peut être corrélé avec le niveau de stress des cellules. En effet, moins les cellules sont dans un état métabolique stable, moins elles sont sensibles à la stimulation par la thrombine. Ainsi, le tampon L-15 ne semble pas être adapté à cette étude car il ne stabilise pas les cellules par suite du stress liés au changement de pH subits à la sortie de l'incubateur.

a.



b.

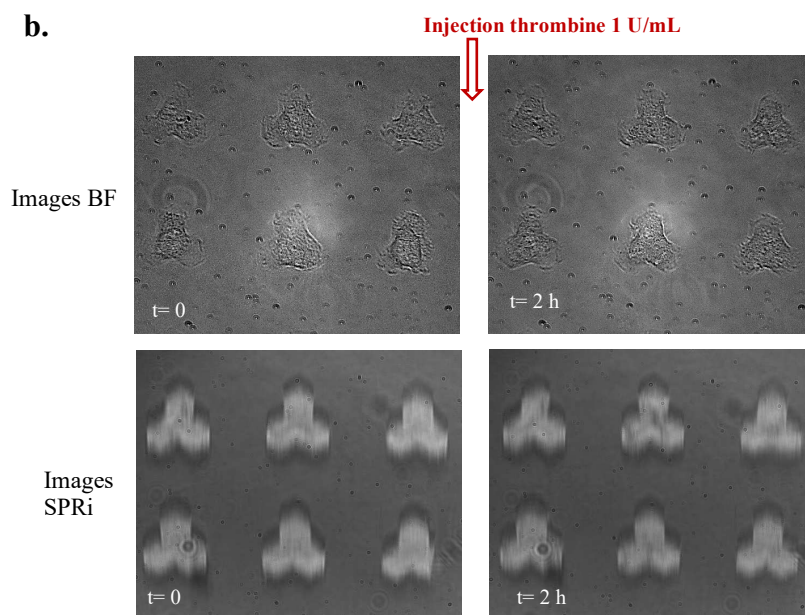


Figure 65: Cinétique des réponses des cellules dans les groupes de 3 hexagones dans un milieu de culture contenant le tampon L-15. **a)** Images obtenues en microscopie DIC des cellules dans les groupes de 3 hexagones au cours du temps. **b)** Images en BF prises simultanément que les images SPR des cellules dans les groupes de 3 hexagones au cours du temps.

b- Tampon HEPES

D'autres tests ont été effectués avec un autre tampon appelé HEPES. Ce tampon est ajouté directement dans le milieu de culture lorsque ce dernier est changé et réduit à 0 % de FBS après un temps initial d'adhésion de 2 h (Figure 54). Après un temps de formation des jonctions de 24 h, les échantillons sont observés par microscopie à CID dans les conditions expérimentales du système d'imagerie SPR où seule la température est contrôlée. Les expériences de cinétique au cours du temps montrent des cellules dans les groupes de 3 hexagones bien adhérentes au substrat (groupes A et B, car les autres présentent des débris cellulaires) (Figure 66). Après 2 h de stabilisation des cellules dans un milieu de culture contenant de l'HEPES, 1 U/ml de thrombine est injectée afin de vérifier si les cellules sont vivantes et si elles répondent à la stimulation par la thrombine. Les cellules dans les groupes A et B se contractent avec apparition de bourgeons cellulaires sur les contours. Cette réponse correspond à celle observée dans des conditions expérimentales optimales avec une chambre environnementale où tous les paramètres sont contrôlés (Figure 53). L'ajout de l'HEPES dans le milieu de culture permet donc d'effectuer des expériences de cinétiques de 3 h à 4 h où les cellules présentent les mêmes réponses cellulaires que lorsqu'elles sont des conditions optimales d'incubateur. C'est donc le tampon qui a été sélectionné pour toutes les expériences de SPRI avec l'HEPES afin de stabiliser les cellules et de réduire le stress lié à leur sortie de l'incubateur.

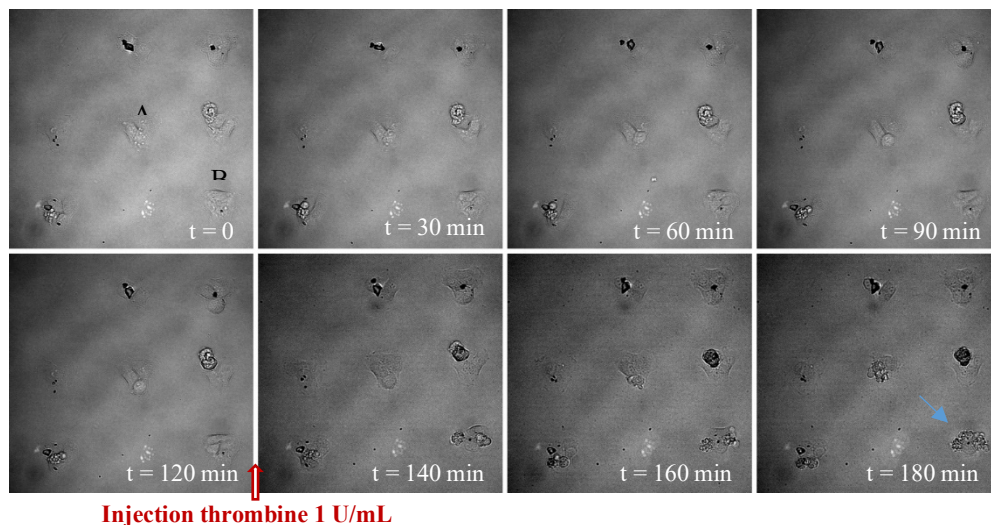


Figure 66: Cinétique des cellules dans les groupes de 3 hexagones dans un milieu de culture contenant de l'HEPES. Les images ont été obtenues par microscopie DIC des cellules dans les groupes de 3 hexagones au cours du temps.

3- Conditions expérimentales où T° n'est pas contrôlée dans le système d'imagerie SPR (sans entrée de CO₂)

Afin de vérifier que le contrôle de température est bien réalisé et que les cellules sont

maintenues à une T° de 37° , le contrôleur du support échantillon et de l'objectif est débranché. Lorsque ce contrôleur est éteint, les cellules dans les images BF ne semblent pas bien adhérentes et sont granuleuses. De plus lorsque 1 U/mL de thrombine est injecté, les cellules ne répondent pas et ont la même morphologie avant et après injection. Les images SPR montrent également que les cellules ne sont pas bien adhérentes car le contraste est faible (Figure 67).

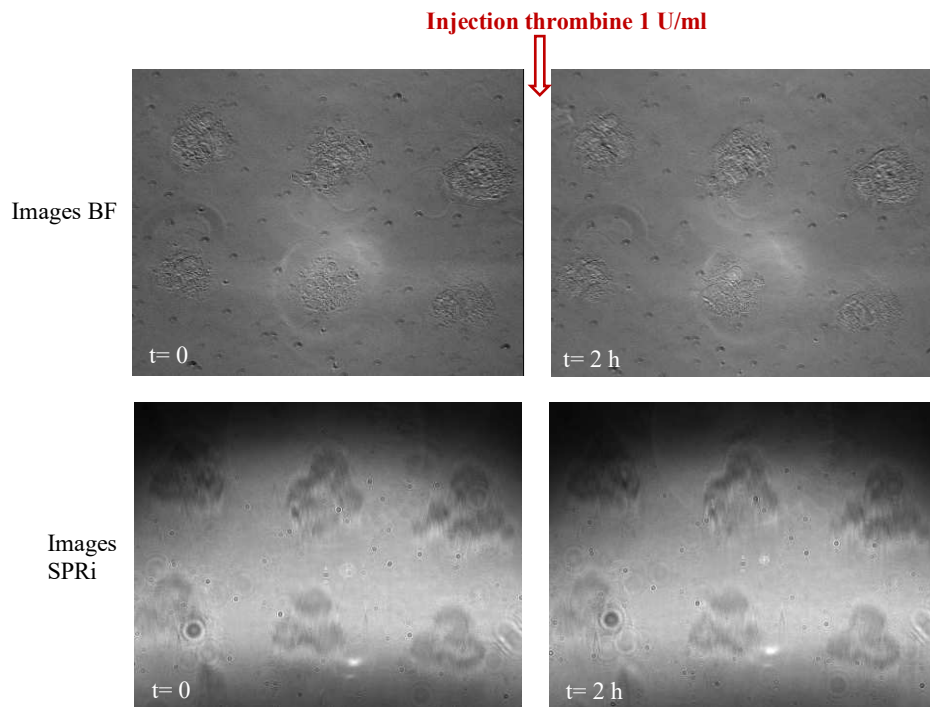


Figure 67: Cinétique des cellules dans les groupes de 3 hexagones dans un milieu de culture contenant de l'HEPES mais sans contrôle de la T° . Les images en BF ont été prises simultanément que les images SPR des cellules dans les groupes de 3 hexagones au cours du temps.

Conclusion partielle : L'ensemble de ces expériences présentées dans cette section permettent de montrer l'importance des choix des paramètres expérimentaux pour l'imagerie de cellules vivantes. Ainsi, le choix de travail se porte sur un tampon HEPES ajouté directement dans le milieu de culture et le maintien de la température à 37° . Le contrôle de ces paramètres permet de réduire le stress subi par les cellules à leur sortie de l'incubateur et de pouvoir les imager et mesurer leurs réponses cellulaires par imagerie SPR à des stimulations par la thrombine. Il est également important de connaître la morphologie des cellules, que ce soit en BF ou en SPR, dans des conditions expérimentales inadaptées où les cellules ne répondent pas afin de détecter, pour les expériences en SPR si l'expérience a fonctionné ou pas et s'il est intéressant de la quantifier.

II- Imagerie par microscopie SPR

A- Instrumentation d'imagerie SPR

Le système d'imagerie SPR est détaillé dans d'autres travaux de l'équipe¹¹³. Brièvement, le microscope SPR consiste en une source LED d'une longueur d'onde de 740 nm collimatée et filtrée avant d'être polarisée. Le polariseur est placé à la sortie de la fibre optique et permet de choisir entre deux polarisations orthogonales : la 1^{ère} en transmission magnétique (TM) permet d'obtenir les images plasmonique. La polarisation en transmission électrique (TE) permet de corriger les inhomogénéités d'éclairage. Le faisceau est ensuite focalisé au niveau du plan focal arrière de l'objectif à forte ouverture numérique (63X, NA = 1.46, Zeiss) qui envoie de la lumière sur le substrat SPR. La lumière réfléchie par l'échantillon repasse à travers la l'objectif et converge au niveau du plan focal arrière de l'objectif, avant d'être redirigée puis focalisée sur la caméra CMOS (Figure 68). Les chemins optiques ainsi que l'optimisation du système SPR sont détaillés en Annexe 3.

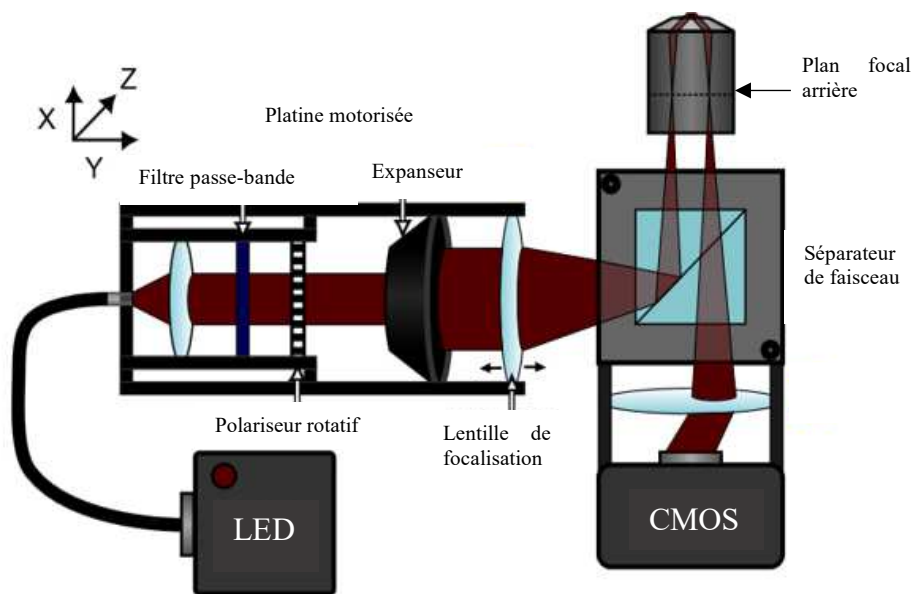


Figure 68: Schéma du système d'imagerie SPR utilisé pour les études de cinétiques en temps réel.

B- Paramètres de couplage en microscopie SPR

L'imagerie SPR nécessite les bons paramètres de couplage pour obtenir la résonance des plasmons de surface. Parmi les paramètres de couplage il y a la longueur d'onde incidente et l'angle de résonance. Il y a un compromis à trouver entre obtenir des images de bonnes résolutions et la sensibilité de la mesure SPR. En effet, la sensibilité en réflectivité augmente en fonction des longueurs d'onde comme le montre la nappe angulo-spectrale de la Figure 69 pour un échantillon d'or plan de 30 nm d'épaisseur à l'interface or/eau. On voit que le facteur de qualité de la résonance plasmonique augmente avec la longueur d'onde. En conséquence, pour un même déplacement de la résonance, le signal de variation de réflectivité sera plus important pour des longueurs d'onde plus grandes.

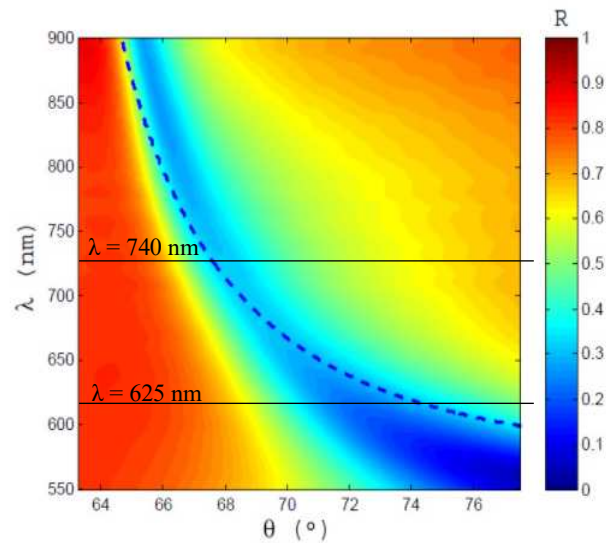


Figure 69: Nappe angulo-spectrale expérimentale d'un échantillon d'or plan de 30nm d'épaisseur et en pointillés la courbe simulée du plasmon de surface à l'interface or/eau [Figure extraite de la thèse de JF Bryche].

D'autre part, la longueur de propagation limite la résolution spatiale des techniques d'imagerie SPR dans la direction de propagation. La longueur de propagation augmente en fonction de la longueur d'onde de la lumière d'excitation. Elle s'exprime dans les images SPR par un flou dans la direction de propagation des plasmons. La résolution spatiale s'améliore à des longueurs d'onde plus faibles (Figure 70).

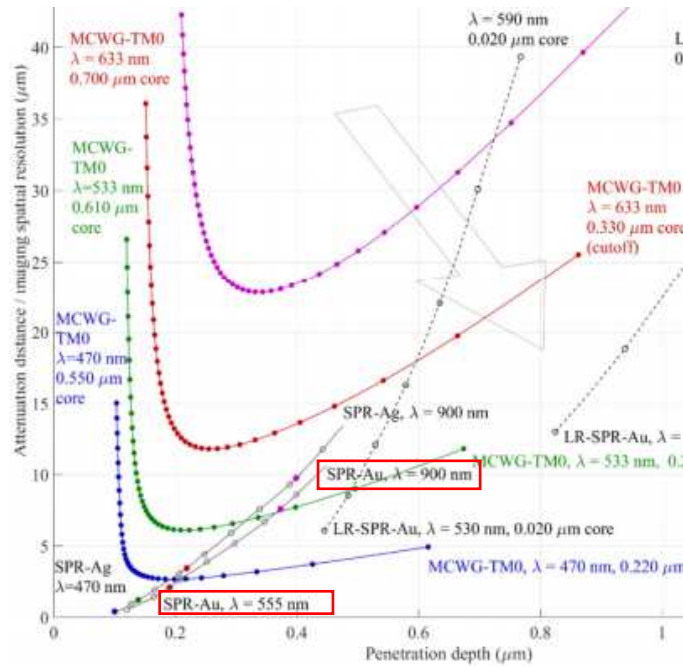


Figure 70: Résolution spatiale (μm) en fonction de la profondeur de pénétration (μm). La courbe contenant les informations nécessaires est la courbe SPR-Au dans l'eau pour différentes longueurs d'onde allant de 555 nm à 900 nm¹¹³.

Ainsi, il y a un compromis à trouver entre la sensibilité et la résolution spatiale. La longueur d'onde de travail est égale à 740 nm. Avant chaque expérience, un balayage angulaire est effectué afin de sélectionner l'angle optimal de résonance. Cet angle correspond au maximum de la pente de la résonance. La difficulté est que les différentes régions de la puce ont des résonances dont la position est très différente, en particulier entre les groupes de cellules et les zones passivées. Le balayage angulaire permet de visualiser ces inhomogénéités de résonance. L'angle optimal de résonance est sélectionné au niveau des courbes des groupes de cellules, au niveau de la région décroissante de la courbe. Cette plage angulaire est représentée par les deux traits noirs pointillés dans la Figure 71. Cette plage contient l'angle de résonance optimal qui est sélectionné avant de procéder aux expériences de cinétique de cellules vivantes par imagerie SPR.

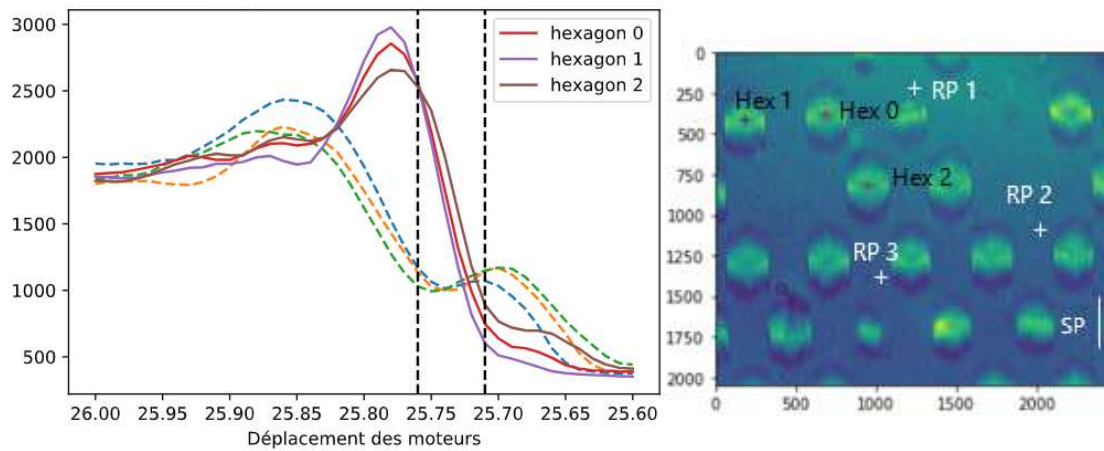


Figure 71: Balayage angulaire d'une lame d'or microstructurée selon des hexagones de 30 μm de diamètre, espacés par des régions passivées (RP) de 25 μm . a) Signal SPR en fonction des différents angles de résonance définis par le déplacement des moteurs du système d'imagerie SPR. Ici sont représentées des courbes correspondant à des régions de la lame au niveau des microstructure (traits pleins) ou au niveau des régions passivées (traits pointillés). b) Images SPR avec les régions d'intérêts sélectionnées dans les microstructures (Hex0, Hex1 et Hex2) ou dans les régions passivées (RP1, RP2 et RP3). Les traits en pointillés noirs dans (a) délimitent la plage angulaire qui contient l'angle de résonance optimal (la direction de propagation est montrée par la barre SP).

Pour chaque expérience en SPRI les réglages suivants sont effectués :

- 1- Prendre des images SPR des cellules. Vérifier l'image en FFT (Fast Fourier transform) afin de vérifier le focus des images (Plugin sur Image J).

En effet, il est possible de retrouver le focus des cellules à partir des patrons de diffraction de quelques poussières à la surface¹²¹. Le focus est atteint lorsque ces patrons ont une forme en X et que leur image en FFT correspond à deux demi-arcs de cercle (Figure 72).

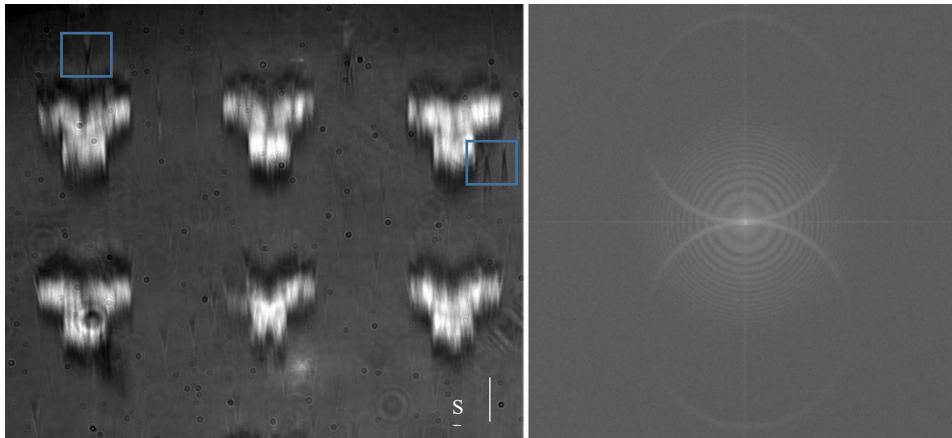


Figure 72: Vérification du focus des cellules dans les groupes de 3 hexagones pour les expériences de cinétique. à gauche : Image SPR des cellules dans les groupes de 3 hexagones (hexagones : $d = 30 \mu\text{m}$ et $e = 3 \mu\text{m}$). à droite : image en FFT correspondant à l'image SPR de gauche. Les carrés bleus montrent des patrons de diffractions permettant d'atteindre le focus.

- 2- Faire un balayage angulaire et choisir l'angle de travail θ_{res} qui offre le meilleur compromis.
- 3- Revérifiez le focus par FFT pour l'angle θ_{res} sélectionné
- 4- Choisir le temps d'exposition de façon à ce que la plage dynamique des valeurs des pixels ne sature pas.
- 5- Attendre la stabilisation des cellules pendant 30 minutes (vérification en vidéo de la dynamique des cellules)
- 6- Lancement des expériences de cinétique en SPRI.

C- Performances du biocapteur SPR

- Sensibilité

La sensibilité d'un biocapteur SPR se définit par la variation de réflectivité (ΔR) qui traduit un décalage de résonance, déclenchée par une variation de l'indice de réfraction (Δn). Elle s'exprime en pourcentage d'unité d'indice de réfraction (%/RIU) de $\frac{\Delta R}{\Delta n}$ et vaut typiquement entre 5000 % et 10 000 % en RIU selon la longueur d'onde choisie. Ainsi, la sensibilité peut être mesurée en effectuant des expériences de saut d'indice avec des indices de réfraction connus. Dans le cas des études sur les cellules vivantes, une variation de l'indice moyen est mesurée en fonction des mouvements des cellules

au niveau de leur accroche sur le substrat dans la profondeur de pénétration de l'onde évanescente.

- Résolution SPR : limite de détection

La résolution d'un capteur SPR se définit comme étant le plus petit changement d'indice de réfraction détectable et mesurable. Elle dépend de la sensibilité et des bruits du système, essentiellement le bruit de photon et les bruits thermiques liés aux fluctuations de T° impactant les indices optiques des matériaux et de l'eau. La limite de détection en imagerie SPR est de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-6} RIU.

- Profondeur de pénétration

La profondeur de pénétration du mode plasmonique dans le milieu biologique est de quelques centaines de nanomètres. Dans ce cas d'étude, les cellules imagées font environ $10.5\ \mu\text{m}$ d'épaisseur. Idéalement, on aurait aimé évaluer l'impact des différentes stimulations sur les jonctions intercellulaires. Cependant ces dernières sont formées entre $3\ \mu\text{m}$ et $7\ \mu\text{m}$ de profondeur. L'imagerie SPR ne permet pas d'évaluer que les événements ayant lieu à la surface des substrats d'or (jusqu'à environ $200\ \text{nm}$). Ainsi, l'imagerie SPR ne permet pas d'avoir plus d'information sur les différentes réponses cellulaires à part au niveau de l'adhésion au substrat. A l'échelle des interactions substrat/cellule, la SPRI permet de convertir un événement biologique en un signal mesurable et quantifiable. Ce signal correspond à une variation de réflectivité corrélée avec des événements cellulaires au cours du temps, dans des conditions où le milieu physiologique des cellules n'a pas été modifié. Afin d'atteindre une meilleure profondeur de pénétration, la SPRI pourrait être combinée avec d'autres techniques : que ce soit dans le développement de nouveaux outils de traitement du signal des images SPR ou dans la combinaison de la SPRI avec la nanostructuration des substrats dans un but d'optimiser les paramètres de résolution et de profondeur de pénétration. Cette section sera discutée dans le chapitre 5 – section 2.

- Résolution temporelle

Les mesures cinétiques sont effectuées sur environ 2 heures, avec une image acquise toutes les 5 secondes. Pour les expériences où la thrombine est injectée, les cellules sont stabilisées pendant 30 et 45 minutes avant injection de différentes concentrations de thrombine. Ensuite les réponses des cellules sont quantifiées pendant 1 heure. Ces paramètres temporels sont suffisants pour quantifier les mécanismes cellulaires d'une durée de quelques dizaines de secondes.

III- Acquisition et traitement des données des groupes de 3 hexagones

Selon la polarisation sélectionnée, la caméra permet de visualiser les images en mode TM correspondant aux images SPR contenant les informations des cellules, ou en mode TE qui sert de normalisation vis-à-vis de l'inhomogénéité de l'éclairage. Il faudrait vérifier que les variations des images TE entre les différentes expériences effectuées avec le même système sont faibles. De plus, en utilisant la même caméra, il est également possible de capturer les images en BF au début et à la fin de chaque expérience.

Les graphiques représentés dans ce chapitre dans les sections C et D ont été acquises toutes les 5 secondes sur des cinétiques de 2 heures. Pour chaque expérience de cinétique, chaque image en TM au cours du temps est divisée par l'image en TE (images TM/TE) (Figure 73 – 1). Ensuite, les régions d'intérêts (ROI) sont sélectionnées dans les régions passivées autour de chaque groupe de 3 hexagones des images TM/TE et calculons la valeur d'intensité moyenne de ces pixels au cours du temps. De même, des ROIs sur les images TM/TE correspondant à des carrés de 550 pixels de côté sont sélectionnées où chacun des groupes de 3 hexagones est recadré et centré. Dans ces ROI de 550 par 550 pixels, environ 75 % de ces pixels contiennent l'information des groupes de 3 hexagones et le reste correspond à des régions passivées. La valeur d'intensité moyenne de ces ROIs carrées contenant les cellules est calculée au cours du temps. Ensuite, à ces valeurs est soustraite la valeur moyenne des régions passivées entourant chacun des groupes de 3 hexagones calculée précédemment (Figure 73 – 2). La division par les images en TE et la soustraction des valeurs des régions passivées (dans le background) entourant les ROIs contenant les cellules permettent de normaliser le signal SPR et de prendre en compte les variations liées à l'inhomogénéité de la lumière sur la partie de la lame imagée, ainsi que certaines des variations locales liées à l'expérience. Une série de valeurs moyennes de pixels des groupes de 3 hexagones contenant les cellules au cours du temps est alors obtenue. Finalement, à chacune de ces valeurs moyennes au cours du temps, est soustraite la première valeur correspondant à un temps où les cellules ont été stabilisées avant stimulation (Figure 73 – 3). Ces valeurs moyennes sont représentées dans les graphiques de cinétique montrant l'évolution du signal SPR au cours du temps.

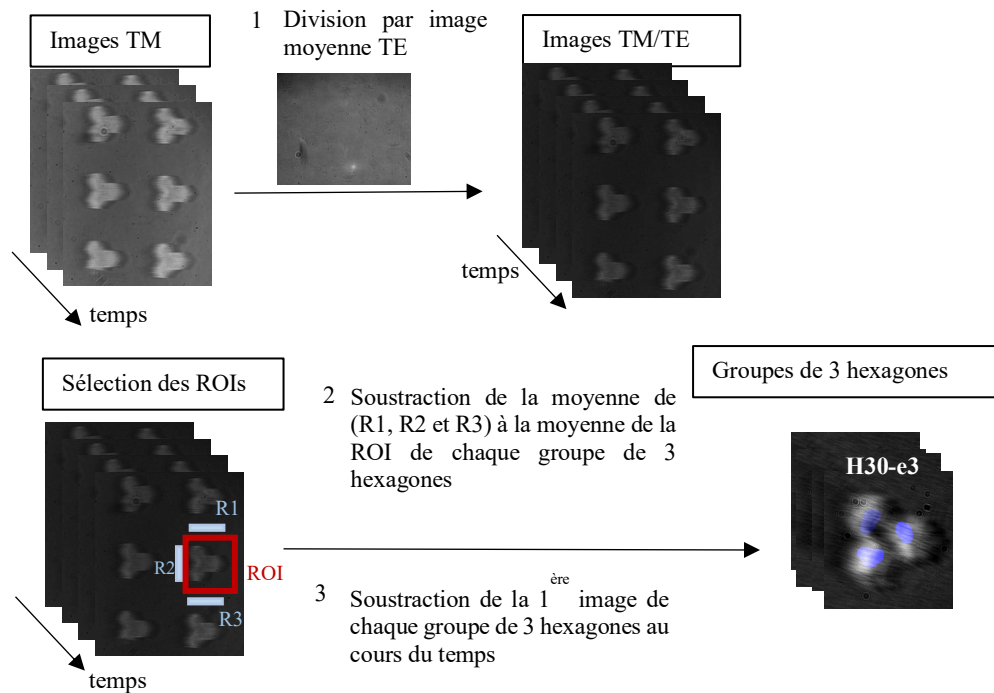


Figure 73: Les différentes étapes de traitement des images SPR pour générer les graphiques de l'évolution du signal SPR au cours du temps. 1) Division des images TM au cours du temps par l'image moyenne en TE. 2) Sélection de ROIs dans les régions passivées autour des groupes de 3 hexagones (R1, R2 et R3) et pour isoler et centrer chaque groupe de 3 hexagones (ex : ROI rouge). On soustrait la valeur moyenne de la ROI (rouge) la valeur moyenne des régions R1, R2 et R3 au cours du temps. 3) On soustrait la 1^{ère} image à toutes les images au cours du temps afin de normaliser le signal. Idéalement, 4 ROIs sont choisies dans les régions passivées autour des groupes de 3 hexagones (carrés bleus) afin de calculer une moyenne à soustraire à la ROI rouge.

CHAPITRE 5 : PERSPECTIVES ET CONCLUSION

PERSPECTIVES

Dans ces travaux de thèse, et dans un cadre d'imagerie plasmonique, la stratégie de fabriquer un modèle cellulaire *in vitro* a été validée, et ce en contrôlant l'adhésion et l'autoassemblage de cellules endothéliales individuelles dans des assemblages à 3 hexagones sur des substrats d'or. Un protocole de microstructuration a été développé combinant des techniques de chimie de surface et d'illumination UV permettant de contrôler l'adhésion de cellules endothéliales selon des géométries définies. Le choix s'est porté sur des géométries hexagonales et les paramètres de confinement d'une cellule individuelle par hexagone ont été étudiés. Ensuite, les paramètres d'espacements entre les hexagones ont été variés afin d'induire de la connectivité entre les cellules via des jonctions endothéliales composées de VE-cadhérines. Par la suite, le phénotype endothélial dynamique de l'assemblage à 3 hexagones a été évalué par imagerie SPR grâce à des stimulations avec la thrombine. L'ensemble de ces travaux ont permis de valider la fabrication d'une brique unitaire d'une couche de cellules endothéliales *in vitro* dans un assemblage à 3 hexagones.

Dans ce chapitre de perspectives, il s'agit d'ouvrir la porte sur de futurs travaux de l'équipe, soit en se basant sur des résultats préliminaires obtenus, soit en se basant sur des résultats récents publiés dans la littérature.

Ainsi, selon la même stratégie que pour les groupes de 3 hexagones, il est nécessaire d'augmenter le nombre des hexagones dans les assemblages afin de se rapprocher d'un modèle cellulaire plus complet contenant plus que 3 cellules. En effet, l'assemblage à 3 hexagones permet de faire une première preuve de concept, mais le nombre des hexagones ne suffit pas pour parler d'un modèle endothélial comparable à un endothélium *in vivo*. De plus, dans cet assemblage à 3, chaque hexagone a 2 hexagones voisins, ce qui ne correspond pas à la représentation idéale d'une monocouche cellulaire endothéliale, même *in vitro*. Alors se pose la question suivante : à partir de combien d'hexagones un endothélium est-il fabriqué sur des biopuces plasmoniques microstructurées ?

Tout d'abord, des tests avec des assemblages à 7 hexagones contenant un hexagone central entouré de 6 hexagones ont été effectués. Il s'agit de résultats préliminaires qui ouvrent la porte à de futurs travaux de l'équipe et qui sont décrits plus en détails dans les annexes – section 5 - I-. La même stratégie que pour les groupes de 3 hexagones a été suivie : **1** – identifier les paramètres de confinement des cellules endothéliales EAhy926 dans les assemblages à 7 hexagones. **2** – Identifier les paramètres de connectivité des cellules entre elles et leur capacité à former des jonctions endothéliales. **3** – évaluer le phénotype fonctionnel endothélial des cellules dans les assemblages à 7 par imagerie SPR après injection de la thrombine. Les premiers résultats obtenus mettent en avant une faible probabilité d'obtention de exactement une cellule par microstructure dans les assemblages à 7, pour tous les espacements entre 0 μm et 7 μm , identifiés, dans

les résultats précédents, comme des espacements où les cellules forment des jonctions entre elles. Il est plus difficile de contrôler le confinement des cellules dans les groupes de 7 hexagones, car dans certains cas, soit un plus grand nombre de cellules que d'hexagones est observé, probablement à cause de divisions cellulaires, soit des groupes incomplets avec des hexagones vides sont observés. Bien que les cellules dans les groupes de 7 hexagones forment des jonctions entre elles, il faudrait réussir à optimiser toutes les conditions expérimentales afin d'observer le confinement de exactement une cellule endothéliale par hexagone dans les assemblages à 7.

En plus d'optimiser tous les paramètres de culture cellulaire (densité initiale de cellules, pourcentage des facteurs de croissance dans le milieu de culture, temps initial d'adhésion, changement du milieu de culture, temps de formation des jonctions), deux stratégies différentes sont proposées, également détaillées en annexe – section 5 – I - C-. La première stratégie consiste à combiner l'utilisation d'un inhibiteur de la ROCK appelé Y-27632 et d'un stabilisateur de jonctions endothéliales appelé sphingosine – 1 – phosphate (S1P) afin de réduire les divisions cellulaires en réduisant la dynamique du cytosquelette, le tout sans empêcher les cellules de former des jonctions entre elles. Cependant, l'ajout de ces agents pharmacologiques impacterait la fonctionnalité de la monocouche artificielle évaluée par SPRI après injection de la thrombine. Dans ces conditions expérimentales, la réponse mesurée ne semble pas correspondre à la réponse spécifique d'un tissu endothélial.

La deuxième stratégie consiste à moduler les géométries des hexagones afin d'optimiser les contraintes de bords chimiques et géométriques dans le but de réduire les divisions, puisque tous les résultats montrés dans ces travaux ont été effectués avec des hexagones pleins. Selon la littérature, il a été démontré que le modèle géométrique idéal tend à minimiser la tension de surface des cellules et alterne entre des zones adhésives et non adhésives et entre des zones concaves et convexes favorisant la formation de lamellipodes et de fibres de stress pour respecter un équilibre énergétique (Annexes-section 5-I-C-2-). De plus, comme il a été montré dans le chapitre 4 – section 1 – III, les noyaux des cellules se déplacent vers le centre de la structure globale dans les assemblages à 3 hexagones montrant ainsi une polarité des cellules et une anisotropie avant la formation des jonctions. Dans le cas d'étude d'un assemblage à 7 hexagones, une hypothèse est que les cellules vont également se polariser avant la formation des jonctions. Ainsi les 6 cellules dans les 6 hexagones autour de l'hexagone central seraient anisotropes, tandis que la cellule dans l'hexagone central serait la seule à être isotrope et devrait rester placée au centre de l'hexagone. Il est important de prendre en compte cette information dans le choix des géométries optimales pour la fabrication d'une monocouche cellulaire *in vitro* dans des assemblages de 7 hexagones et plus.

Dans ces travaux de thèse, le phénotype endothélial fonctionnel des cellules dans les biopuces microstructurées est évalué par imagerie SPR. Dans les chapitres précédents, les avantages et certaines des limitations du système d'imagerie SPR ont été mis en avant, notamment quant à sa résolution spatiale liée à nature propagative des plasmons de surface (PSP) qui déplace/floute l'information dans la direction de propagation des

plasmons. De précédents travaux de l'équipe ont démontré que la fabrication de puces SPR nanostructurées combinant les propriétés de plasmons propagatifs et de plasmons localisés permet d'améliorer la résolution spatiale en imagerie SPR¹⁰⁰. Ainsi, des expériences préliminaires ont été réalisées sur des substrats nanostructurés pour tester l'amélioration de la résolution de l'imagerie SPR. Les résultats préliminaires obtenus et décrits en annexe – section 5 - II n'ont pas montré une augmentation significative de la résolution spatiale pour l'imagerie SPR de nos cellules. Cela pourrait venir d'une mauvaise fabrication de ces substrats nanostructurés ou peut être d'une mauvaise adéquation entre la chimie utilisée dans nos expériences et les nanostructures. Malheureusement, cette hypothèse de travail n'a pas pu être plus approfondie.

D'autres part, plus généralement, est-ce que la nanostructuration des substrats microstructurés impacte l'adhésion cellulaire à une échelle nanométrique ? Bien que selon certains articles détaillés en annexe – section 5 - II - B-, la nanostructuration joue un rôle dans le contrôle de l'adhésion cellulaire et plus précisément dans la formation des complexes moléculaires de points focaux d'adhésion, il est difficile d'appliquer cette information dans ce cas d'étude. En effet, les études présentées précédemment consistent à déposer des nanoparticules d'or sur des lames de verre avec une chimie de surface différenciée entre la chimie de thiols pour l'or et la silanisation sur du verre. Dans ce cas d'étude où il s'agit de nanoparticules d'or sur du verre, il est impossible d'exciter des plasmons de surface et de faire des études de plasmonique. De plus, en termes de nanostructuration, même s'il existe différentes techniques de nanostructuration et de fonctionnalisation¹²², il n'existe pas aujourd'hui de techniques permettant de fonctionnaliser différemment des nanostructures d'or sur des lames d'or. Ainsi, la nanostructuration permettrait d'améliorer la résolution de l'imagerie SPR pour des cellules vivantes. Mais serait-il possible, un jour, en plus d'optimiser la résolution de l'imagerie SPR, contrôler à l'échelle nanométrique l'adhésion cellulaire sur des substrats plasmoniques ?

Finalement, en conclusion de ce chapitre de perspectives, quelques applications en biologie tissulaire et en diagnostic clinique sont présentées pour lesquelles les biopuces plasmoniques microstructurées fabriquées dans ces travaux de thèse peuvent être utilisées.

Dans des conditions hémodynamiques de flux sanguin, les cellules endothéliales répondent à différents types d'écoulements. Un flux unidirectionnel élevé ou modéré provoque l'alignement et l'élongation des cellules endothéliales, tandis qu'un flux oscillatoire et faible, associé à une morphologie en pavage hexagonal, provoque une organisation aléatoire du cytosquelette et correspond à des fonctions pro-inflammatoires des cellules endothéliales comme dans le cas de maladies cardiovasculaires tel l'athérosclérose¹²³. Dans ce cas d'étude, la microstructuration permet de mimer l'alignement des cellules endothéliales en réponse à un écoulement. Il a ainsi été démontré que les cellules endothéliales adhérant sur des substrats microstructurés selon des lignes d'épaisseur différentes s'allongent et que leur morphologie finale et la conformation du cytosquelette sont équivalentes à des élongations induites par des contraintes de cisaillement du flux¹²⁴. Ainsi, dans des conditions physiologiques d'écoulement de flux sanguin, la microstructuration

influence le phénotype structurel des cellules endothéliales tels la morphologie cellulaire, l'alignement du cytosquelette, la prolifération et l'apoptose cellulaire. De plus, la microstructuration impacte également le phénotype fonctionnel des cellules endothéliales en ayant un impact sur les jonctions intercellulaires, la signalisation et la migration cellulaire, l'expression des gènes et des protéines et sur les propriétés de mécano-transduction des cellules¹²⁵⁻¹²⁹. Le protocole de microstructuration développé dans le cadre de cette thèse permet de fabriquer des cellules allongées sur des substrats plasmoniques, selon des microstructures de géométries en ligne (selon la littérature présentée ci-dessus), de tailles différentes. Le choix de la taille des microstructures dépend du type cellulaire endothélial utilisé qu'il corresponde à des artères, veines ou capillaires. Ainsi, il serait possible de mimer des cellules endothéliales de vaisseaux sanguins différents, dans des conditions de contraintes de cisaillement afin d'évaluer les réponses de ces cellules, en temps réel et sans marquage, par imagerie SPR, en présence de différents agents externes spécifiques à des conditions pathologiques associées à la présence de toxines bactériennes.

Dans le but de développer un biocapteur plasmonique pour le diagnostic précoce de présence de toxines bactériennes comme dans le cas du sepsis, le marqueur précoce est la détection des dysfonctions endothéliales qui se traduisent principalement par une rupture de jonctions et un changement morphologique des cellules. Nos travaux présentent une première preuve de concept pour le développement de biocapteurs cellulaires plasmoniques pour le diagnostic précoce de sepsis en se basant sur la fabrication d'une monocouche cellulaire endothéliale fonctionnelle *in vitro* selon des assemblages à 3 hexagones. Ces résultats poussent à réfléchir et à se demander quel est le nombre d'hexagones nécessaire et suffisant pour dire que la monocouche cellulaire endothéliale fabriquée est représentative d'un endothélium ? Sachant que la difficulté de contrôler l'adhésion des cellules augmente avec le nombre des hexagones dans les assemblages.

Dans les travaux à venir, il serait intéressant de quantifier les réponses des cellules dans les assemblages à 3 hexagones, par imagerie SPR, en présence de sérum d'un patient sain et d'un patient atteint de sepsis, afin de démontrer que la biopuce fabriquée dans le cadre de nos travaux permet de détecter la présence de toxines bactériennes dans le sérum des patients. Les patients atteints de sepsis qui ne sont pas diagnostiqués en urgence ont une augmentation des risques de mortalité de 7,6% chaque heure³⁸. Ainsi, développer un moyen de détection rapide viendrait compléter le diagnostic clinique du médecin afin d'éviter que le cas d'un patient atteint de sepsis évolue en choc septique et d'augmenter ses chances de survie. a terme, il est possible d'imaginer l'utilisation de ces biocapteurs pour le diagnostic médical tel que :

- Les lames microstructurées et passivées peuvent être stockées pendant plusieurs semaines dans une cloche sous vide
- Le temps de formation de jonctions entre les cellules est de 24h environ. Ce temps peut encore être optimisé et pourrait être réduit à 12h.
- Une expérience d'imagerie SPR en temps réel pour quantifier les réponses des cellules est d'environ 90 minutes.

On pourrait imaginer avoir un stock de substrats avec des cellules endothéliales adhérant dessus selon les assemblages souhaités dans un incubateur de culture cellulaire, qui serait prêt à être utilisés comme biocapteurs de diagnostic précoce de sepsis. Dans ce contexte d'étude, en plus de réduire le temps d'adhésion des cellules et le temps de formation des jonctions entre elles à une durée entre 12 h et 24 h dans un incubateur, la microstructuration présente un avantage considérable dans le contrôle sur la dimension des cellules et donc sur la fabrication d'une monocouche ayant un phénotype fonctionnel. De plus, la microstructuration permet la normalisation du signal obtenu en fixant les paramètres géométriques. Ainsi, les résultats obtenus sont robustes et reproductibles et permettent d'obtenir des signaux à analyser quantifiables et comparables.

CONCLUSION GENERALE

Ces travaux de thèse pluridisciplinaires ont porté sur la fabrication d'un biocapteur à résonance de plasmons de surface adapté à la mesure de la réponse cellulaire dans un contexte de monocouche endothéliale afin d'évaluer et idéalement de moduler la fonction de la barrière endothéliale dans un modèle cellulaire *in vitro*.

Dans le chapitre 2, le contexte biologique de ces travaux de thèse a été introduit en décrivant les différentes interactions des cellules endothéliales avec leur microenvironnement constitué principalement des cellules voisines et de la matrice extracellulaire (MEC). L'ensemble de ces interactions cellules/cellules et cellules/MEC assurent l'intégrité de la monocouche cellulaire endothéliale formée. Cette monocouche également appelée l'endothélium, présente une hétérogénéité structurelle et phénotypique qui lui permet d'accomplir diverses fonctions physiologiques clés de l'organisme. Suite à une infection par un agent pathogène, il a été démontré que non seulement l'endothélium était impliqué, mais que les dysfonctions endothéliales souvent traduites par une altération de la paroi vasculaire et une perte d'intégrité de la barrière endothéliale représenteraient un marqueur pathologique comme dans le cas de la maladie du sepsis par exemple.

Dans le but de développer, à terme, un outil de diagnostic précoce de ces dysfonctions endothéliales, le but a été de fabriquer des systèmes cellulaires de monocouches endothéliales fonctionnelles sur des biocapteurs plasmoniques *in vitro*, permettant de mesurer et de quantifier la réponse des cellules endothéliales, en temps réel, en présence d'agents pathologiques et de toxines bactériennes. Cependant, dans les conditions classiques de culture cellulaire dans le microenvironnement *in vitro*, la majorité des informations spatiales et structurelles observées *in vivo* sont perdues. Ainsi, la microstructuration cellulaire a été identifiée comme un outil permettant, dans un premier temps de se rapprocher des conditions spatiales *in vivo*, et dans un deuxième temps de contrôler l'adhésion des cellules en générant des régions adhésives et non adhésives selon des microstructures de géométries et de tailles différentes.

Généralement, la première étape des techniques de microstructuration présentées

consiste à fonctionnaliser chimiquement la surface des substrats. Dans cette étude, le choix de travailler avec substrats d'or est liée à la biocompatibilité du matériau et à ses propriétés plasmoniques. En effet, il y a un grand intérêt à travailler avec des substrats plasmoniques pour la biodétection sans marquages d'événements biologiques puisque l'environnement cellulaire n'est pas modifié chimiquement et physiologiquement.

Comme présenté dans le chapitre 3, un protocole de microstructuration a été développé, permettant de contrôler et d'optimiser l'adhésion et l'autoassemblage de cellules endothéliales individuelles sur des substrats d'or en combinant des techniques de chimie de surface à base de thiols et de microstructuration par illumination DUVs. Il s'agit d'un protocole de fabrication reproductible, simple, fiable et à bas-coût pour des applications médicales, en biocapteurs ou en optique. La fonctionnalisation de la surface des substrats a été effectuée en utilisant de petits volumes de produits de passivation et de molécules d'adhésion cellulaire recouvrant de grandes surfaces et permettant d'obtenir une microstructuration contrôlée à l'échelle du micromètre avec un taux de réussite quasiment de 100%. De plus, la caractérisation de la surface des substrats d'or à différentes étapes du protocole a permis, et de confirmer l'homogénéité du dépôt des molécules et leur bon greffage à la surface des substrats d'or préalablement nettoyées selon un protocole précis, et de comprendre et d'identifier les étapes sensibles expérimentalement afin d'éviter certaines erreurs.

Les premiers résultats ont permis de démontrer que la distribution du nombre de cellules dans les microstructures dépendait de la surface des régions adhésives. Une gamme de diamètres pour ce type cellulaire endothélial de travail a été identifiée permettant d'obtenir le confinement d'une cellule par hexagone. Ensuite, et afin d'induire de la connectivité entre les cellules confinées dans les hexagones, les espacements ont été variés entre ces derniers. Cependant, il est important de noter que plus le nombre de régions adhésives augmente, plus il est difficile de contrôler l'hétérogénéité liée à la division et la prolifération des cellules qui y adhèrent. Ainsi, le choix s'est porté sur un modèle cellulaire avec un système simplifié à 3 hexagones. De plus, il a été démontré que le confinement des cellules dans les microstructures variait en fonction des espacements entre les hexagones. Ainsi, une gamme d'espacements a été identifiée pour laquelle est observé le confinement d'une cellule par hexagone dans le système à 3 hexagones.

Dans le quatrième chapitre, le phénotype du système cellulaire à 3 hexagones fabriqué sur les substrats d'or microstructurés. En effet, après avoir mis en évidence les paramètres expérimentaux qui régissent la formation d'une monocouche cellulaire dans ce cas d'étude, le phénotype endothélial structurel du groupe de cellules fabriqué est démontré en caractérisant et en quantifiant la formation de jonctions intercellulaires par marquage fluorescent des cadhérines. Ensuite, le phénotype fonctionnel du système à 3 hexagones est démontré, en temps réel, par imagerie à résonance des plasmons de surface (SPRi), en mesurant l'effet dose-réponse en présence de la thrombine, qui est référencée dans la littérature comme spécifique à des conditions pathologiques associées à un stress inflammatoire et à l'exposition de toxines bactériennes.

Le développement d'un biocapteur plasmonique microstructuré et fonctionnalisé pour

des applications cellulaires permet d'obtenir une quantification et une normalisation du signal et de la réponse cellulaire mesurée dans un contexte complexe des études du vivant. Bien que ces travaux de thèse ne présentent aucune nouveauté en biologie cellulaire ou en pharmacologie, ils permettent de démontrer, pour la première fois, la possibilité de fabriquer des modèles de monocouche cellulaire endothéliale sur des biopuces plasmoniques selon des réseaux ordonnés en vivant, avec une reproductibilité de la réponse permettant la quantification et la comparaison. La reproductibilité géométrique liée à la microstructuration permet de réduire la variabilité de l'évolution des systèmes en vivant et assure une reproductibilité structurelle et par conséquent phénotypique. A partir du moment où les différents paramètres qui modulent la réponse cellulaire dans ce cas d'étude ont été identifiés, ces conditions expérimentales sont imposées à une population du type cellulaire choisi dans ce cas d'étude. Ces paramètres expérimentaux varient d'un type cellulaire à l'autre et doivent faire l'objet d'une étude préliminaire poussée pour chaque cas d'étude. L'exploration des paramètres expérimentaux pour différents types cellulaires peut faire l'objet d'une étude multiparamétrique et statistique, qui, in fine, permettrait de faire de la prédiction de paramètres de confinement et de connectivité de façon robuste.

Ces travaux de thèse présentent une première preuve de concept de la fabrication d'une petite brique selon des assemblages à 3 hexagones d'une monocouche endothéliale comme modèle cellulaire *in vitro*. Augmenter le nombre des hexagones dans les assemblages afin de fabriquer un tissu plus complet et plus proche de l'hétérogénéité d'un endothélium *in vitro*, en 2D, nécessite de refaire une nouvelle étude. Il faudrait définir les paramètres expérimentaux les plus optimaux en se basant sur ce qui est décrit dans ces travaux, tout en respectant un compromis entre l'occupation des microstructures par les cellules et la division cellulaire. La fabrication d'un modèle de monocouche cellulaire endothéliale *in vitro* directement sur des puces plasmoniques dites de nouvelles générations pourra être utilisée dans plusieurs applications de biocapteurs cellulaires comme pour la mesure de l'intégrité de la barrière endothéliale dans des conditions pathologiques et le maintien du phénotype des cellules de l'endothélium cornéen pendant les cultures cellulaires primaires. D'autres applications sont possibles notamment dans le domaine de fabrication d'organes « organe-on-chip » qui consistent à reproduire fidèlement les caractéristiques physiologiques d'un endothélium sur des puces plasmoniques dans le but de valider des médicaments selon des tests pharmacocinétiques et de fournir des données sur leur efficacité dans un contexte physiologique pertinent.

CHAPITRE 6 : ANNEXES

SECTION 1 : SCHEMAS RECAPITULATIFS DES PHOTOMASQUES CHROME/QUARTZ FABRIQUES DANS CETTE THESE

Comme décrit dans le protocole de microstructuration (Figure 24), la microstructuration des substrats d'or est effectuée par illumination DUV à travers un photomasque chrome/quartz. Les microstructures en quartz sont transparentes aux DUV, tandis que les régions en chrome leur sont opaques. Cette section correspond à un récapitulatif des plans des masques fabriqués dans ces travaux de thèse. Les masques ont été dessinés avec des scripts python associés au logiciel Layout Editor. Ensuite les masques ont été fabriqués par la compagnie PHOTOMASK PORTAL (<https://www.photomaskportal.com>). Avant chaque utilisation, les masques sont nettoyés avec au plasma Cleaner. Après utilisation, ils sont rincés à l'éthanol (95 %) et séchés à l'azote.

A- Masque 1 : Premiers tests de contrôle de l'adhésion cellulaire

Le premier masque fabriqué dans le cadre de ces travaux de thèse a permis de faire les premiers tests de contrôle de l'adhésion des cellules endothéliales sur les surfaces d'or fonctionnalisées et microstructurées. De plus, en fabriquant ce masque, il manquait les informations concernant le diamètre des structures ou la distance à laquelle les cellules dans les microstructures ne communiquent pas entre elles et peuvent être considérées comme isolées les unes des autres. Ce masque contient deux matrices.

La première matrice correspond à :

- un pavage hexagonal de plusieurs hexagones de 100 micromètres de diamètre espacés de 25 μm (**H 100_25**)
- un pavage hexagonal de plusieurs hexagones de 100 micromètres de diamètre espacés de 10 μm (**H 100_10**)
- 2 groupes de pavages hexagonaux de plusieurs hexagones de 40 micromètres de diamètre espacés de 10 μm (**H 40_10**)
- 2 groupes de pavages hexagonaux de plusieurs hexagones de 40 micromètres de diamètre espacés de 5 μm (**H 40_5**)
- 3 groupes de pavages hexagonaux de plusieurs hexagones de 20 micromètres de diamètre espacés de 5 μm (**H 20_5**)
- 4 carrés de côté égal à 250 μm espacés de 250 μm entre eux (**C 250**)

- Un groupe de lignes de 100 μm d'épaisseur espacées de 100 μm (**L100**)
- Un groupe de lignes de 40 μm d'épaisseur espacées de 40 μm (**L40**)
- Un groupe de lignes de 20 μm d'épaisseur espacées de 20 μm (**L20**)

Dans la première matrice, il y a un groupe de 45 carrés (9 x 5) de 250 μm de côté, espacés de 250 μm (Figure 74). Les résultats obtenus avec ce masque sont présentés dans la Figure 30.

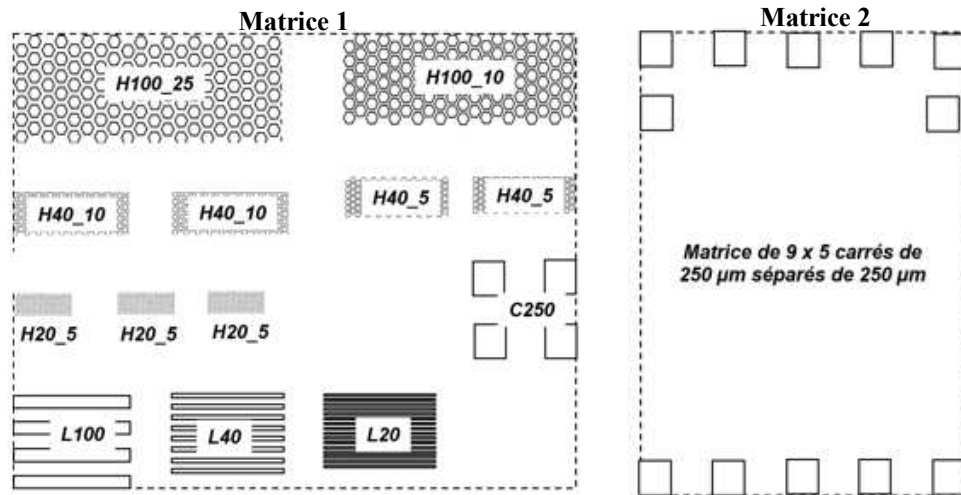


Figure 74: Plan du masque n°1 fabriqué dans ces travaux de thèse

B- Masque 2 : Masque de confinement (structures isolées)

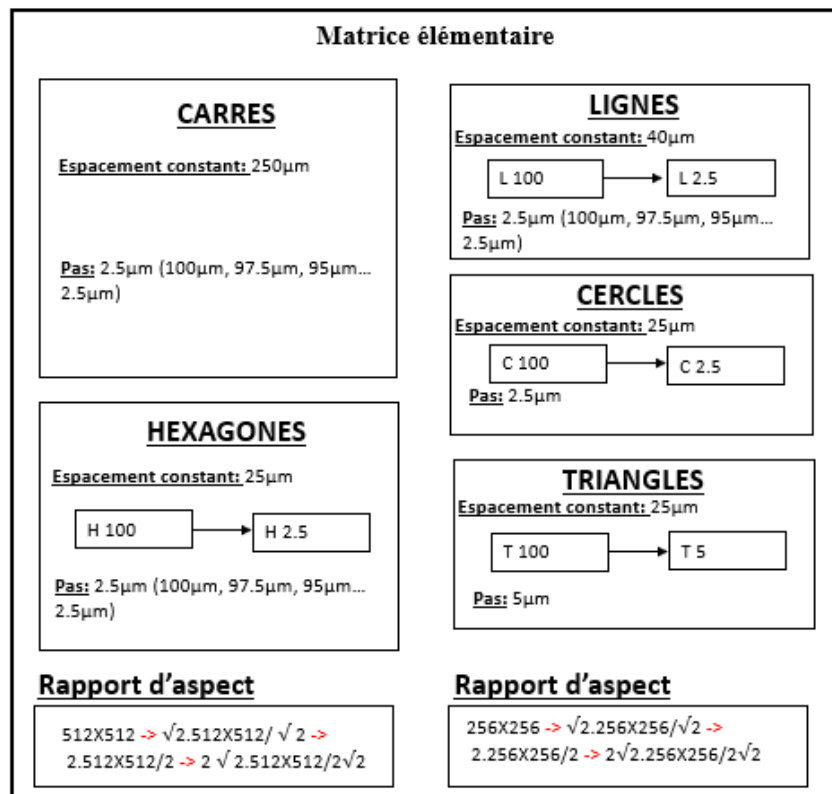
Le premier masque décrit ci-dessus a permis de définir une distance égale à 25 μm entre les microstructures afin que les cellules y adhérant ne communiquent pas entre elle et soient considérées comme isolées. Ainsi, dans ce masque se trouve une matrice élémentaire principale, répétée 4 fois. La répétition de cette matrice permet de déposer en même temps 4 lames d'or sur le masque et en 1 seule expérience, microstructurer 4 lames. Cette matrice élémentaire contient :

- Des microstructures en carrés dont la taille des cotés est égale à 500 μm (**C 500**), 250 μm (**C 250**) et ensuite varie de 100 μm (**C 100**) à 2.5 μm (**C 2.5**) avec un pas de 2.5 μm . Tous les carrés au sein d'un même groupe sont espacés entre eux de 250 μm . Une surface de remplissage est fixée par les microstructures : ainsi lorsque la taille des carrés est réduite, il faut en dessiner plus en comparaison aux groupes les plus grands.
- Des microstructures en lignes dont l'épaisseur varie entre 100 μm (**L 100**) et 2.5 μm (**L 2.5**) avec un pas de 2.5 μm . En fonction des résultats obtenus avec le masque précédent, l'espacement entre les lignes au sein d'un même groupe est fixé à 40 μm .

- Des microstructures en hexagones dont le diamètre varie de 100 μm (**H 100**) à 2.5 μm (**H 2.5**) avec un pas de 2.5 μm . Pour les structures en hexagones, l'espacement entre les microstructures au sein d'un même groupe est fixé à 25 μm en fonction résultats obtenus avec le masque précédent.
- Des microstructures en cercles dont le diamètre varie entre 100 μm (**Ce 100**) et 2.5 μm (**Ce 2.5**) avec un pas de 2.5 μm . Comme pour les hexagones, les espacements entre les cercles au sein d'un même groupe sont fixés à 25 μm .
- Des microstructures de triangles équilatéraux dont les tailles des cotés varient entre 100 μm (**T 100**) et 5 μm (**T 5**) avec un pas de 5 μm . Les triangles au sein d'un même groupe sont espacés entre de 25 μm .
- Des carrés de 512 μm de côté, pour lesquels les tailles des côtés sont variées de façon proportionnelle pour les études de rapport d'aspect.
- Des carrés de 256 μm de côté, pour lesquels les tailles des côtés sont variées de façon proportionnelle pour les études de rapport d'aspect.

Ce masque est détaillé dans la Figure 75 et a été utilisé pour toutes les études sur le confinement des cellules dans les microstructures présentées dans le chapitre III, Section 1, II-A-B-.

a



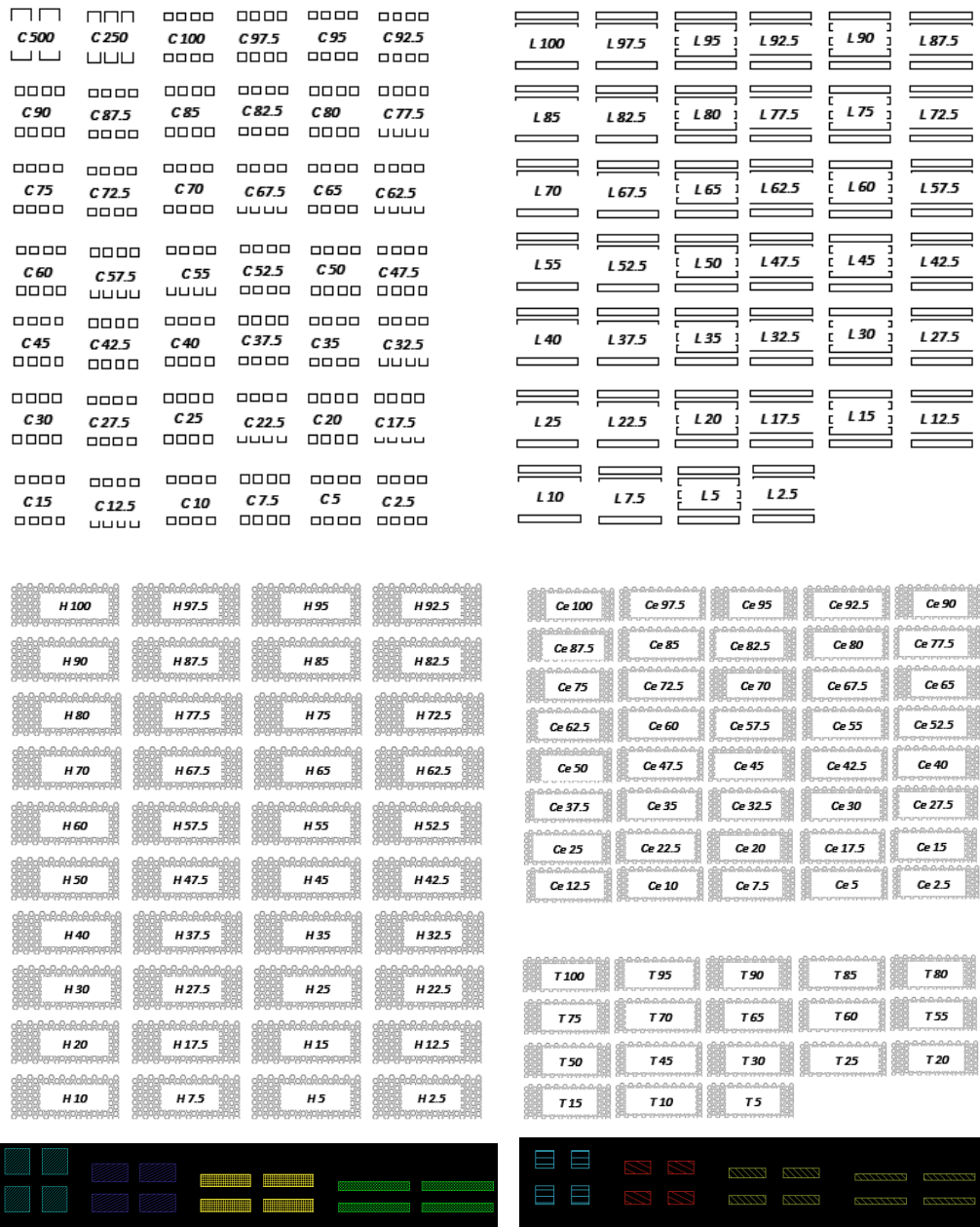
b

Figure 75: Plan du masque n°2 fabriqué dans ces travaux de thèse. **a)** Plan général d'une matrice élémentaire qui est répétée 4 fois dans ce masque. **b)** Plan détaillé pour chaque géométrie avec les variations des tailles des cotés ou des diamètres.

C- Masque 3 : Masque de groupes d'hexagones – tests de couches cellulaires

Le troisième masque fabriqué dans cette thèse contient des groupes d'hexagones de diamètres différents allant de 60 μm (**H 60**) à 5 μm de diamètre (**H 5**) avec un pas de

2.5 μm (Figure 76 – a). Pour chaque diamètre, les espacements entre les hexagones sont variés pour chaque groupe à 50 μm , puis de 25 μm à 0 μm avec un pas de 1 μm comme détaillé dans la Figure 76 – b pour un diamètre fixé à 60 μm . Les résultats obtenus avec ce masque sont présentés dans les Figure 35 – 37.

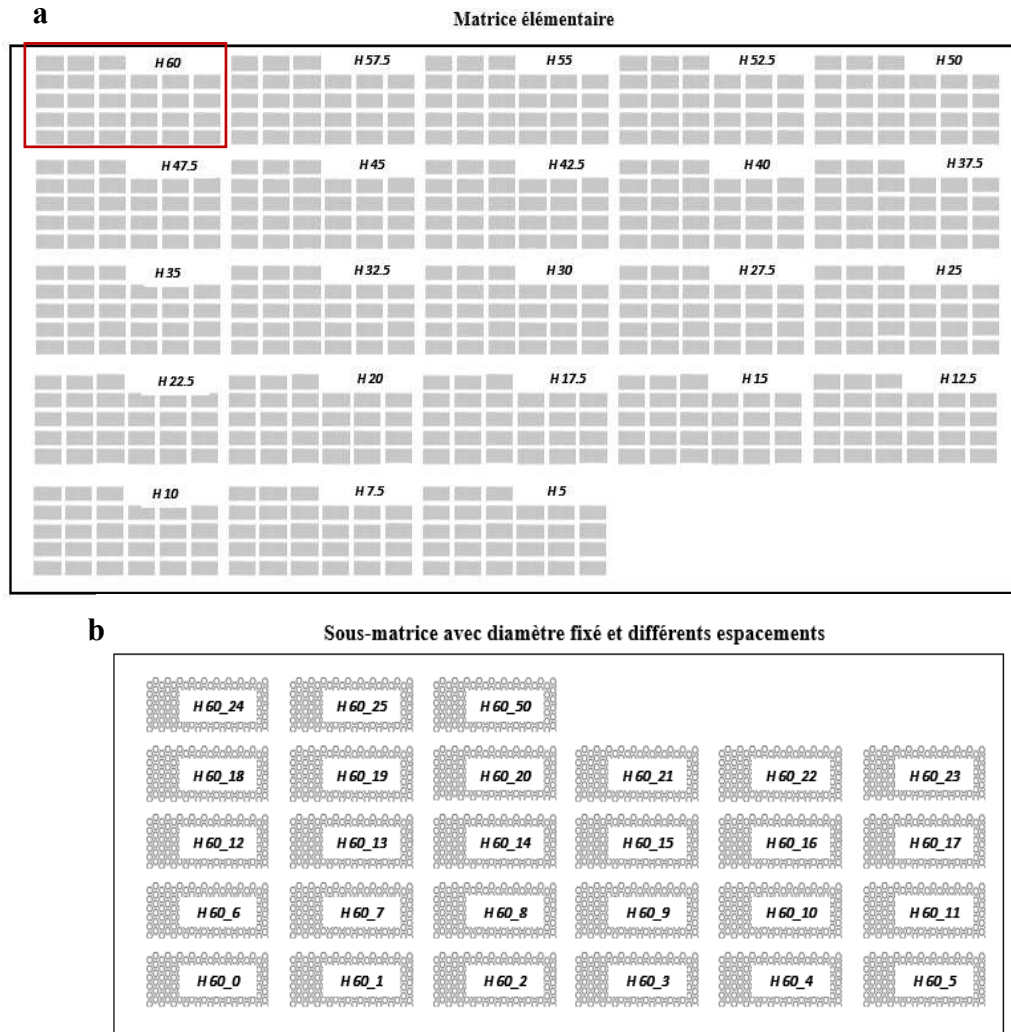


Figure 76: Plan du masque n°3 fabriqué dans cette thèse. **a)** Plan général du masque avec des groupes d'hexagones dont les diamètres varient de 60 μm à 5 μm avec un pas de 2.5 μm . **b)** Pour chaque groupe d'hexagones d'un diamètre fixé, les espacements entre les hexagones varient : ils sont à 50 μm , puis de 25 μm à 0 μm entre les hexagones avec un pas de 1 μm .

D- Masque 4 : Masque de connectivité

Le quatrième masque fabriqué dans cette thèse contient des structures isolées avec des groupes composés de 1 hexagone, 3 hexagones, 7 hexagones, 19 hexagones, 37 hexagones, 61 hexagones et 91 hexagones (Figure 77 – a) correspondant à la sous-matrice répétée. Pour chaque matrice, les espacements sont variés entre 0 μm et 15

µm avec un pas de 0.5 µm puis de 15 µm à 20 µm avec un pas de 1 µm. Pour chaque espacement, les diamètres sont variés de 50 µm à 5 µm avec un pas de 2.5 µm (Figure 77 – b). Ce masque a permis de faire des tests avec des groupes isolés d'un nombre d'hexagones définis mais a été difficilement quantifiable car il ne contient pas de répétitions de structures rendant son utilisation difficile.

a

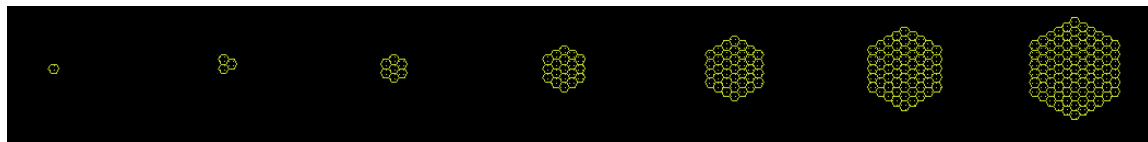
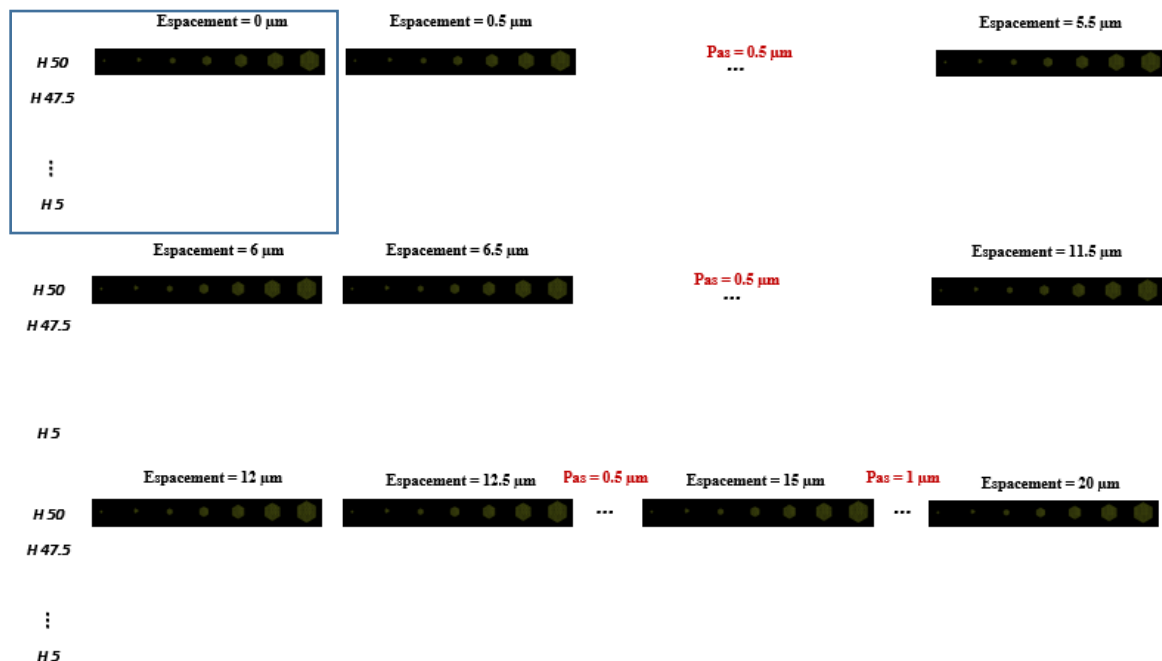
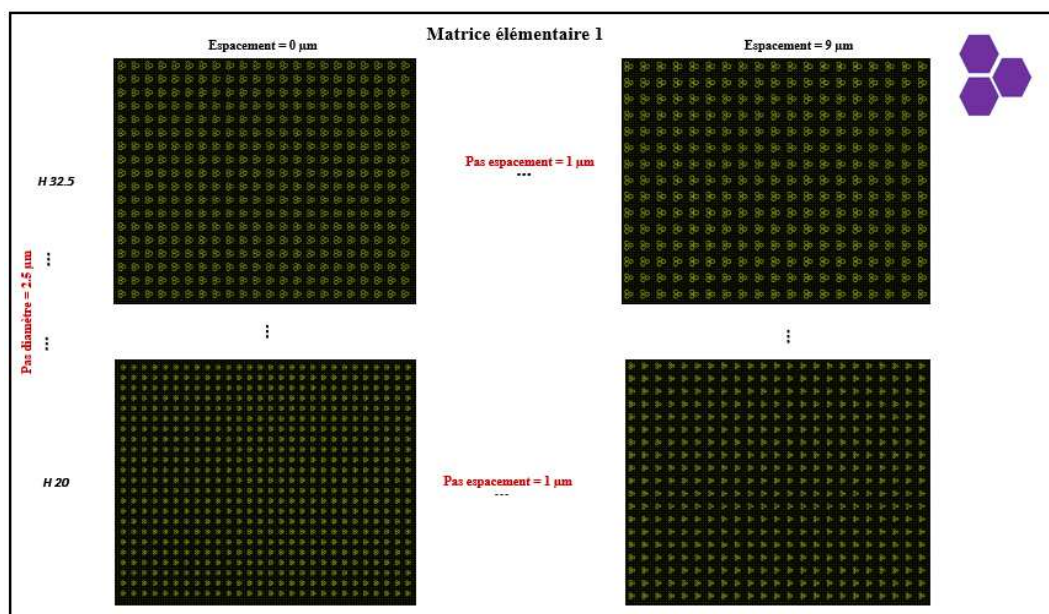
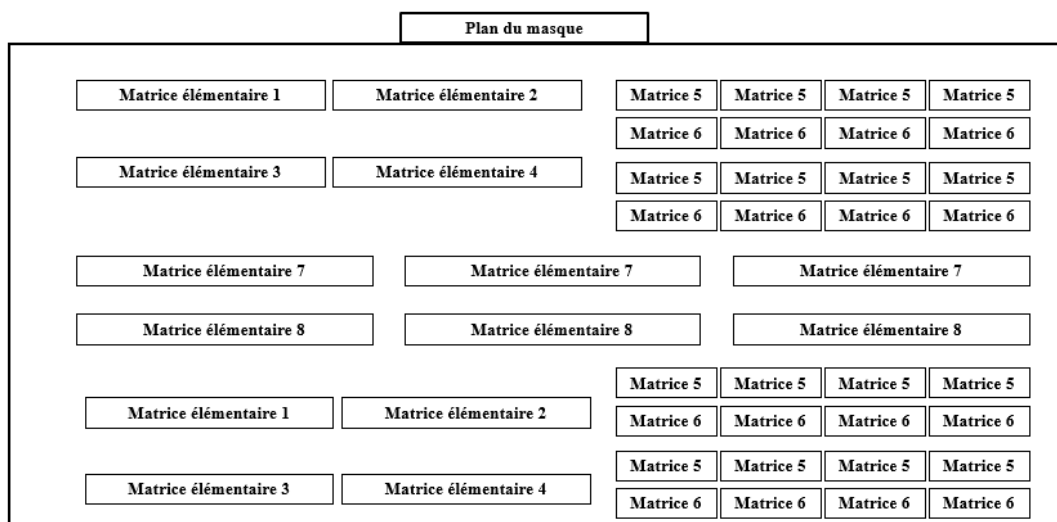
**b**

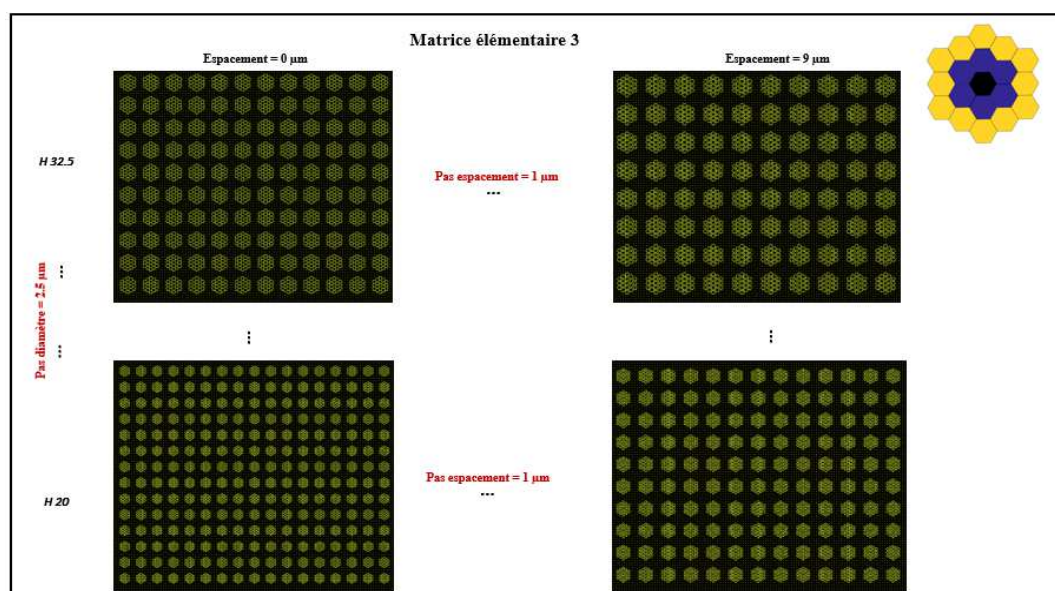
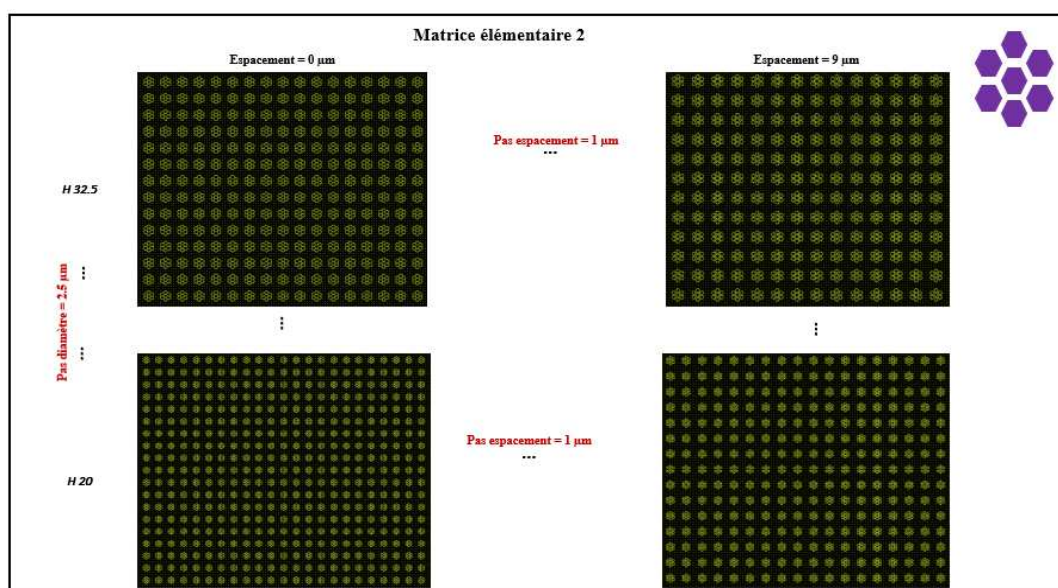
Figure 77: Plan général du manque n°4 fabriqué dans cette thèse. **a)** Structures des groupes contenant un nombre défini d'hexagones (1, 3, 7, 19, 37, 61, 91 hexagones). **b)** Variation des diamètres des hexagones entre 50 μm et 5 μm avec un pas de 2.5 μm pour les 7 groupes d'hexagones présentés dans (a). Ensuite pour tous ces groupes, les espacements sont variés entre 0 μm et 15 μm avec un pas de 0.5 μm et ensuite de 15 μm à 20 μm avec un pas de 1 μm .

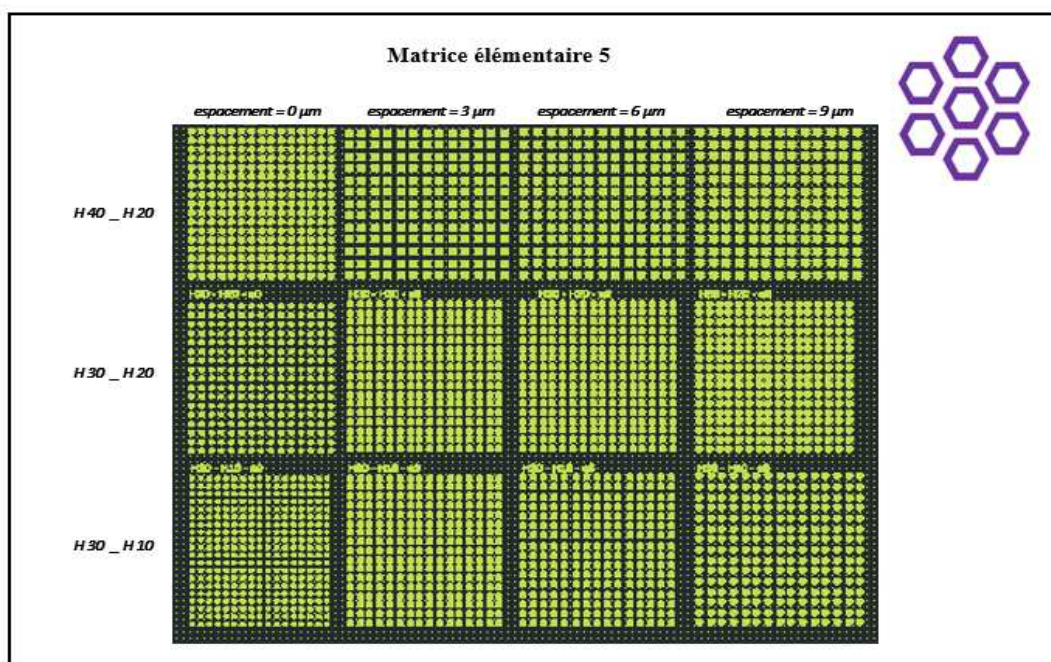
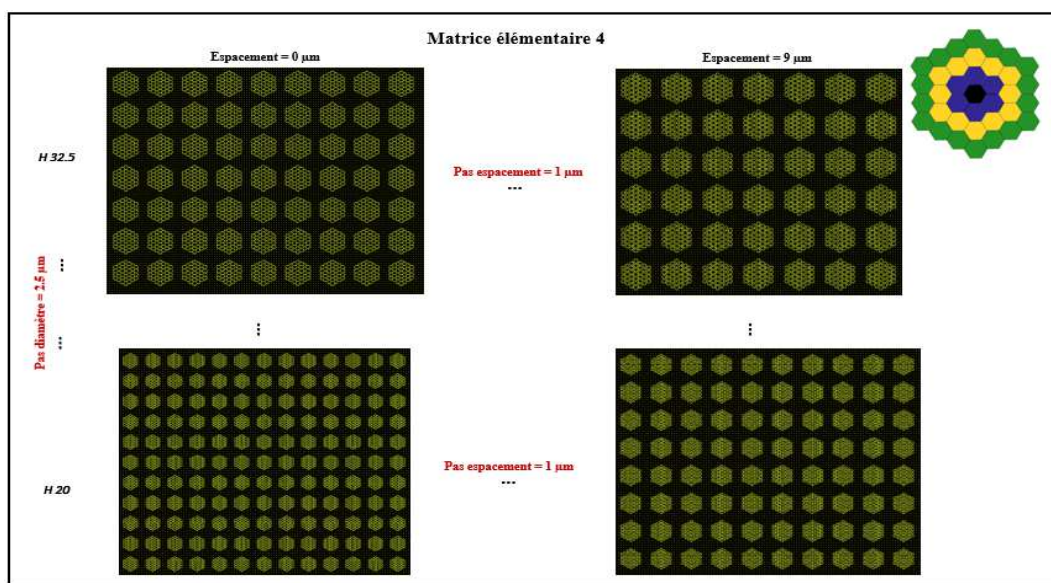
E- Masque 5 : Masque de connectivité pour les études statistiques

Le dernier masque fabriqué dans cette thèse contient 8 matrices élémentaires disposées comme décrit dans le plan du masque. La matrice 1 correspond à des assemblages de 3 hexagones répétés plusieurs fois formant une sous-matrice. Pour chaque sous-matrice, les diamètres des hexagones sont variés de 32.5 μm à 20 μm avec un pas de 2.5 μm . Pour chacun de ces diamètres, les espacements entre les hexagones sont variés de 0 μm

à 9 μm avec un pas de 1 μm . Dans les matrices 2, 3 et 4, la même chose que la matrice 1 est retrouvée mais pour des assemblages respectivement à 7 hexagones, 19 hexagones et 37 hexagones. Les matrices 5 et 6 contiennent une architecture différente de tous les hexagones présentés précédemment. En effet, ici les hexagones ne sont pas pleins mais uniquement les bords sont en quartz (partie violette sur les schémas). Il s'agit d'un petit hexagone dans un hexagone plus grand, comme dans ce cas d'étude contenant un petit hexagone de 20 μm de diamètre dans un grand hexagone de 40 μm de diamètre (**H 40 – H 20**), ou un petit hexagone de 20 μm de diamètre dans un grand hexagone de 30 μm de diamètre (**H 30 – H 20**), ou un petit hexagone de 10 μm de diamètre dans un grand hexagone de 30 μm de diamètre (**H 30 – H 10**). Pour chacune de ces structures, les espacements sont variés de 0 μm à 9 μm avec un pas de 3 μm . La matrice 5 correspond à des assemblages de 7 hexagones, tandis que la matrice 6 contient des assemblages à 3 hexagones. Finalement les matrices 7 et 8 contiennent des hexagones (pleins) avec pour chaque diamètre allant de 32.5 μm à 20 μm avec un pas de 2.5 μm , des groupes d'hexagones espacés entre eux par des espacements variant de 0 μm à 9 μm avec un pas de 1 μm . La matrice 7 contient des assemblages à 3 hexagones, tandis que la matrice 8 contient des assemblages à 7 hexagones (Figure 78). Ce masque a été utilisé pour toutes les expériences de cette thèse effectuées avec les assemblages à 3 hexagones et pour les résultats préliminaires présentés dans le chapitre de perspectives avec les assemblages à 7 hexagones.







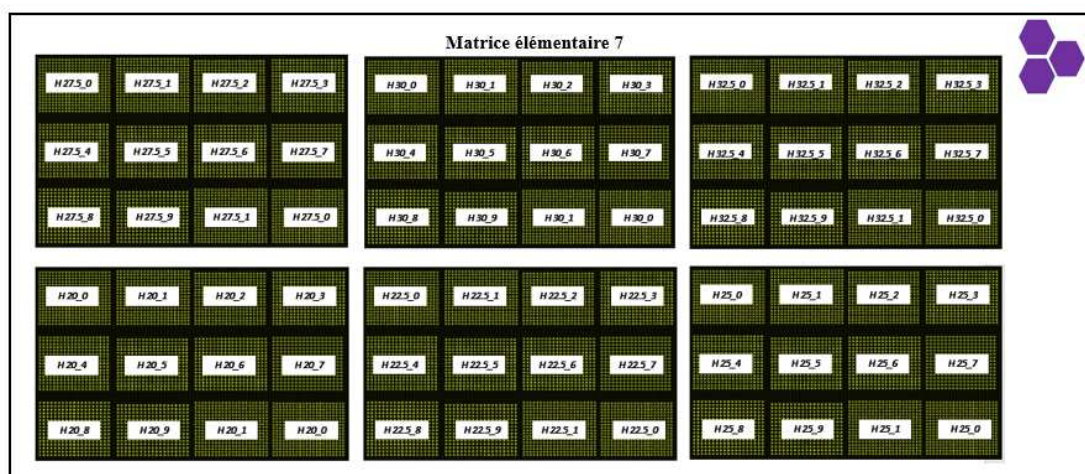


Figure 78: Plan général du masque n°5 fabriqué dans cette thèse. Plan général du masque avec la disposition des 8 différentes matrices élémentaires. Chaque matrice est détaillée avec le nombre d'hexagones dans les structures, les variations des diamètres et des espacements.

SECTION 2 : RESULTATS PRELIMINAIRES OBTENUS AVEC LA MICROSTRUCTURATION PAR MICROCONTACT PRINTING

Les premiers tests de microstructuration ont été effectués avec le microcontact printing (μ CP) comme technique de microstructuration des surfaces. Ces expériences ont été effectuées dans l'équipe d'Aline Cerf au Laboratoire d'analyse et d'architecture des systèmes (LAAS) à Toulouse en France dans le but d'apprendre à microstructurer par μ CP et à faire des premiers tests sur des surfaces d'or. Ces expériences tests ont été faites sur des lames de verre. Pour ce test, le timbre utilisé (moules en silicium réticulés avec PDMS) contient des lignes de 2 μ m d'épaisseur espacées de 5 μ m alternant des structures positives (en relief) et négatives. Ainsi, une goutte de molécules d'adhésion (500 μ L de poly-L-Ornithine) a été déposée et incubée sur le moule en PDMS. Le timbre est ensuite séché dans le sens des lignes, et les molécules sont transférées par contact pendant 1 minute sur la lame de verre. Les molécules d'adhésion utilisées sont conjuguées au marqueur FITC afin de pouvoir observer leur dépôt sur le substrat de verre. Le dépôt des molécules d'adhésion se fait bien le long des lignes du timbre de PDMS (Figure 79). Selon la technique de transfert et des solvants utilisés appelée du transfert modeling, les motifs soit imprimés en relief soit selon l'espace entre les motifs.

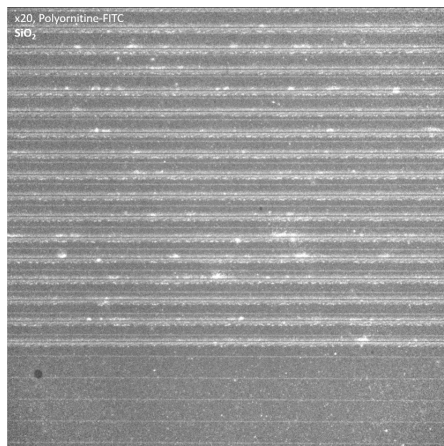


Figure 79: Image de fluorescence des molécules d'adhésion de poly-L-ornithine – FITC déposées selon un timbre de lignes de 2 μm d'épaisseur espacées de 5 μm .

Afin d'identifier les molécules les plus intéressantes pour déposer des molécules d'adhésion sur des surfaces d'or par μCP , des tests ont été effectués sur des lamelles de verre où 30 nm d'or ont été déposés que sur une moitié de la lamelle. Pour ces expériences, un timbre négatif de structures en cercle de diamètres entre 10 μm et 15 μm a été utilisé, permettant le transfert des molécules d'adhésion partout sur la surface sauf au niveau des structures. Les molécules d'adhésion de poly-L-ornithine conjuguées au FITC ont été déposées et incubées pendant 5 minutes sur le timbre de PDMS. La goutte est retirée, puis le timbre est séché à l'azote. Ensuite les molécules sont transférées pendant 1 minute sur les lamelles. Des cellules cancéreuses de la prostate (PC3) d'une densité d'environ 30000 cellules/mL ont été déposées sur les lamelles microstructurées par μCP . Après 2 jours d'adhésion dans l'incubateur, les cellules ont été fixées et marquées à la GFP, et les molécules d'adhésion fusionnées au FITC imagées par microscopie à fluorescence. La caractérisation par microscopie à fluorescence permet de voir que les molécules se sont bien déposées sur le verre sauf sur les structures, ce qui correspond au timbre négatif utilisé. De plus les cellules PC3 marquées à la GFP permettent également de voir qu'il y a plus de cellules sur le verre que sur l'or. Les structures semblent disparaître à l'interface verre/or, peut être dû au dépôt des molécules par μCP sur les substrats d'or. En effet, il y a une forte extinction de la fluorescence sur l'or, il est ainsi difficile de dire si les molécules ont été mal déposées sur l'or ou si cette technique d'imagerie n'est pas adaptée (Figure 80).

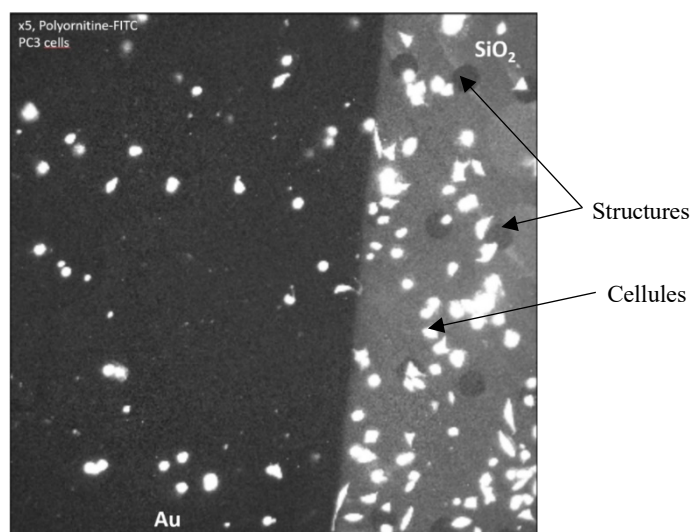
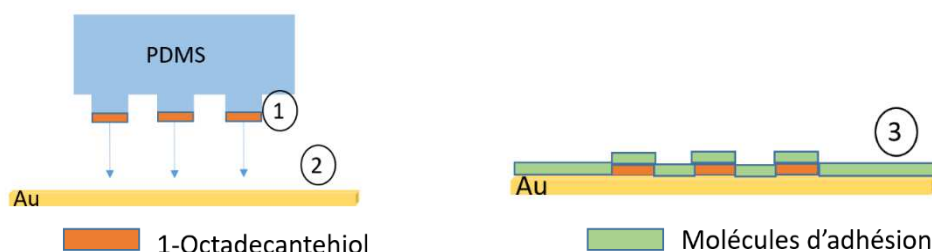


Figure 80: Images de fluorescence d'une lamelle de verre où 30 nm d'or ont été déposés sur une moitié de lame. Les molécules d'adhésion poly-L-ornithine - FITC ont été déposées par μ CP selon un timbre négatif de cercles de 10 μ m à 15 μ m de diamètre. Ensuite des cellules PC3 ont été incubées pendant 2 jours, fixées et observées par microscopie à fluorescence.

Dans cet article écrit par Whitsides *et al.*¹³⁰, les auteurs contolent l'adhésion des cellules sur des substrats d'or en combinant des techniques de chimie de surface et de μ CP. Ainsi, ils commencent par transférer une couche d'alcanethiol permettant une accroche robuste à l'or et ayant un groupement terminal qui peut être substitué selon les applications. En effet, si le groupement terminal de la couche d'alcanethiol est un groupement méthyl, alors les SAMs formés vont promouvoir l'adsorption des molécules d'adhésion à la surface. Si le groupement terminal est un polyéthylène glycol (PEG), alors les SAMs formés bloquent l'adsorption des protéines à la surface. Ainsi, en se basant sur ces travaux, l'hypothèse pour obtenir une bonne microstructuration de la surface d'or pour des objets biologiques, est de déposer une première couche d'alcanethiol selon un timbre structuré. Afin de vérifier cette hypothèse, une couche de 1-octadecanthiol (0.6 mg/mL) a été déposée par μ CP sur les substrats d'or nettoyés selon un timbre PDMS avec des structures en lignes de 2 μ m espacées entre elles par 5 μ m, puis les lames sont incubées dans une solution de molécules d'adhésion de streptavidine – Cy3 (10 mg/mL). Ces expériences test ont été effectuées dans des conditions de culture cellulaire après 24 h dans un incubateur. Les deux stratégies suivantes on été essayées :

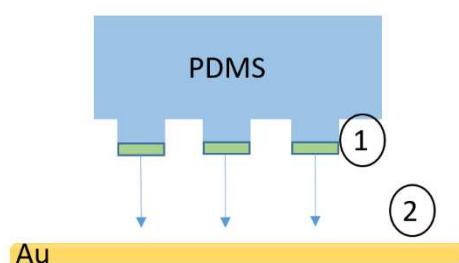
Stratégie1 :

- 1- Incubation du PDMS dans 1-octadecanthiol pendant 30 secondes
- 2- Transfert du 1-octadecanthiol sur les surfaces or pendant 10 minutes
- 3- Incubation de la lame dans une solution de molécules d'adhésion (ici streptavidine-Cy3)



Stratégie 2 :

- 1- Incubation PDMS avec molécules d'adhésion pendant 3 minutes
- 2- Transfert des molécules sur la lame d'or pendant 1 minute



Les images de microscopie par fluorescence montrent que les molécules de streptavidine – Cy3 se sont bien déposées selon les microstructures en ligne (Figure 81). Cependant, il faudrait noter que la solution de streptavidine utilisée ici est très concentrée.

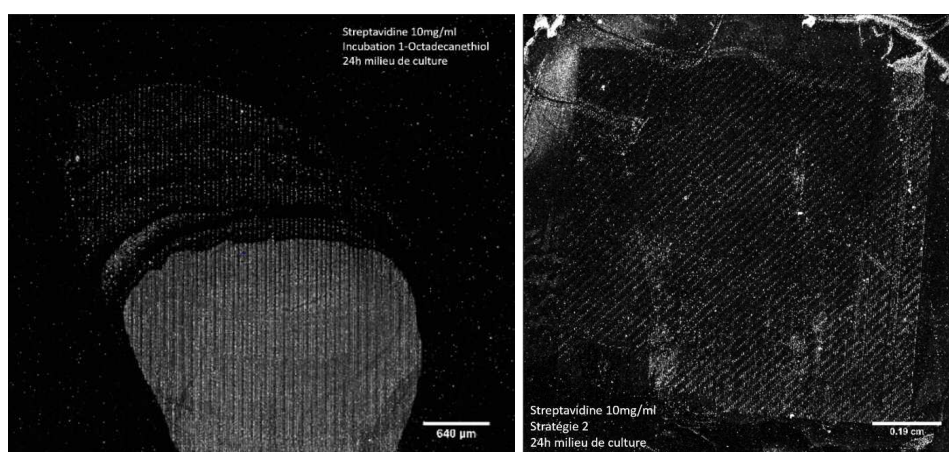


Figure 81: Images de fluorescence des molécules d'adhésion streptavidine - Cy3 déposées par μ CP selon un moule PDMS contenant des microstructures en ligne. L'image de gauche est le résultat de la stratégie 1 et l'image de droite a été obtenue avec la stratégie 2.

L'ensemble de ces résultats observés ont mené à la discussion suivante :

Quelle est l'importance du dépôt d'une première couche d'alkanethiol ?

- ⇒ Vérifier que les molécules adhèrent bien à l'or sans avoir besoin d'un alkanethiol pour rendre l'accroche plus robuste
- ⇒ Lorsqu'une molécule est déposée sur l'or comme la fibronectine ou autre, elles ont tendance à « délaminer » car l'interaction molécule/or se fait pas physisorption, mais en milieu liquide, les molécules ont tendance à se décrocher assez vite.
- ⇒ L'accroche des molécules dépend fortement de la technique de fabrication des lames d'or (pulvérisation or sur verre, ou lames industrielles...) et de leur rugosité.
- ⇒ Pour le μ CP, Lorsqu'on incube des thiols sur du PDMS, les thiols ont tendance à diffuser tout au long de l'épaisseur du timbre. Ainsi il faut que le transfert dure plus longtemps afin d'optimiser le dépôt de thiols sur le substrat d'or par μ CP.

Quelle chimie de surface choisir ?

- En plus de vouloir créer un pont thiol S-H entre la molécule et la lame d'or, on peut également faire une liaison avec un pont disulfure S-S¹⁰².
- Le choix des molécules de passivation va dépendre de la chimie choisie : PEG-SH de longueur de chaînes différentes, Dextran, MUA ou Pluronic.
- Il existe différentes molécules d'adhésion : Les molécules d'adhésion dont la densité est élevée ont tendance à changer leur configuration dans l'espace comme fibronectine. Il est préférable d'utiliser le peptide RGD.

Quelles cellules utiliser ?

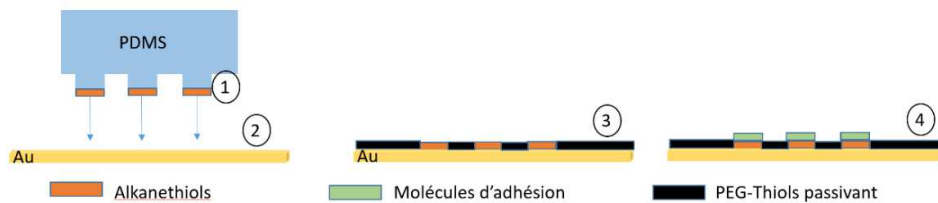
- Il faudrait être sûrs que les cellules que utilisées développent rapidement des jonctions entre elles et avec le substrat
- Concernant les cellules individuelles, elles ont tendance à très vite dépasser les motifs géométriques auxquels elles sont contraintes. Il faudrait alors contrôler les paramètres de croissance pour savoir quand il faudrait faire les mesures.

Autres informations :

- Afin de pouvoir identifier facilement si les molécules se sont déposées, idéalement travailler avec des molécules fluorescentes, même sur l'or, on peut utiliser le scanner de fluorescence des lames.
- Concernant la géométrie, il faudrait essayer de laisser un petit espace entre les hexagones pour que les cellules puissent créer des adhésions entre elles.
- Il faut que le substrat d'or soit rugueux afin que les cellules aiment y adhérer.

L'ensemble de ces expériences a permis d'établir une stratégie pour microstructurer les substrats d'or par μ CP pour contrôler l'adhésion cellulaire :

- 1- Fabrication moules et timbres PDMS avec structures souhaitées (1)
- 2- Après avoir vérifié si besoin d'une première couche d'alkanethiol pour rendre l'accroche des molécules d'adhésion plus robuste ; Incubation timbres PDMS dans hexadecanethiol ou 1-Octodecanethiol. (1)
- 3- Transfert de l'Alkanethiol sur la lame d'or (2)
- 4- Incubation de la lame d'or dans mélange de PEG-SH qui s'orientera préférentiellement sur l'or grâce à terminaison SH. (3)
- 5- Incubation de la lame dans des molécules d'adhésion (peptide RGD) qui vont se déposer sur l'alkanethiol car le reste de la surface est passivé. (4)

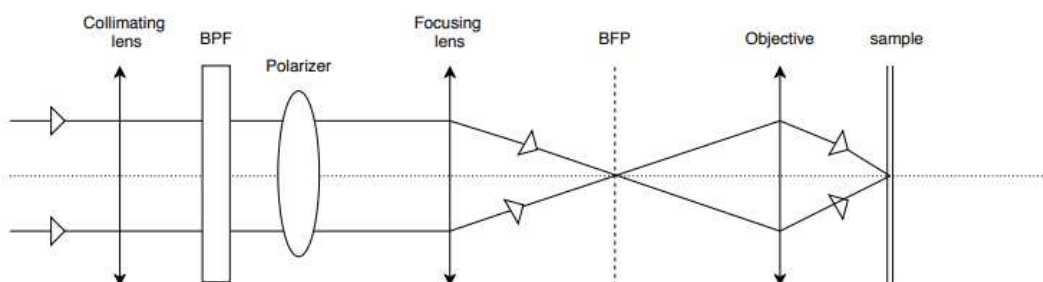


Le microcontact printing présente quelques inconvénients qui rendent son utilisation difficile. En effet, il y a très peu de contrôle sur les étapes de transfert où il n'y a pas d'informations sur le bon dépôt des molécules d'intérêt à la surface du substrat. Ainsi, l'adhésion des protéines et des cellules est moins spécifique à la surface. En parallèle de ces expériences, des tests pour la microstructuration de surface par illumination DUV ont été effectués sur des substrats de verre pour commencer afin de vérifier la robustesse de cette technique. La technique de microstructuration par illumination DUV a été sélectionnée et ainsi un protocole de microstructuration a été développé avec une première étape de chimie de surface adaptée aux substrats d'or. Ces résultats sont présentés dans ces travaux de thèse.

SECTION 3: OPTIMISATION DU MICROSCOPE SPR

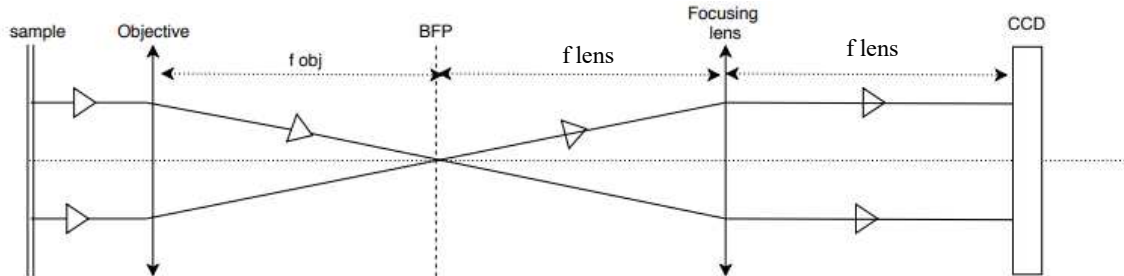
En théorie, le microscope SPR utilisé dans ces travaux de thèse¹¹³ peut être décomposé en deux chemins optiques différents :

- 1- Chemin optique de la lumière incidente de la source lumineuse à l'échantillon :



Afin de focaliser les faisceaux lumineux au niveau du plan focal arrière de l'objectif (BFP), il faut que ce dernier soit placé au niveau du plan focal image de la 'Focusing lens 1'. À la sortie de l'objectif, le faisceau converge sur l'échantillon.

2- Chemin optique de la lumière réfléchi de l'échantillon à la caméra CCD :



Les faisceaux réfléchis par l'échantillon passent à travers la lentille de l'objectif et convergent au niveau du plan focal arrière de l'objectif (Figure 82). Cet assemblage des 2 lentilles convergentes (objectif + Focusing lens 2) peut être comparé au système du microscope. À la sortie de la focusing lens 2, l'image secondaire est formée à l'infini. Mais pour cela, il faut que le plan focal arrière de l'objectif (BFP) (ou plan focal image) soit au niveau du plan focal objet de la focusing lens 2. De plus, la focusing lens 2 devrait permettre de conjuguer l'interface métallique avec la caméra CCD, ainsi la caméra doit être placée au niveau du plan focal image de la focusing lens 2. Ainsi, en prenant en compte toutes ces informations, il faudrait placer la lentille focusing lens 2 à la distance focale $f_{obj} + f_{lens}$. Il est possible de calculer la longueur focale de la lentille de l'objectif :

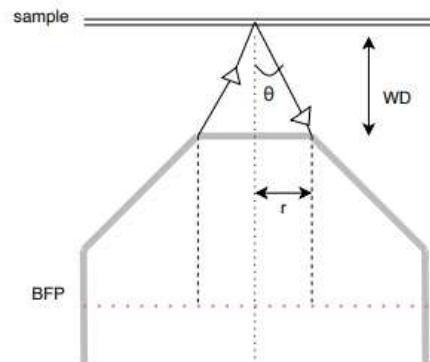


Figure 82: Schéma de l'angle réfléchi par l'échantillon vers l'objectif formant un angle θ à l'interface. r est le rayon de l'annulus au niveau du BFP de l'objectif.

L'angle incident θ de la lumière à l'interface entre l'échantillon et l'objectif peut être calculé tel que :

$$\theta = \text{asin}\left(\frac{r}{ni * f}\right) \iff f = \frac{r}{ni * \sin\theta}$$

Avec r : le rayon de l'annulus au niveau du plan focal arrière de l'objectif

n_i : l'indice de réfraction du milieu entre l'objectif et l'échantillon

f : la distance focale de la lentille

De plus, à partir de la Figure 82 :

$$\sin \theta = \frac{r}{WD} \iff r = WD * \sin \theta \iff \boxed{f = \frac{WD}{ni}}$$

Avec WD la distance de travail fournie par l'objectif.

Ainsi, pour reproduire un système afocal avec les lentilles de l'objectif et la lentille convergente appelée ici focusing lens 2, il faudrait calculer la longueur focale de l'objectif f_{obj} à partir des informations que de l'objectif (x63, $NA = 1.46$). Ceci va permettre de déterminer la position du BFP de l'objectif. Dans un premier cas où la lumière provient de la source vers l'échantillon, il faudra que le BFP soit exactement positionné sur le plan focal image de la focusing lens 1. Dans un deuxième cas, où la lumière réfléchie par l'échantillon est transmise à la caméra, il faudrait que le BFP de l'objectif soit exactement positionnée au plan focal objet de la lentille focusing lens 2. Des tests expérimentaux peuvent être effectués afin de quantifier l'ampleur de la dispersion. En effet, la lentille L2 peut être bougée verticalement déplaçant ainsi son foyer. Des images prises durant ces déplacements permettront de quantifier directement l'effet de ce paramètre.

Lien entre la théorie et la pratique

D'après la thèse d'Emmanuel Maillart (page 107), si la position du BFP de l'objectif n'est pas positionnée au niveau du plan focal objet de la lentille focusing lens 2, cela peut générer des décalages qui vont être traduits lors de la mesure initiale de la réflectivité du film d'or en fonction de l'angle d'incidence, par une dispersion apparente des conditions de résonance d'une extrémité à l'autre de la partie éclairée de l'interface.

SECTION 4 : AUTRES RESULTATS DE MESURE DES REPONSES CELLULAIRES PAR SPRI

I- Marquages des noyaux des cellules vivantes pour l'imagerie SPR

Afin de vérifier que les groupes dans les assemblages à 3 hexagones ont exactement 3 cellules qui ont adhéré (1 cellule par microstructure), les noyaux des cellules EAhy926 ont été marquées en vivant avec le colorant Hoechst. Après 24 h d'adhésion dans l'incubateur selon le protocole décrit dans la Figure 52, les cellules qui ont adhéré et normalement formé des jonctions entre elles sont marquées et incubées avec le colorant

Hoechst pendant 20 min dans l'incubateur de cellules. Ensuite les substrats sont montés dans la micro-chambre fluide puis observés au microscope SPR. Après les cinétiques en SPR, les substrats toujours montés dans la micro-chambre fluide sont observés par microscopie à fluorescence afin de garder la même orientation que les images SPR. En se basant sur des rayures de la lame ou autres débris ou défauts observés en lumière blanche avec le microscope SPR (images en BF prises simultanément que les images SPR), les groupes de cellules dans les assemblages à 3 hexagones imagés en SPRI sont retrouvés. Ainsi, les 2 expériences présentées dans la (Figure 83 – a – b) montrent les images SPRI et la même zone observée avec un microscope à fluorescence avec les cellules en BF et les noyaux marqués au Hoechst. L'observation de ces images et la segmentation des images de fluorescence des noyaux ont permis d'observer que :

- L'imagerie SPR n'a pas la résolution nécessaire pour résoudre le nombre de cellules adhérant dans les groupes de 3 hexagones. En effet qu'il y ait une cellule, ou plus dans les groupes, le même patron d'adhésion est observé en imagerie SPR remplissant tout le groupe de 3 hexagones.
- Le nombre de groupes dans les assemblages à 3 ayant exactement 1 cellule par hexagone est en accord avec les calculs statistiques effectués dans ces travaux de thèse (Figure 40).

Notons que lorsque les cellules dans les assemblages à 3 hexagones répondent à l'injection de la thrombine, elles se contractent et les jonctions intercellulaires sont impactées, ainsi il est possible de supposer le nombre de cellules adhérant dans les groupes de 3 hexagones par imagerie SPR.

Cette expérience a permis de vérifier si les groupes dans les assemblages à 3 observés en SPR contiennent 1 cellule par hexagone. Cependant, cette expérience est difficile expérimentalement car il est difficile de retrouver les groupes de cellules qui ont été observés par SPR, à la fin de l'expérience avec un autre microscope avec un grossissement différent. De plus, l'utilisation de marqueurs fluorescents pourrait altérer physiologiquement les cellules et donc leur réponse à la thrombine.

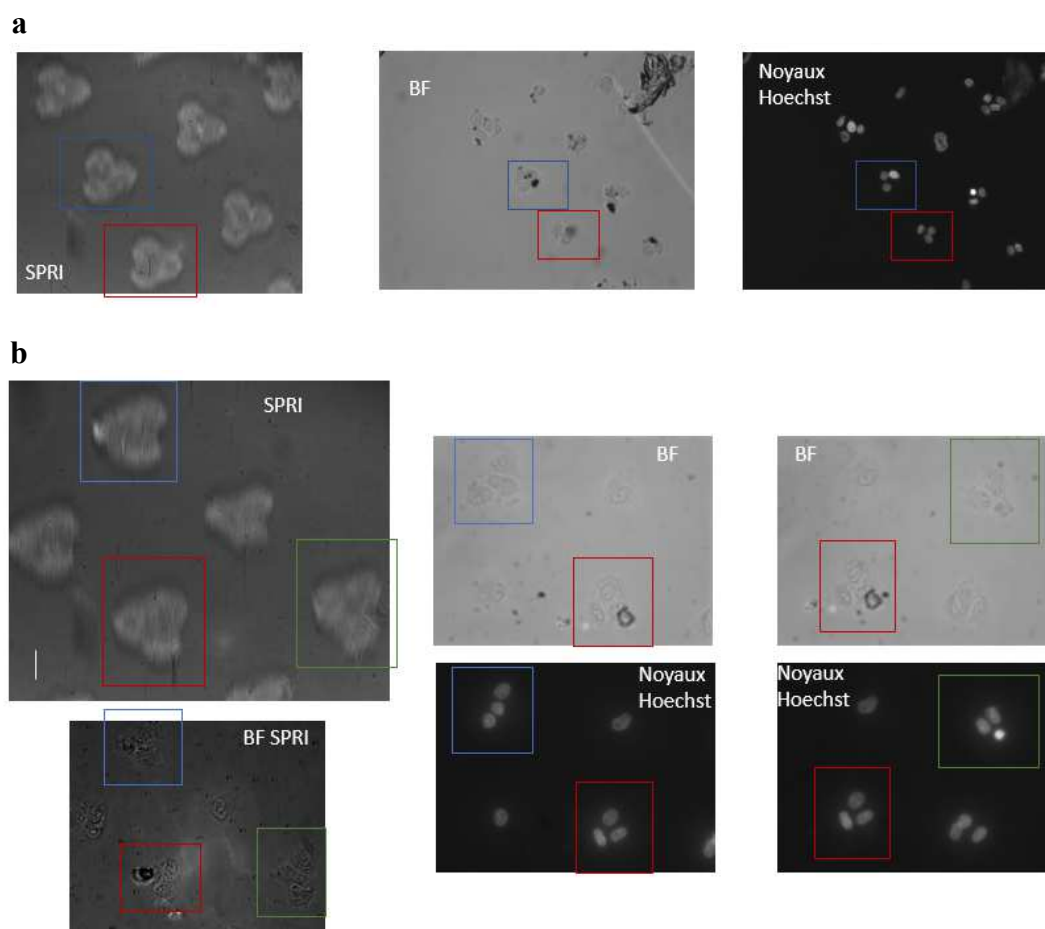


Figure 83 : Groupes de cellules dans les groupes de 3 hexagones observés par microscopie SPR pour 2 expériences différentes (a et b). Ces groupes ont ensuite été observés par microscopie à fluorescence afin de compter le nombre de noyaux dans les groupes. Pour l'expérience (b), l'image BF prise simultanément que l'image SPR (BF SPRI) avec le microscope SPR. Toutes les autres images BF et de fluorescence ont été acquises avec un microscope Zeiss Axiovert 200 inversé disponible à l'IPS à Sherbrooke.

II- Mesure de la réponse des cellules dans les assemblages à 3 hexagones après injection de LPS

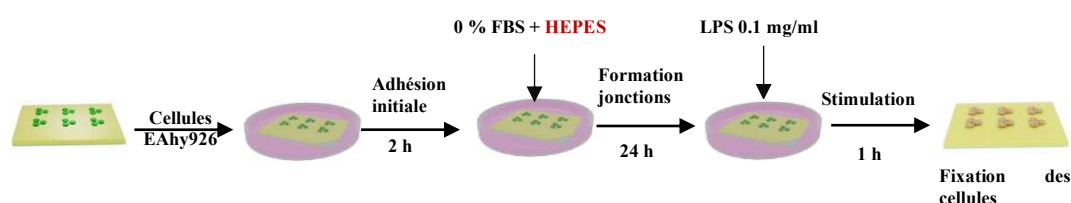
A- Réponse de la monocouche cellulaire endothéliale au LPS

Le LPS ou lipopolysaccharide est une endotoxine connue pour être la composante essentielle de la paroi bactérienne des bactéries à Gram-négatif. Le LPS est souvent utilisé dans les modèles expérimentaux de choc septique car son injection reproduit l'ensemble des signes cliniques et des conséquences biologiques. Il est décrit dans la littérature comme un déclencheur d'apoptose¹³¹ entraînant des dysfonctions endothéliales¹³².

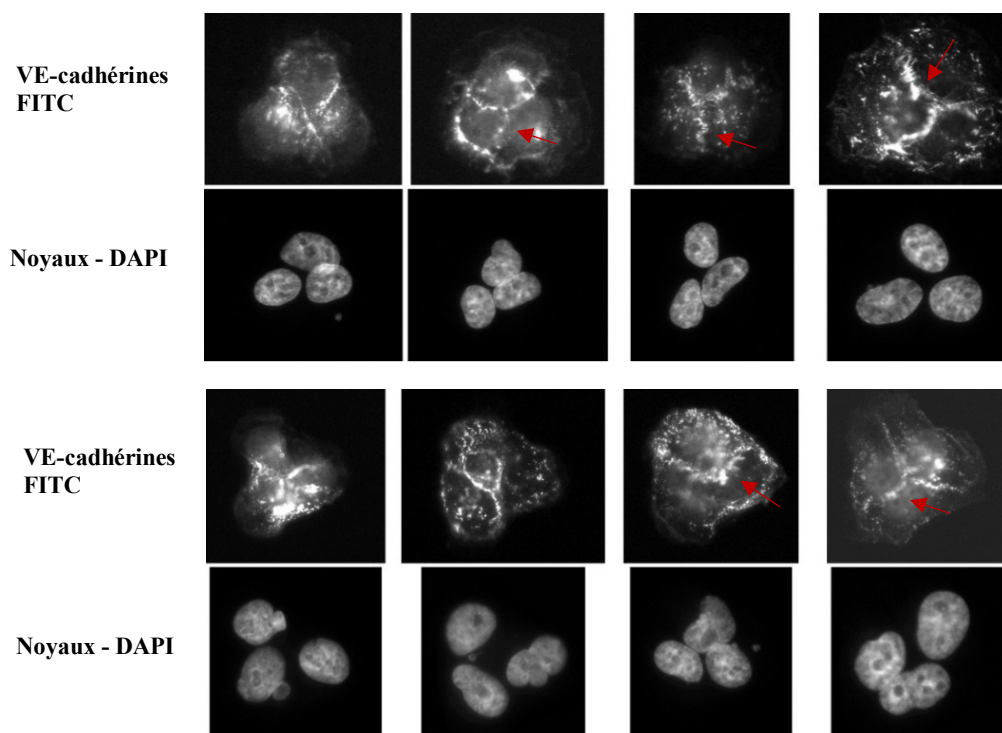
B- Marquage des jonctions endothéliales après stimulation des groupes de 3 hexagones avec le LPS

Les résultats suivants sont décrits dans la partie annexe car ils a été difficile d'en sortir des résultats concluants. Les expériences ont été effectuées selon le protocole décrit dans la Figure 84 – a où les cellules dans les groupes de 3 hexagones ayant adhéré pendant 24 h dans l'incubateur ont été fixées puis observées par microscopie à fluorescence après incubation dans 0.1 mg/mL de LPS. Ainsi, 8 groupes de 3 hexagones sont montrés dont les jonctions et les noyaux ont été marqués après 1 h d'incubation dans le LPS. Le marquage des noyaux permet de confirmer la présence de exactement 1 cellule par hexagone dans les groupes de 3, tandis que le marquage des jonctions permet d'évaluer l'impact de l'injection de LPS. En effet, en comparaison avec les images obtenues dans la Figure 48, les jonctions semblent impactées avec des zones où le signal de fluorescence semble diffus (flèches rouges) (Figure 84 – b).

a



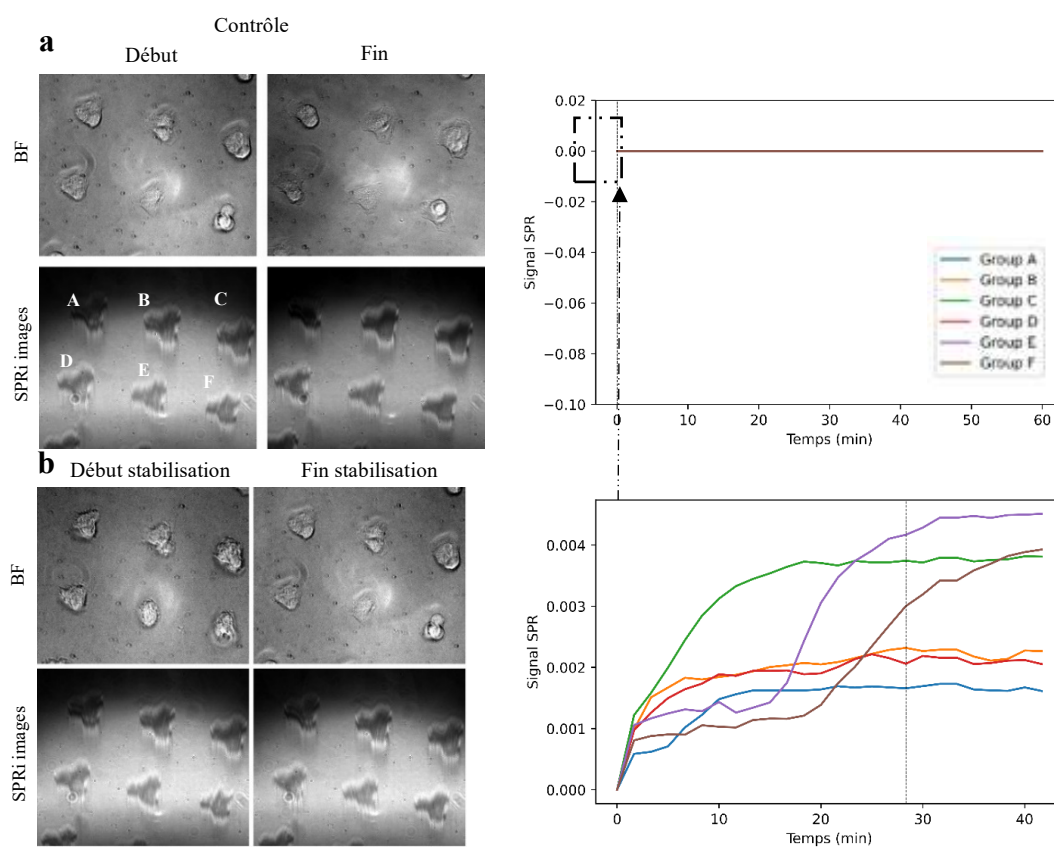
b



*Figure 84: Cellules dans les groupes de 3 hexagones de 30 μm de diamètre, espacés de 3 μm . **a)** protocole de fixation des cellules après 24 h d'adhésion dans l'incubateur. **b)** Les cellules sont fixées après injection de 0.1 mg/mL de LPS pendant 1 h, et les jonctions VE-cadhérines ont été marquées avec CD144 conjugué au FITC et les noyaux ont été marqués au DAPI.*

C- Quantification de la réponse cellulaire au LPS des groupes de 3 hexagones par microscopie SPR

L'injection de LPS a été quantifiée en temps réel avec le microscope SPR. Ici est présentée la cinétique des groupes de cellules dans les assemblages à 3 hexagones après injection de différentes concentrations de LPS (0.5 mg/mL, 0.1 mg/mL) et une expérience de contrôle où rien n'a été injecté avec un zoom sur la durée de 40 minutes de stabilisation des cellules avant injection. L'expérience de contrôle montre un signal stable des cellules tout au long de la durée de l'expérience de 60 minutes (même échelle en y pour toutes les expériences). De plus, sont également représentées les courbes correspondant au temps de stabilisation des cellules pendant 40 minutes avant la cinétique montrée dans la Figure 85 – a – b. L'injection de LPS à 0.5 mg/mL et 0.1 mg/mL montre une réponse très hétérogène des groupes de cellules. En effet, certains groupes semblent répondre plus que d'autres, comme le groupe E dans la Figure 85 – c où les cellules se sont détachées du substrat. L'ensemble de ces résultats est difficile à expliquer mais montre une réponse des cellules à l'injection de LPS. Cependant, il aurait fallu refaire ces expériences avec un nouveau lot de LPS (à recommander car celui-ci était un peu vieux) ou avec des concentrations plus élevées.



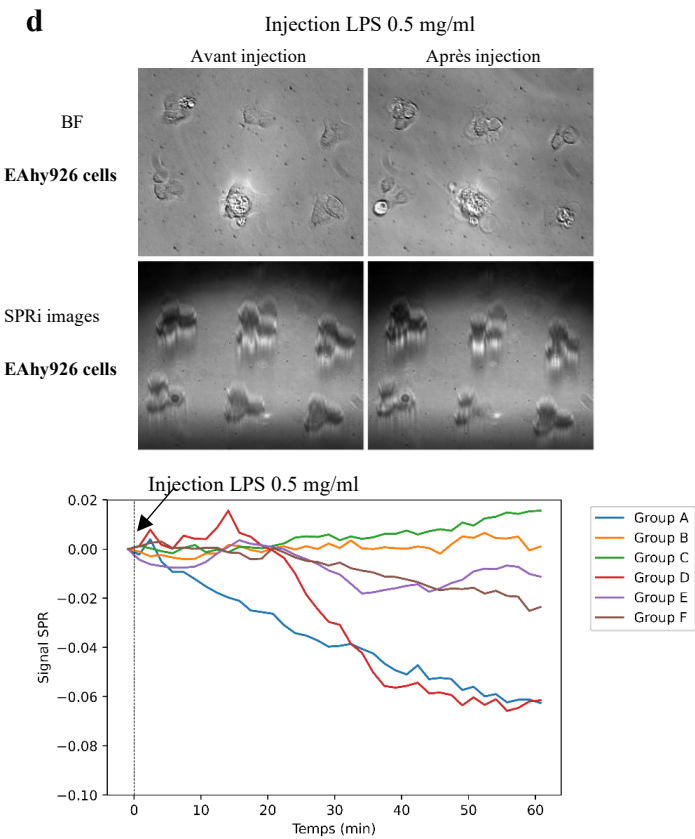
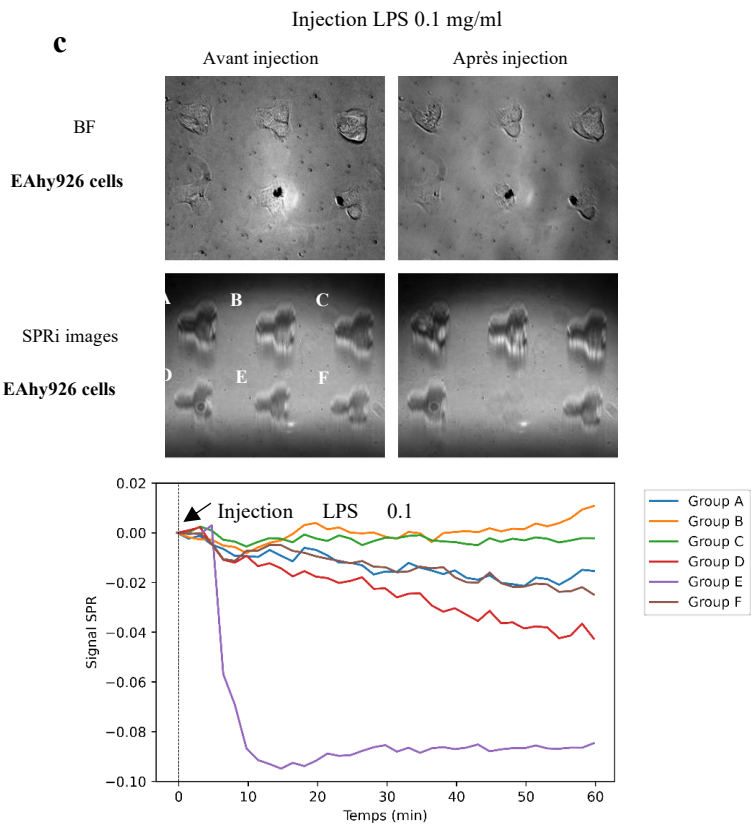


Figure 85: Cinétiques des groupes de 3 hexagones après injection de différentes concentrations de LPS. Pour chaque expérience, les images BF et les images SPR sont prises simultanément avant et après injection de LPS. Pour toutes ces expériences, le signal SPR moyen est représenté pour chaque groupe de 3 hexagones isolés (Matériels et méthodes). **a)** Contrôle sans aucune injection de LPS. **b)** Stabilisation des cellules avant injection de LPS. Zoom sur la courbe de contrôle. **c)** Injection de 0.1 mg/mL de LPS. **d)** Injection de 0.5 mg/mL de LPS.

SECTION 5 : RESULTATS PRELIMINAIRES DE FUTURS TRAVAUX

I- Résultats des assemblages à 7 hexagones

Des tests ont été effectués sur des assemblages à 7 hexagones, avec une cellule centrale et 6 cellules autour (Figure 86). Tout d'abord les paramètres de confinement des cellules endothéliales individuelles EAhy926 dans les assemblages à 7 hexagones ont été étudiés, avant d'évaluer leur capacité à former des jonctions entre elles. Les études effectuées dans le chapitre 3 – section 1 ont permis d'identifier une gamme de surface de régions adhésives pour le types cellulaire EAhy926 pour laquelle le compromis entre un bon rendement des microstructures par les cellules et le confinement d'une cellule par hexagone est respecté. Il s'agit de surfaces entre $406 \mu\text{m}^2$ (diamètre de $25 \mu\text{m}$) et $585 \mu\text{m}^2$ (diamètre de $30 \mu\text{m}$). Les hexagones sélectionnés ont des régions adhésives appartenant à la gamme décrite ci-dessus.

A- Confinement des cellules EAhy926 dans les assemblages à 7 hexagones

Afin d'étudier les paramètres de confinement des cellules dans les assemblages à 7 hexagones, le protocole expérimental correspond à celui mis en place dans les études précédentes sur les assemblages à 3 hexagones. En effet, les études de confinement des cellules dans les hexagones correspondent à l'étude des taux d'occupation des microstructures par les cellules après leur temps initial d'adhésion dans l'incubateur, défini à 2 heures.

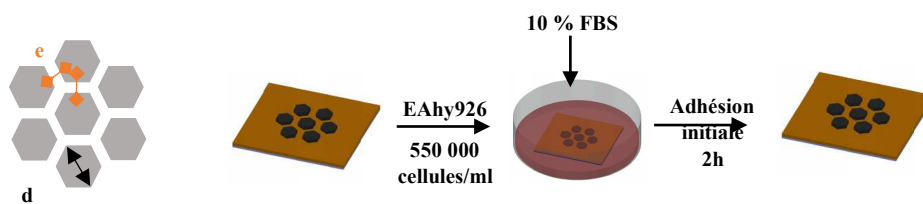


Figure 86: Gauche : Patron du groupe de 7 hexagones définis par leur diamètre (d) et l'espacement entre eux (e). Droite : Protocole expérimental pour l'adhésion initiale de cellules EAhy926 dans les groupes de 7 hexagones.

En se basant sur le protocole expérimental décrit dans la Figure 86, la densité de cellules

est comptée dans les boîtes de pétri à confluence avant de les déposer sur le substrat d'or microstructuré, pour chaque expérience, afin de respecter une densité initiale autour de 550000 cellules/mL dans les assemblages à 7 hexagones. Après 2 h d'adhésion dans l'incubateur dans un milieu de culture contenant 10 % de FBS, les cellules sont fixées, et leurs noyaux marqués au DAPI, afin de compter le nombre de cellules dans les assemblages à 7 hexagones.

Les hexagones sélectionnés ont des surface adhésives égales à $585 \mu\text{m}^2$ (diamètre de $30 \mu\text{m}$) dans des assemblages de 7 hexagones avec différents espacements : $3 \mu\text{m}$, $6 \mu\text{m}$ et $9 \mu\text{m}$ entre les hexagones. Ainsi, la distribution du nombre de cellules dans les assemblages à 7 hexagones est quantifiée en fonction des espacements entre ces derniers.

Le marquage des noyaux des cellules dans les groupes de 7 hexagones permet de les compter et de vérifier la distribution au sein des groupes. En effet, même si 7 cellules sont comptées dans un groupe de 7 hexagones, il est possible que ça ne corresponde pas à 1 cellule par hexagone. Le marquage permet de situer où se trouvent exactement ces cellules : est-ce une cellule par hexagone ? il y a-t-il des hexagones vides ? Il y a-t-il des divisions dans d'autres hexagones ?

Il a été observé que dans les assemblages à 7 hexagones, la probabilité d'obtenir une cellule par hexagone augmente en fonction des espacements. Plus les espacements sont grands, plus on observe 1 cellule par hexagone dans les assemblages à 7. De plus, le marquage des noyaux pour les espacements de $3 \mu\text{m}$ ne montre aucun groupe où on observe une cellule par hexagone dans les assemblages à 7. Pour les espacements de $6 \mu\text{m}$, le marquage des noyaux montre des groupes plus denses en cellules avec 2 groupes sur 24 où on observe 1 cellule par hexagone dans les groupes de 7. Pour les espacements à $9 \mu\text{m}$, le marquage des noyaux permet de voir qu'il y a 7 groupes sur 24 où on observe 1 cellule par hexagone (Figure 87 – a). La distribution des cellules dans les groupes de 7 hexagones en fonctions des espacements entre ces derniers montre que cette distribution est multimodale pour tous les espacements avec une grande variance. Les probabilités d'obtention de 7 cellules (représenté par la ligne en pointillés grise) est faible pour tous les espacements entre $0 \mu\text{m}$ et $7 \mu\text{m}$. Pour les espacements à $8 \mu\text{m}$ et $9 \mu\text{m}$, cette probabilité est plus élevée. Cependant, dans les résultats précédents, ces deux espacements ont été identifiés comme des espacements où les cellules n'établissent pas de contact car elles sont trop éloignées et ne forment pas de jonctions entre elles. Ce graphique montre que le confinement des cellules dans les assemblages à 7 hexagones est plus difficile à obtenir car plus de cellules sont comptées dans les assemblages probablement à cause des divisions et/ou de prolifération des cellules dans certains cas, soit des groupes incomplets avec des hexagones vides dans d'autres (Figure 87 – b).

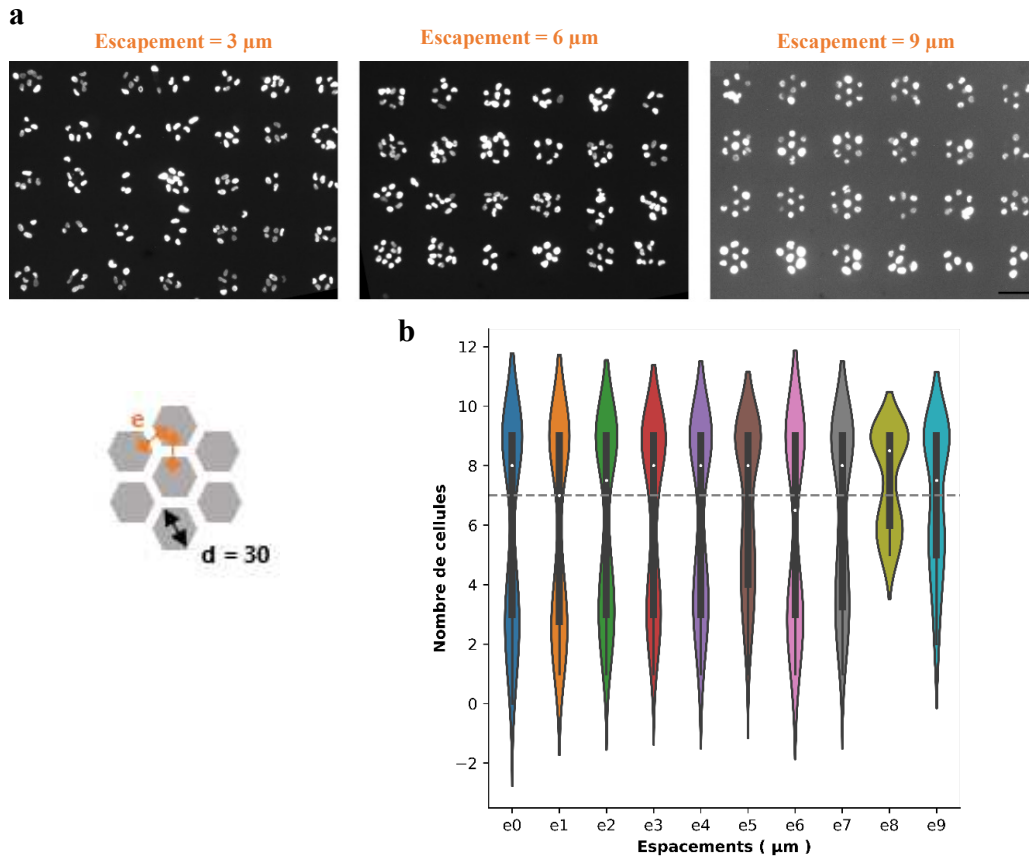


Figure 87: a) Image de fluorescence des noyaux marqués des cellules EAhy926 dans les groupes de 7 hexagones pour les espacements à 3 μm , 6 μm et 9 μm . b) Distribution du nombre de cellules dans les assemblages de 7 hexagones dont les surfaces d'adhésion sont égales à 585 μm^2 en fonction des espacements entre les hexagones. (respectivement le nombre total des groupes de 7 hexagones (N) est égal à 38, 40, 38, 43, 36, 38, 29, 31, 27, 25).

De la même manière, la distribution des cellules est étudiée dans les groupes de 7 hexagones pour des régions adhésives plus petites ou égales à 406 μm^2 mais toujours inclus dans la gamme de confinement identifiée dans les résultats précédents. Un masque différent moins optimisé est utilisé où les groupes sont plus éloignés entre eux, ce qui explique que 9 groupes par images sont observés contrairement aux 24 groupes observés dans la Figure 87. Ces résultats montrent des observations similaires à celles discutées pour les régions adhésives de 585 μm^2 . La probabilité d'obtention d'une cellule par hexagone augmente lorsque les espacements augmentent. La distribution des cellules dans les assemblages à 7 hexagones en fonction des espacements montre une grande variance pour les espacements à 3 μm , 6 μm et 9 μm mais pas de convergence observable autour de 7 cellules. Il est difficile d'obtenir un bon rendement d'occupation des microstructures par les cellules dans les assemblages à 7 hexagones pour deux raisons : soit il n'y a pas assez de cellules qui adhèrent, soit celles qui adhèrent prolifèrent et se divisent (Figure 88).

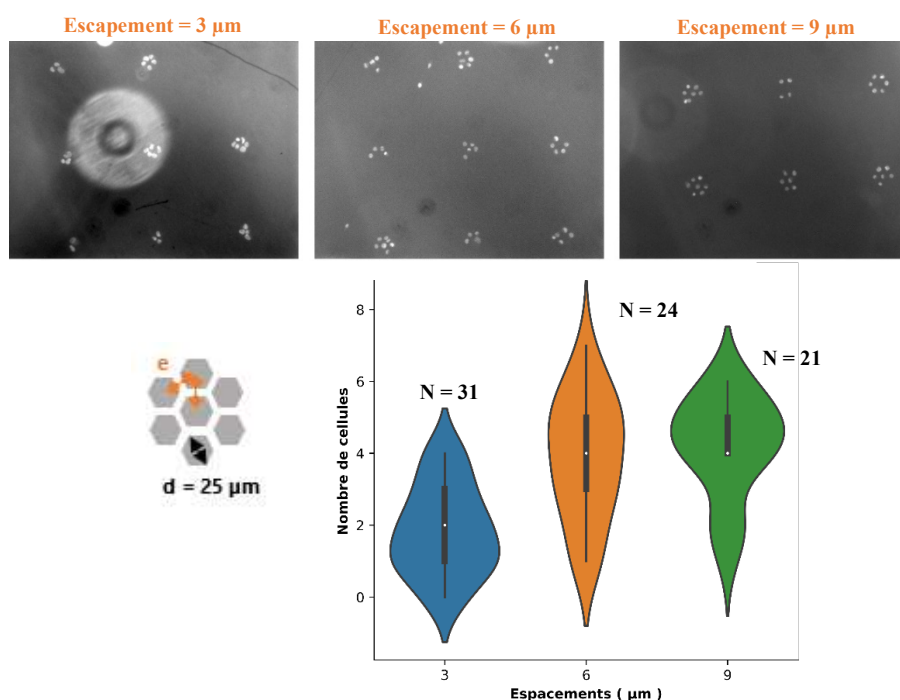


Figure 88: Distribution du nombre de cellules dans les assemblages de 7 hexagones de surfaces adhésives égales à $406 \mu\text{m}^2$ en fonction des espacements entre les hexagones.

B- Formation des jonctions entre les cellules dans les assemblages à 7 hexagones

Il est difficile de contrôler les cellules dans les groupes de 7 hexagones. Il faudrait trouver les paramètres de confinement optimaux pour obtenir le confinement d'une cellule individuelle par hexagone. La probabilité de confinement des cellules au sein des microstructures est très faible pour les assemblages à 7 hexagones dans les conditions choisies. Afin de vérifier si les cellules formaient des jonctions entre elles, le même protocole que celui utilisé pour les groupes de 3 hexagones a été effectué. Après un temps initial de 2 h d'adhésion, le milieu de culture cellulaire à 10 μ de FBS est changé en un milieu de culture contenant 0 % de FBS. Puis les cellules sont laissées 24 h dans l'incubateur pour la formation des jonctions (Figure 89 – a). Lorsque les cellules sont fixées dans les assemblages à 7 hexagones de régions adhésives égales à $406 \mu\text{m}^2$ (diamètre de $25 \mu\text{m}$) espacés de $9 \mu\text{m}$ et leurs noyaux marqués soit après 2 h d'adhésion initiale soit après 24 h dans l'incubateur, le nombre de cellules dans les groupes de 7 hexagones semble augmenter. En effet, après 2 h d'adhésion dans l'incubateur, il y a 2 groupes sur 6 où 7 cellules sont comptées dans les 7 hexagones, tandis qu'après 24 h, des groupes incomplets sont observés, soit des groupes contenant plus de cellules à cause de la division (Figure 89 – b).

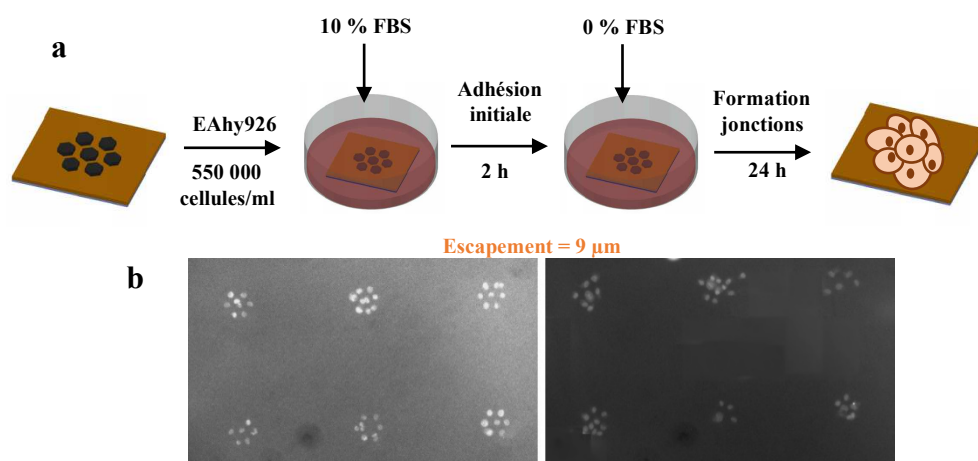


Figure 89: **a)** Protocole expérimental de formation de jonctions pour les groupes de 7 hexagones. **b)** marquage des noyaux pour les groupes de 7 hexagones espacés de 9 µm : à gauche : après 2 h d'adhésion ; à droite : après 24 h d'adhésion dans l'incubateur.

Les jonctions entre les cellules dans les groupes de 7 hexagones de régions adhésives égales à 406 µm² et espacés de 6 µm sont marquées selon le protocole décrit dans la Figure 89 – a. Le marquage des noyaux montre qu'il est difficile d'obtenir 7 cellules dans les assemblages à 7, néanmoins le marquage spécifique des VE-cadhérines montre que ces cellules forment des jonctions endothéliales entre elles (Figure 90).

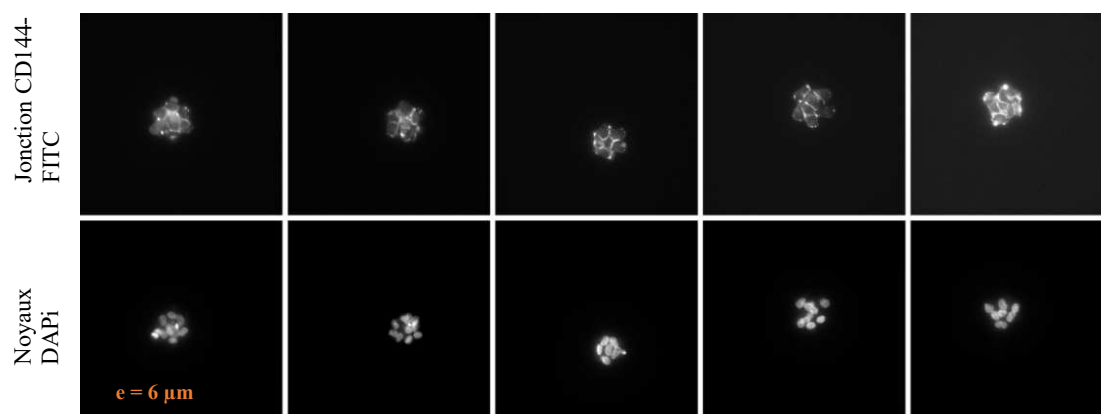


Figure 90: Formation des jonctions entre les cellules dans les assemblages de 7 hexagones de surface égale à 406 µm². Exemples de groupes de 7 hexagones après 24 h d'adhésion dans l'incubateur avec marquage des jonctions et des noyaux. Le marquage des jonctions est effectué par un anticorps monoclonal conjugué au FITC qui se lie spécifiquement aux jonctions VE-cadhérines et les révèle par microscopie à fluorescence.

Il faudrait optimiser toutes les conditions expérimentales afin d'observer et le confinement d'une cellule par hexagone dans les assemblages à 7, et la formation de jonctions entre ces cellules. La Figure 91 montre un exemple optimisé avec 7 cellules comptées grâce au marquage des noyaux qui ont formé des jonctions entre elles au niveau des espacements correspondant aux régions passivées.

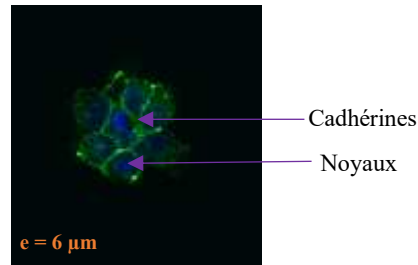


Figure 91: Exemple d'un modèle de groupe de 7 hexagones espacés de 6 µm avec 1 cellule par hexagone. Les jonctions VE-cadhérines sont révélées par un immunomarquage conjugué au FITC (vert) et les noyaux sont marqués au DAPI (bleu).

Comme il a été montré dans le chapitre 4 – section 1 – III, les noyaux des cellules se déplacent vers le centre de la structure globale dans les assemblages à 3 hexagones montrant ainsi une polarité des cellules et une anisotropie avant la formation des jonctions. Dans le cas d'exemple d'un assemblage à 7 hexagones, une des hypothèses est que les cellules vont également se polariser avant la formation des jonctions. Ainsi les 6 cellules dans les 6 hexagones autour de l'hexagone central seraient anisotropes, tandis que la cellule dans l'hexagone central serait la seule à être isotrope et devrait rester placée au centre de l'hexagone. Cette information reste à vérifier dans les assemblages à 7 hexagones mais informe sur l'importance de la polarité des cellules qui pourrait être optimisée pour promouvoir la formation de jonctions entre les cellules dans les assemblages de 7 hexagones ou plus.

C- Perspectives pour les assemblages à 7 hexagones

Problématiques de travail pour les assemblages à 7 hexagones :

Afin de pouvoir fabriquer un modèle cellulaire endothélial in vitro avec des assemblages à 7 hexagones, il faudrait répondre à ces deux problématiques :

- 1) Comment optimiser le rendement d'occupation des microstructures par les cellules dans les assemblages à 7 hexagones pendant le temps d'adhésion initial ?
- 2) Comment réduire la prolifération et divisions cellulaires pendant le temps de formation des jonctions ?

Différentes stratégies ont été proposées pour répondre à ces deux problématiques. La

première consiste à ajouter des agents pharmacologiques afin de réduire la probabilité d'obtention d'un nombre de cellules plus élevé que le nombre d'hexagones dans les assemblages à 7. Il est possible que l'observation de plus d'une cellule par hexagone soit liée à de la division cellulaire. Ainsi, idéalement il faudrait moduler les paramètres expérimentaux de culture cellulaire notamment les pourcentages de facteurs de croissance et les temps d'adhésion et de formation des jonctions dans l'incubateur. La deuxième consiste à moduler les géométries des hexagones, puisque tous les résultats montrés dans ces travaux ont été effectués avec des hexagones pleins, afin d'optimiser les contraintes de bords chimiques et géométriques dans le but de réduire les divisions. La troisième stratégie fait intervenir un flux microfluidique (agiter pour optimiser le dépôt sur le substrat).

1- Agents pharmacologiques

a- Inhibiteur de la Rho kinase (ROCK) et stabilisateur de jonctions S1P

Le renforcement des points focaux d'adhésion ainsi que la stabilité du cytosquelette actine/myosine sont maintenus grâce au contrôle de la polymérisation de l'actine. Les myosines sont une large famille d'ATPases activées par leurs interactions avec les filaments d'actine et agissent comme des fibres de tension. La myosine est présente sous deux formes dans la cellule : phosphorylée forme affine à l'actine ou non phosphorylée forme non associée à l'actine. La phosphorylation de la chaîne légère régulatrice de la myosine est contrôlée par une sous famille de petites G protéines appelée Rho via son effecteur ROCK. Ainsi l'ensemble RhoA/ROCK joue un rôle important dans la formation de fibres de tensions nécessaires pour la contractilité, prolifération et migration cellulaire. Inhiber la protéine ROCK qui est activée par Rho empêche la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine ce qui induit une diminution de la concentration de myosines actives et réduit donc la formation de fibres de stress. Il a été montré que la régulation de l'intégrité des jonctions et la perméabilité de la barrière endothéliale dépendent du contrôle de la dynamique des filaments d'actine par la rho kinase (ROCK)¹⁰. En effet, une forte activité de la ROCK engendre de la contraction cellulaire via des fibres de stress, induisant ainsi des ruptures au niveau des jonctions intercellulaires. Cependant, en plus de jouer un rôle dans un contexte de formation de fibres de stress, la ROCK joue un double rôle dans la régulation de la barrière endothéliale. Ces deux rôles joués par la ROCK semblent contradictoires, mais dépendent du niveau d'activité de ROCK dans les cellules. En effet, il a été démontré que si ROCK présentait une activité basale, alors cette dernière aura pour rôle de maintenir l'intégrité de l'endothélium en régulant les VE-cadhérines¹³³. Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur de la ROCK appelé Y-27632¹³⁴ permet de stabiliser la barrière endothéliale et de maintenir les jonctions intercellulaires¹³⁵. Dans ce cas d'étude, l'utilisation de l'inhibiteur Y-27632 permettrait de réduire l'activité du cytosquelette notamment sa contractilité via la formation de fibres de stress en inhibant la ROCK. Ainsi, on réduirait les divisions cellulaires et on stabiliserait les jonctions formées entre les cellules dans les assemblages d'hexagones. De plus, d'autres études ont identifié un phospholipide actif biologiquement appelé sphingosine-1-phosphate (S1P) défini comme un stabilisateur effectif de la barrière dans les cultures de cellules endothéliales¹³⁶. Ainsi, dans le but de réduire les divisions cellulaires et d'obtenir une

plus grande probabilité d'adhésion de exactement 3 cellules dans les groupes de 3 hexagones, la combinaison de l'inhibiteur Y-27632 et du stabilisateur de jonctions S1P est proposée.

Cependant, il est important de noter que l'ajout d'agents pharmacologiques pourrait altérer le phénotype endothélial des groupes de 3 hexagones, il est donc nécessaire d'évaluer la réponse des cellules à la thrombine comme effectué dans les résultats présentés dans le chapitre 4.

b- Evaluation du phénotype structurel des groupes de 3 hexagones en présence de S1P et Y-27632

Tout d'abord, le phénotype structurel des cellules dans les groupes de 3 hexagones est évalué selon le protocole décrit dans la Figure 92. Pour cette condition expérimentale, les cellules sont fixées et leurs jonctions marquées après 24 dans l'incubateur. Mais contrairement aux résultats où Y-27632 et S1P n'ont pas été ajoutés, les cellules ne forment pas de jonctions entre elles. Les cellules ont alors été laissées 24 h de plus dans l'incubateur soit au total un temps de 48 h pour la formation de jonctions. Ensuite les cellules ont été fixées et leurs jonctions marquées.

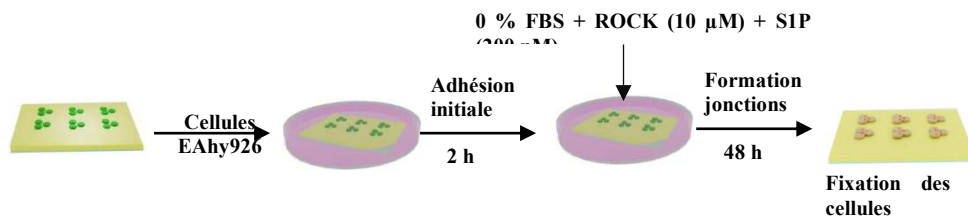


Figure 92: Protocole expérimental de l'adhésion des cellules dans les groupes de 3 hexagones après ajouts de l'inhibiteur de ROCK appelé Y-27632 et le stabilisateur de jonctions S1P.

Après ajout de l'inhibiteur de ROCK : Y-27632 et du stabilisateur de jonctions S1P, les cellules dans les groupes de 3 hexagones forment des jonctions entre elles (Figure 93 – a). Le marquage spécifique des VE-cadhérines selon cette condition expérimentale montre en effet le même résultat qu'observé dans le chapitre 4 section 1 où aucun agent pharmacologique n'est ajouté. La superposition des images de fluorescence des jonctions montre que les cellules dans les groupes de 3 hexagones forment des jonctions entre elles entre les régions adhésives hexagonales au niveau des espacements correspondant à des régions passivées (Figure 93 – b). La méthodologie est la même que celle décrite dans la section matériels et méthodes du chapitre 4.

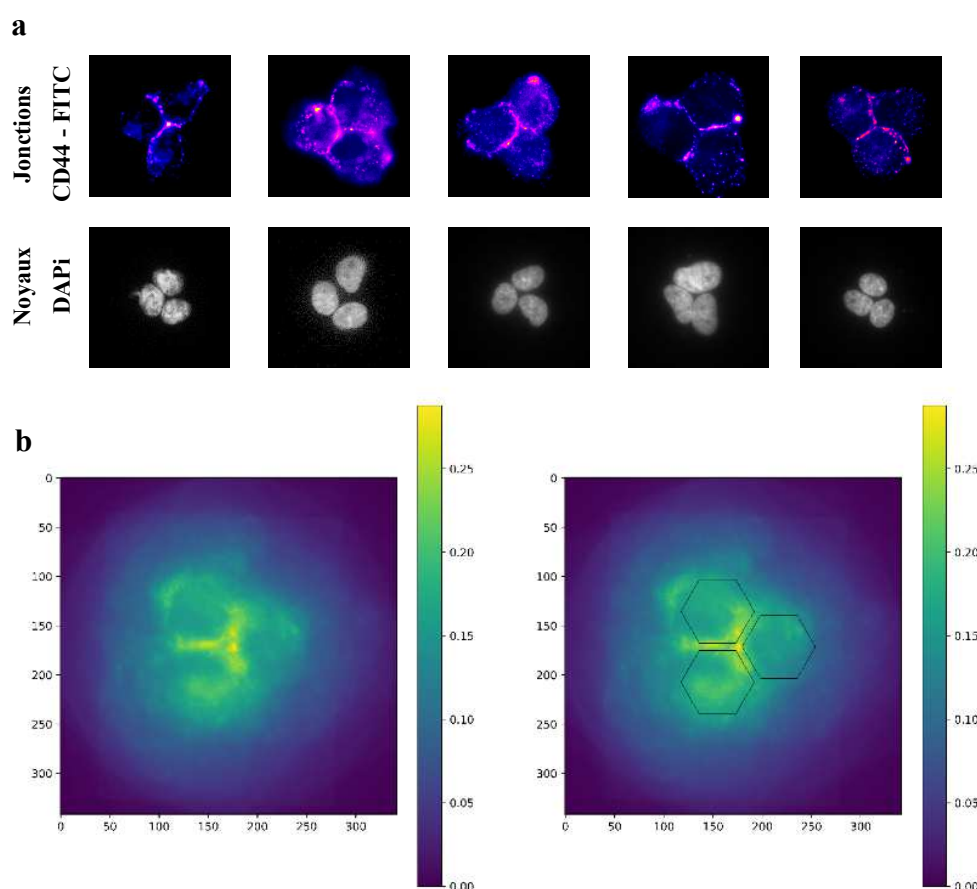


Figure 93: **a)** Images en fluorescence des jonctions cellule/cellule marquées avec un marqueur de VE-cadhérines conjugué au FITC de 5 groupes de 3 hexagones différents après ajout de Y-27632 et S1P. Les hexagones font $30\ \mu\text{m}$ de diamètre et sont espacés de $3\ \mu\text{m}$. Les cellules sont fixées et leurs noyaux sont marqués au DAPI. **b)** Carte d'intensité de la superposition des images de fluorescence des jonctions VE-cadhérines formées entre les cellules dans les groupes de 3 hexagones (diamètre = $30\ \mu\text{m}$, espacement = $3\ \mu\text{m}$). à gauche : carte de la moyenne des intensités de 62 images de fluorescence de jonctions VE-cadhérines de groupes de 3 hexagones. à droite : La carte d'intensité représentée en (a) avec la reconstitution des hexagones estimés du photomasque de microstructuration. Les hexagones sont reconstitués à partir du barycentre des noyaux calculés précédemment et des dimensions théoriques connues des hexagones. Ils sont redimensionnés en fonction de la taille des pixels des images de fluorescence.

Les cellules dans les groupes de 3 hexagones forment des jonctions entre elles dans les conditions expérimentales où Y-27632 et S1P ont été ajoutés. Dans le but de vérifier si l'ajout de ces agents pharmacologiques augmente la probabilité d'obtenir une cellule par hexagone dans les assemblages à 3, le nombre de cellules dans les groupes de 3 hexagones a été compté, avec et sans agents pharmacologiques après formation des jonctions : - 24 h pour les conditions expérimentales où aucun agent pharmacologique

n'est ajouté. – 48 h pour les conditions expérimentales où Y-27632 et S1P ont été ajoutés. Ainsi, après ajout de Y-27632 et S1P, il a été observé que 60 % des groupes de 3 hexagones de la population quantifiée présentent exactement 3 cellules dans les assemblages à 3. Tandis que dans l'autre condition expérimentale où aucun agent pharmaceutique n'est ajouté, environ 30 % des groupes de 3 hexagones présentent exactement 3 cellules dans les assemblages à 3 (Figure 94). Ainsi, l'ajout de Y-27632 et S1P semble réduire les divisions cellulaires en réduisant la dynamique du cytosquelette mais sans empêcher les cellules de former des jonctions entre elles.

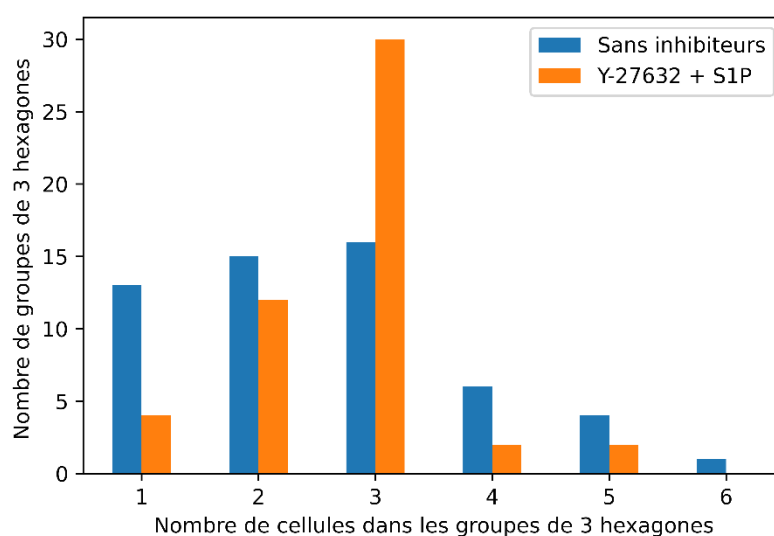


Figure 94: Distribution du nombre de cellules dans les groupes de 3 hexagones après formation des jonctions : sans ajout des inhibiteurs de la ROCK et du stabilisateur de jonctions ($N = 55$ groupes de 3 hexagones) et avec ajout de Y-27632 et S1P ($N = 50$ groupes de 3 hexagones).

Cependant, il ne suffit pas uniquement de réduire la division cellulaire. En effet, il faudrait vérifier le phénotype dynamique des groupes de 3 hexagones après stimulation par la thrombine afin de comparer ces résultats à ceux décrits dans la littérature et observés dans les résultats précédents.

c- Evaluation par SPRI du phénotype dynamique des groupes de 3 hexagones en présence de S1P et ROCK

Après avoir démontré que les cellules dans les groupes de 3 hexagones formaient des jonctions entre elles après 48 h dans l'incubateur dans des conditions expérimentales où Y-27632 et S1P ont été ajoutés, les réponses cellulaires sont évaluées, par imagerie SPR, après stimulation par la thrombine (Figure 95 – a). Lorsque la thrombine est injectée à 1 U/mL, les cellules répondent directement avec une décroissance du signal SPRi pour la durée totale de l'expérience. Les images en BF et en SPR de l'avant et l'après injection, montrent que les cellules répondent à l'injection de la thrombine avec une perte d'adhésion au niveau de certains groupes de 3 hexagones (Figure 95 – b). La réponse cellulaire mesurée est différente de celle observée dans les résultats présentés

plus haut (Figure 58) où aucun agent pharmacologique n'a été ajouté. En effet, dans la condition expérimentale où Y-27632 et S1P ont été ajoutés, la décroissance du signal SPR n'est pas suivie par un lent rétablissement, mais le signal des cellules baisse jusqu'à ce que les cellules dans certains groupes (C et E) se détachent. Cette réponse est également différente que celle mesurée pour des cellules endothéliales dans un tissu confluent après injection de la thrombine à une concentration de 1 U/mL. Il est difficile de conclure sur ces observations et résultats. En effet, il aurait fallu refaire ces expériences et vérifier la significativité des réponses cellulaires observées ici. De plus, pour le moment, on pourrait dire que l'ajout d'agents pharmacologiques permet la formation de jonctions pour les cellules dans les groupes de 3 hexagones avec une bonne probabilité mais sans aucune affirmation que les réponses cellulaires mesurées par imagerie SPR sont représentatives d'une monocouche cellulaire endothéliale.

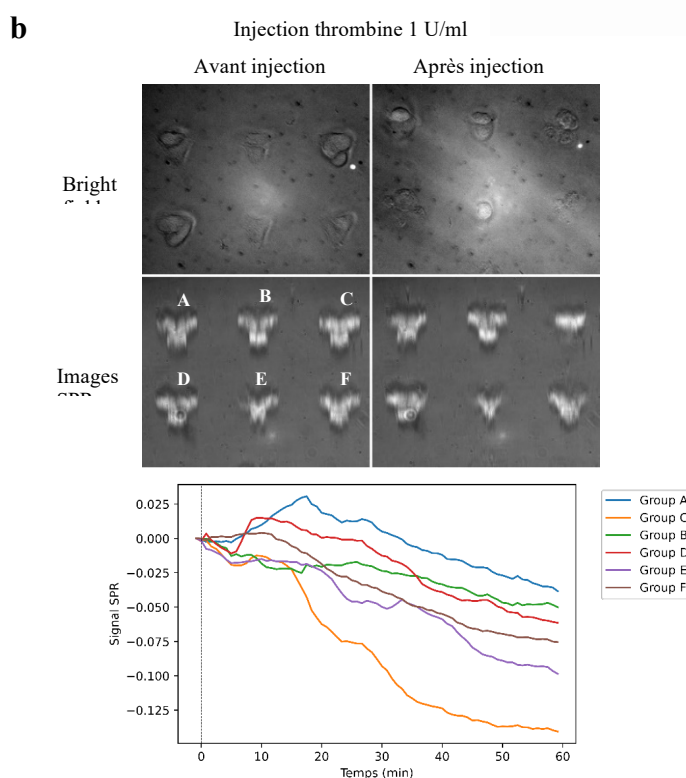
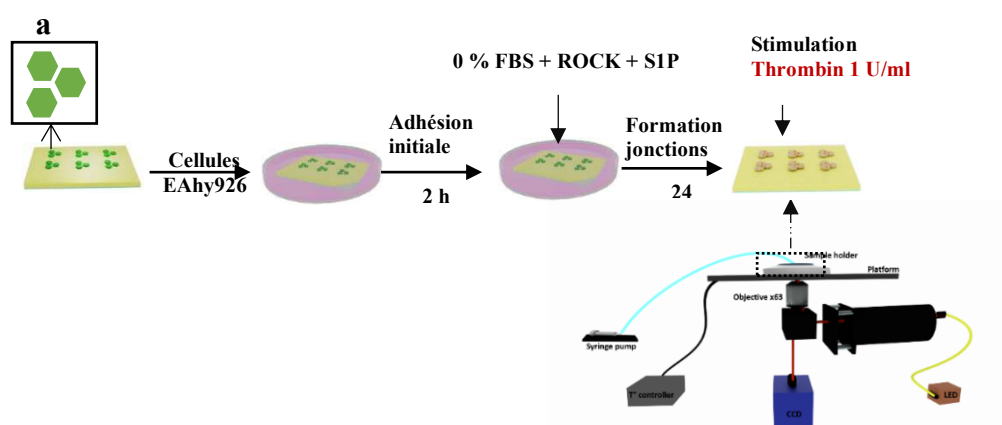


Figure 95: Cinétique des cellules dans les groupes de 3 hexagones après ajout de Y-27632 et S1P au cours du temps. a) protocole expérimental et imagerie par microscopie SPR des groupes de 3 hexagones. b) à gauche : images BF et SPR prises simultanément avant et après injection de la thrombine (1 U/mL). à droite : évolution du signal SPR au cours du temps pour chacun des 6 groupes de 3 hexagones.

L'utilisation des agents pharmacologiques tels l'inhibiteur de ROCK Y-27632 et le stabilisateur de jonctions S1P permettrait de réduire la division et la prolifération cellulaire pour les cellules dans les groupes de 3 hexagones. Cependant, leur utilisation pour la fabrication d'un modèle de monocouche cellulaire endothéliale *in-vitro* sur une biopuce reste à vérifier. En effet, il est possible que l'ajout des agents pharmacologiques impacte la fonctionnalité de la monocouche fabriquée artificielle qui ne répondrait pas comme un tissu endothélial. Il est important d'évaluer le phénotype fonctionnel des cellules dans les groupes d'hexagones afin de confirmer leur phénotype endothélial et leur utilisation comme un modèle de monocouche cellulaire endothéliale *in vitro*.

2- Modulation des géométries des microstructures

Les cellules sont sensibles à leur microenvironnement et s'adaptent en fonction des contraintes géométriques et chimiques des substrats sur lesquels elles adhèrent. Dans ces travaux de thèse, les microstructures correspondent à des hexagones pleins. Mais la modulation des géométries des microstructures pourrait aussi avoir un impact sur l'optimisation du rendement d'occupation des microstructures par les cellules et de la réduction de la division cellulaire ?

La modulation des patrons géométriques permet l'analyse des mécanismes gouvernant la détermination de la morphologie cellulaire en réponse aux conditions de l'environnement extracellulaire. Ainsi, Théry et al. ont étudié la distribution des fibres de stress des cellules adhérant sur des substrats microstructurés par microcontact printing⁵⁴. Ainsi, ils ont démontré que les cellules modulent leur cytosquelette en réponse aux géométries des patrons adhésifs. L'acquisition de la géométrie des cellules suit 2 étapes :

La cellule forme des contacts avec le patron adhésif : les contacts formés par la cellule au niveau des extrémités distales définissent les « sommets » de la géométrie de la cellule.

Les bords de la cellule formés entre chaque sommet se déplacent de façon à minimiser la distance entre les deux sommets

La localisation des points focaux d'adhésion a été démontrée grâce à un immunomarquage avec un fluorophore spécifique de la vinculine une protéine associée au cytosquelette qui permet de faire le lien entre les intégrines et les filaments d'actine. Ainsi, il a été démontré que ces points focaux d'adhésion sont formés au niveau des sommets et des extrémités distales des géométries (Figure 96 – b). Les régions entre

deux sommets correspondent à des régions passivées non adhésives. Au niveau de ces zones, les cellules forment des fibres de stress révélées par un marquage spécifique des filaments d'actine (Figure 96 – c). Ces fibres correspondent à de fortes fibres de stress contractiles formées au niveau des sommets des géométries afin de minimiser l'énergie de surface des cellules. Des régions complètement adhésives ne permettent pas de séparer la morphologie des cellules de leur adhésion sur les substrats. Ainsi, l'analyse de l'adhésion des cellules sur des régions microstructurés montre l'impact de la géométrie des microstructures sur la morphologie des cellules, l'architecture de leur cytosquelette et la mise en place de la polarité cellulaire.

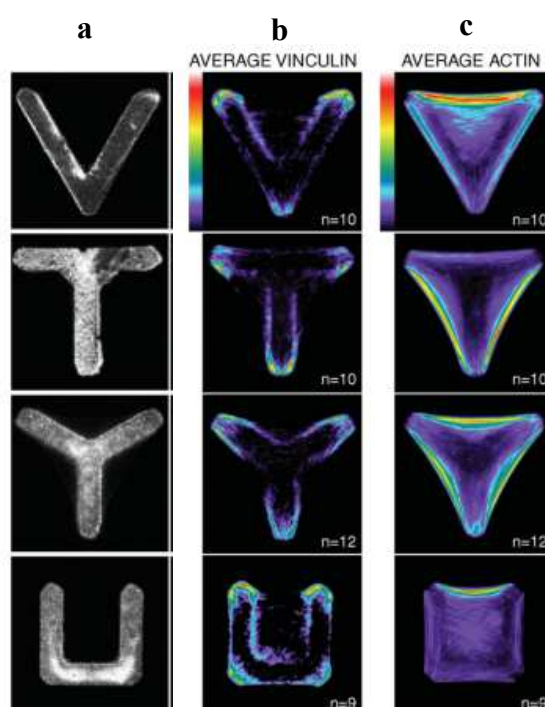


Figure 96: Distribution moyenne de la vinculine (b) et de l'actine (c) pour des cellules adhérant selon des patrons adhésifs de fibronectine (a) de géométries différentes⁵⁴.

De plus, et dans le but d'étudier l'impact de la géométrie des microstructures sur la distribution des lamellipodes et de la polarité cellulaire, Mrksich et al. ont quantifié les réponses cellulaires sur des substrats microstructurés par microcontact printing selon des géométries courbées avec des zones concaves et convexes¹³⁷ (Figure 97).

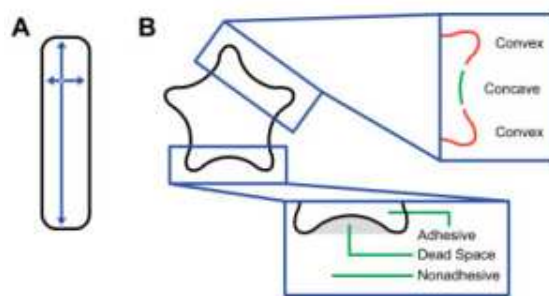


Figure 97: Géométries des patrons adhésifs sur des substrats passifs en fonction du rapport d'aspect (A) ou en fonction des courbures locales définies comme convexes ou concaves

Ainsi, ils ont démontré que les cellules ayant adhéré sur des géométries rectangulaires présentent un cytosquelette polarisé qui augmente avec le rapport d'aspect de surface. Tandis que les cellules ayant adhéré sur des géométries avec des courbures locales montrent que le cytosquelette module la polarité cellulaire en réponse à ces géométries multiples de l'environnement extracellulaire. Selon ces travaux, pour les géométries ayant un rapport d'aspect c'est à dire allant d'une géométrie carrée à une géométrie rectangulaire, les cellules sont polarisées selon l'axe le plus long du rectangle. Les cellules montrent une préférence à former des lamellipodes au niveau des régions convexes ayant des angles aigus au niveau des sommets des géométries tandis que les fibres de stress sont formées au niveau des régions concaves (Figure 98).

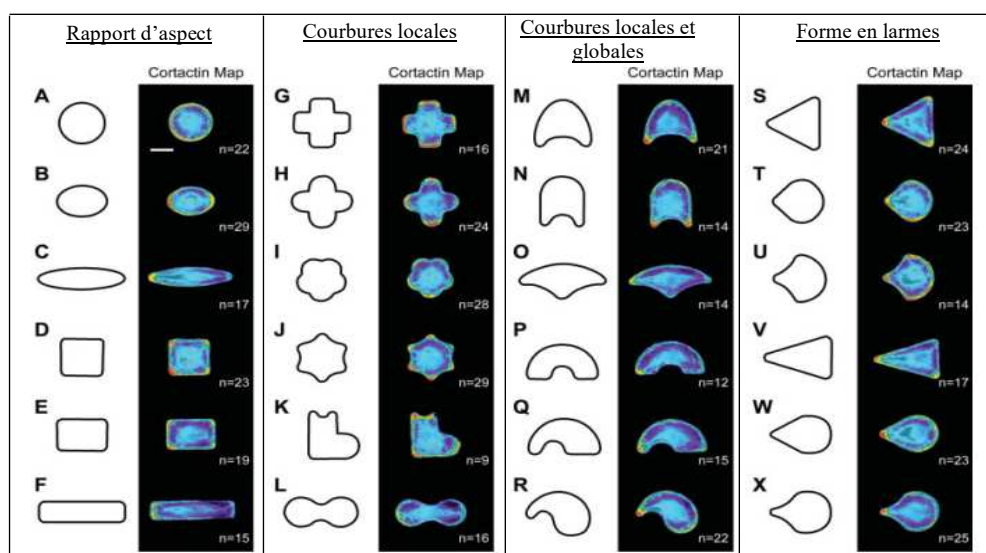


Figure 98: Résumé des réponses des lamellipodes selon les géométries des microstructures adhésives¹³⁷.

L'ensemble de ces informations permet d'imaginer des géométries adaptées à cette application : Comment optimiser le confinement d'une cellule individuelle par

microstructure ? Comme induire de la connectivité entre les cellules via des jonctions VE-cadhérines tout en contrôlant la division et la prolifération cellulaire ?

A partir des informations précédentes, les points importants sont :

- les lamellipodes sont formés au niveau des zones convexes ayant des cotés avec un angle aigu
- les fibres de stress sont formées au niveau des zones concaves
- l'ensemble des {lamellipodes + fibres de stress} ont une influence sur la polarité des cellules

⇒ Il faudrait alterner entre des régions convexes pour la formation des lamellipodes et des régions concaves pour la formation des fibres de stress

Hypothèses :

- Est-ce que l'ajout de régions convexes et concaves a une influence sur l'adhésion des cellules ? sur la division et la prolifération cellulaire ?
- Il y a-t-il une différence avec les côtés droits ?
- Comment contrôler l'adhésion des cellules sur des zones courbées ? Comment choisir l'angle de courbure ?

Il faudrait travailler sur 2 angles de courbures : 1- angle de la région convexe pour la formation des lamellipodes ; 2- angle des régions concaves pour la formation de fibres de stress.

Il y a en effet un lien entre la courbure de la membrane et les forces qui lui sont appliquées¹³⁸. Ces forces correspondent à :

- Tension de la membrane (σ) : dépend principalement de l'énergie qu'il faut pour que la bicouche lipidique adhère au cortex d'actine du cytosquelette. La tension de membrane est constante grâce à des processus de régulation de la surface de la membrane.
- Ligne de tension (γ) : correspond à la tension au niveau des câbles d'actine qui tiennent la cellule.

La géométrie à laquelle une cellule individuelle minimise le plus son énergie avec des petites valeurs de σ et γ correspond à la géométrie sphérique. En 2D, la géométrie idéale d'un ensemble de 'bulles' est une géométrie en pavage hexagonal avec une intersection de 3 vecteurs à 120° (three-fold vertices).

Le lien entre le rayon de courbure R , la tension de la membrane (σ) et la ligne de tension (γ) s'exprime par :

$$R = \frac{\gamma}{\sigma}$$

La convexité des cellules est atteinte pour des petites courbures, et ce après renforcement de la ligne de tension⁵⁴.

Ainsi le modèle parfait prend en compte :

- Une géométrie qui tend à minimiser la tension de surface
- Une géométrie qui alterne entre des zones adhésives et non adhésives favorisant la formation de lamellipodes et de fibres de stress pour respecter un équilibre énergétique

Quelques géométries de microstructures possibles ont été résumées dans un schéma récapitulatif (Figure 99). La géométrie des microstructures utilisée dans le cadre de ces travaux de thèse avec des hexagones pleins est retrouvée où leurs diamètres (d) et les espacements entre eux (e) ont été variés (Figure 99 – a). Ensuite, est présentée une autre géométrie qui alterne entre des régions adhésives uniquement sur les contours des hexagones et des régions non adhésives à l'intérieur (Figure 99 – b). Cette géométrie est disponible sur le masque 3 décrit dans la section 1 de l'annexe. Il est difficile d'imaginer comment les cellules vont adhérer sur ces géométries, de la même façon que sur les hexagones pleins. Dans ce cas, les points focaux d'adhésion seront formés sur les contours au niveau des régions adhésives. Cependant, il n'est pas possible d'affirmer si l'adhésion de la cellule à l'intérieur de l'hexagone pourrait impacter son cytosquelette et la formation de jonctions avec les cellules voisines. La troisième géométrie présentée dans ce schéma est une géométrie en étoile avec des bords circulaires (Figure 99– c). C'est une géométrie qui alterne entre des zones concaves et des zones convexes, comme décrit dans la Figure 97. Avec une configuration pareille, il est possible que les cellules forment leurs points focaux d'adhésion au niveau des sommets, puis des fibres de stress vont lier les sommets entre eux afin de minimiser l'énergie de surface de la cellule. Ensuite, l'idée serait de faire varier les espacements entre les hexagones afin que les fibres de stress d'une cellule puissent communiquer avec celles des cellules voisines et induire une inhibition de contact¹³⁹ qui ferait que les cellules ne se divisent pas et forment un système stable dans les assemblages à 3 hexagones. La géométrie présentée dans la Figure 99 – d ressemble à celle présentée en c avec plus de zones non adhésives. Dans ces deux cas, il faudrait réfléchir sur les angles de courbures concaves et convexes afin de trouver la géométrie la plus optimale pour la formation de monocouches cellulaires endothéliales, d'abord dans des assemblages à 3 hexagones et finalement dans des assemblages plus grands à 7 hexagones et à plus.

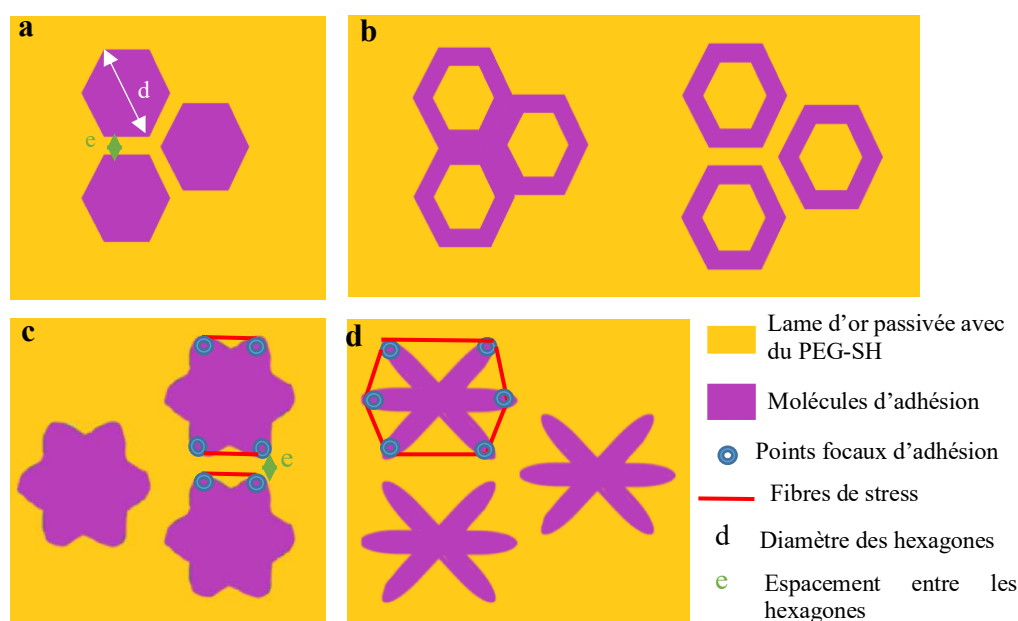


Figure 99: Schéma récapitulatif des différentes géométries de microstructures possibles pour contrôler l'adhésion des cellules sur des substrats d'or fonctionnalisés.

Conclusion partielle : Dans cette première partie du chapitre de perspectives, les résultats préliminaires obtenus pour l'étude de l'adhésion des cellules endothéliales selon des groupes de 7 hexagones ont été présentés. Cependant, il a été démontré qu'il était plus difficile d'observer le confinement d'une cellule individuelle par hexagone dans les assemblages à 7, en comparaison avec les assemblages à 3 hexagones. De plus, les cellules présentent un taux de division élevé pendant le temps de formation des jonctions dans l'incubateur. Ainsi, dans le but d'augmenter la probabilité d'occupation des microstructures par les cellules et de réduire la division cellulaire pendant le temps de formation des jonctions, 2 solutions principales ont été proposées. La première solution consiste à utiliser des agents pharmacologiques tout en faisant varier les paramètres expérimentaux de culture cellulaire (densité de cellules, pourcentages de facteurs de croissance dans le milieu de culture, temps initial d'adhésion et temps de formation des jonctions). Bien que l'ajout d'agents pharmacologiques semble optimiser l'occupation des cellules dans les microstructures et la formation de jonctions entre elles, il est important de quantifier les réponses cellulaires en présence de ces agents pharmacologiques car l'inconvénient de cette technique, serait d'impacter le phénotype cellulaire et que les cellules ne répondent pas aux différents stimuli comme une monocouche cellulaire endothéliale le ferait. La deuxième solution consiste à moduler les géométries des microstructures en prenant compte les paramètres de culture cellulaire et l'adaptation du cytosquelette selon chaque géométrie. Idéalement, ces géométries devraient permettre de minimiser l'énergie de surface des cellules par exemple en alternant entre des régions adhésives et non adhésives, contenir des régions concaves et convexes et finalement induire une inhibition de contact entre la cellule

dans l'assemblage à 3 (ou plus) afin de réduire les risques de division cellulaire. Ici, ces 2 solutions pharmacologiques et morphologiques sont discutées, mais il existe probablement d'autres solutions tel la nanostructuration discutée dans la suite de ce chapitre.

II. La nanostructuration combinée à la microstructuration

A- La nanostructuration pour améliorer la résolution de l'imagerie SPR

1- Précédents travaux de l'équipe

Comme présenté précédemment, la SPRI présente des avantages d'imagerie sans marquage et en temps réel d'événements biologiques ayant lieu à la surface d'un substrat plasmonique grâce à sa sensibilité de détection des variations d'indice de réfraction à la surface de la couche métallique. Cependant, la SPRI présente des limitations quant à sa résolution spatiale liée à la nature propagative des plasmons de surface (PSP) qui déplace/floute l'information dans la direction de propagation des plasmons. De précédents travaux de l'équipe ont démontré que la fabrication de puces SPR combinant les propriétés de plasmons propagatifs et de plasmons localisés permet d'améliorer la résolution spatiale en imagerie SPR¹⁰⁰. En effet, au niveau des nanostructures métalliques, les plasmons dits localisés (LSP pour Localized Surface Plasmon) se traduisent par une concentration importante du champ électrique à la surface de la nanostructure avec une absence de propagation. Ainsi les travaux de thèse de Frédéric Banville ont permis d'identifier les géométries optimales des nanostructures permettant d'atteindre des résolutions spatiales de l'ordre du micromètre tout en conservant un fort contraste d'imagerie et une bonne sensibilité de détection. Les nanostructures correspondent à des réseaux périodiques en 2D (d'épaisseur h_2) déposés sur un film d'or continu (d'épaisseur h_1) (Figure 100 – a). Les géométries correspondent à des piliers de 200 nm de diamètre, espacés de 200 nm (Figure 100 – b). La modélisation du contraste des images en fonction de la longueur de propagation de ces géométries montre que ces réseaux nanostructurés permettent d'atteindre un fort contraste avec une faible longueur de propagation et améliorent significativement la résolution des images SPRI (Figure 100 – c).

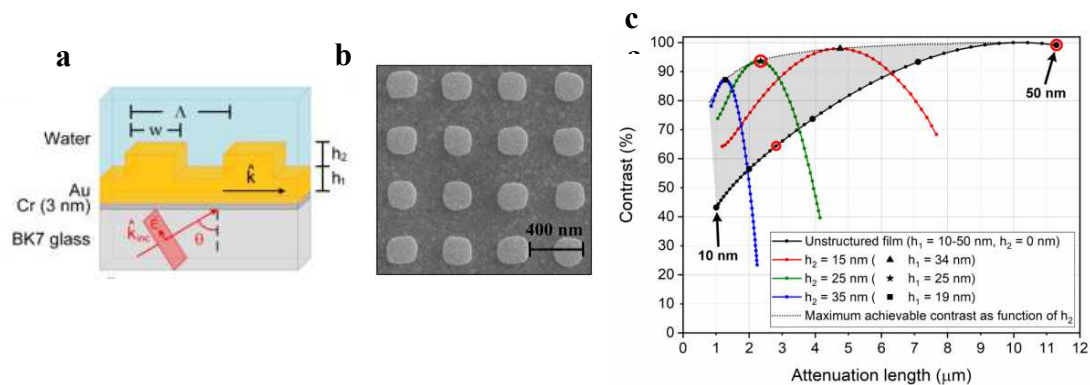


Figure 100: **a)** Schéma du substrat SPRI nanostructuré. Une couche d'or continue d'épaisseur h_1 est déposée sur un substrat de verre via une couche d'accroche (Cr). Les réseaux métalliques d'or d'épaisseur h_2 sont ensuite fabriqués par lithographie électronique. **b)** Images en microscopie électronique à balayage (MEB) de réseaux de piliers en 2D avec : $w = 200$ nm, $\Lambda = 400$ nm, $h_1 = 25$ nm, $h_2 = 25$ nm. **c)** Modélisation du contraste en fonction de la longueur de propagation pour pour différentes configurations de substrats comme montré dans la figure 87a à $\lambda = 830$ nm¹⁰⁰.

L'amélioration significative de la résolution est également observée sur les images SPRI. En effet, un orifice en forme de croix a été fait sur différents types de substrats d'or continu ou nanostructurés et a été imagé par SPRI à $\lambda = 830$ nm (Figure 101– a – e). Les images sont différemment contrastées à l'intérieur de la croix où les pixels sont noirs et qui correspondent à de faibles valeurs de réflectivité que à l'extérieur de la croix où les pixels sont clairs et qui correspondent à des valeurs de réflectivité élevées. Les images SPRI ont été normalisées et des profils d'intensité ont été tracés dans la direction de propagation des plasmons de surface de gauche à droite pour chaque configuration de substrat selon les lignes de couleurs sur les images SPRI (Figure 101 – f). Ces profils d'intensité ont été tracés (lignes pleines) et ajustés selon des modèles paramétriques adaptés (lignes pointillées). L'estimation montre une longueur de propagation plus faible pour les substrats nanostructurés selon les réseaux de piliers en 2D avec une longueur de propagation 6.3 plus faible pour les films nanostructurés que pour les films d'or continus d'épaisseur 50 nm. Cette amélioration de la résolution spatiale est visible sur les images SPRI au niveau des bords de la croix qui semblent plus nets et « bavent » moins dans la direction du sens de propagation des plasmons.

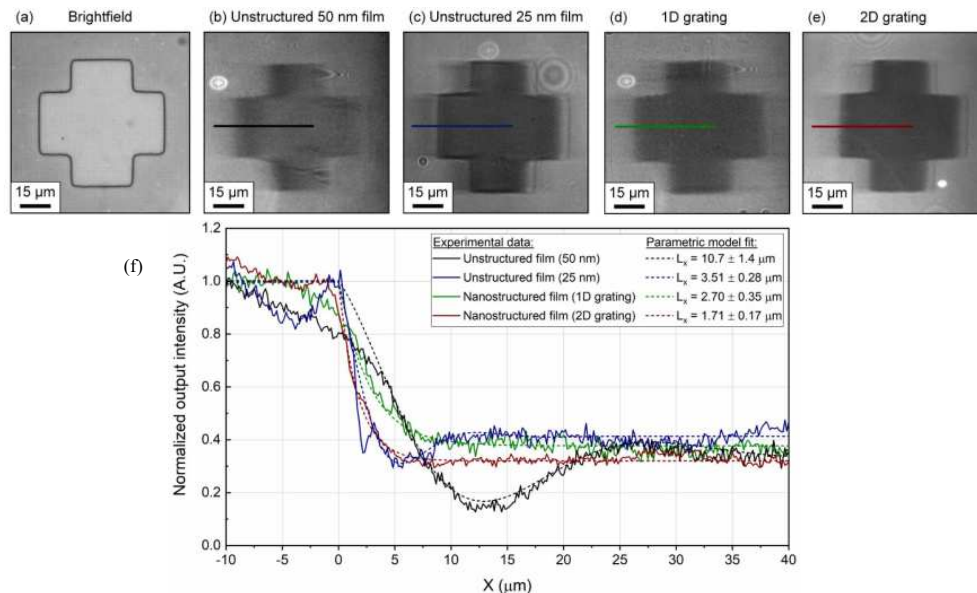


Figure 101: Images d'un trou en forme de croix sur différentes configurations de substrat. Le diélectrique au-dessus du métal correspond à de l'eau à l'intérieur de la croix et de la résine KMPR à l'extérieur. **a)** Images en BF. **b – e)** Images en SPRI normalisées à $\lambda = 830$ nm de la

croix sur : des substrats d'or continus de 50 nm d'épaisseur (b), des substrats d'or continus de 25 nm d'épaisseur (c), des substrats avec des nanostructures en lignes (1D) de 200 nm d'épaisseur espacés de 200 nm (d) et des substrats nanostructurés avec des réseaux périodiques en piliers (2D) comme décrits dans la figure 87¹⁰⁰.

Les puces SPR nanostructurées fabriquées dans la thèse de Frédéric Banville ont été utilisées pour des applications de mesure de l'activité de cellules vivantes et ont permis de quantifier, avec une meilleure résolution spatiale, les changements de morphologie au niveau d'une population de cellules ou au niveau de cellules individuelles, et ce en combinant de la microscopie SPR avec un objectif à forte ouverture numérique et la nanostructuration du substrat d'or¹⁴⁰. De plus, le suivi des réponses cellulaires par SPR a permis d'obtenir des résultats quantifiés, et ce par amélioration du signal obtenu grâce au traitement des images SPR¹⁴¹.

En prenant en compte ces informations, et dans le cadre des travaux de thèse présentés dans ce manuscrit, de nouvelles questions émergent sur la conception de biocapteurs plasmoniques micro et nanostructurés pour le contrôle de l'adhésion cellulaire et l'amélioration de la résolution de l'imagerie SPR.

2- Résultats préliminaires de puces SPR nano et microstructurées

a- Fabrication des puces SPR nanostructurées

En se basant donc sur les résultats décrits dans les travaux de thèse de Frédéric Banville, des substrats nanostructurés ont été fabriqués par lithographie électronique. Le protocole décrit dans la thèse de Frédéric Banville est suivi. Ces substrats ont été fabriqués en salle blanche du 3IT à Sherbrooke par Jean-François Bryche. Les substrats d'or nanostructurés ont été caractérisés par microscopie électronique à balayage. Les nanostructures correspondent à des réseaux métalliques de piliers de 200 nm de diamètre, espacés de 200 nm ($\Lambda = 400$ nm) (Figure 102). Les nanostructures remplissent une zone de quelques millimètres au milieu de la lame d'or de taille 22x22 mm.

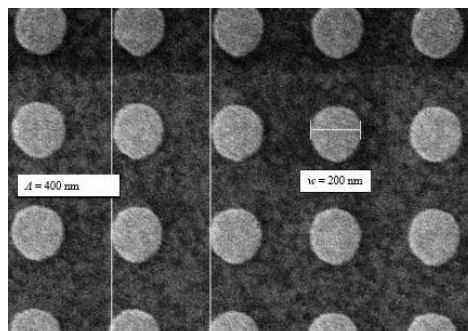


Figure 102: Caractérisation au MEB des lames nanostructurées par lithographie électronique. Selon la figure 87 – a : $w = 200$ nm, $\Lambda = 400$ nm.

b- Imagerie par SPR de cellules endothéliales EAhy926 dans les groupes de 3 hexagones

i- Balayage angulaire du substrat nanostructuré

Dans cette expérience, des cellules endothéliales EAhy926 sont déposées sur des substrats d'or nano et microstructurés. Après le temps initial d'adhésion de 2 h dans l'incubateur, le milieu de culture cellulaire est changé pour un milieu de culture sans facteurs de croissance et avec de l'HEPES. Ensuite, les lames sont laissées 48 h dans l'incubateur pour la formation des jonctions entre les cellules. Dans ces conditions expérimentales, les cellules forment des jonctions entre elles (Figure 48). Après environ 30 minutes de stabilisation des cellules sur le support de microscopie SPR, 1 U/mL de thrombine est injectée. Ainsi, tous les résultats présentés dans cette section (Figure 103 – 108) proviennent de cette même expérience. La longueur d'onde de travail est égale à 850 nm. Le choix de la longueur d'onde se base sur l'obtention d'une meilleure sensibilité SPR à des longueurs d'ondes élevées. Cependant travailler à des longueurs d'ondes plus élevées augmente la longueur de propagation, ce qui résulte en une nette réduction de la résolution. La nanostructuration des substrats d'or est une solution permettant de travailler avec des longueurs d'onde élevées tout en améliorant la résolution d'imagerie SPR. Avant l'expérience, un balayage angulaire est effectué afin de sélectionner l'angle optimal de résonance. Un décalage angulaire est observé entre les groupes de cellules de 3 hexagones dans la zone où le film d'or est nanostructuré et dans la zone où le film d'or est continu (Figure 103 – b). De même, un décalage angulaire est observé au niveau des régions passivées dans les zones nanostructurées ou continues (Figure 103 – c). Finalement, dans la zone nanostructurée, un décalage angulaire est observé entre les groupes de 3 hexagones où les cellules ont adhéré et les régions passivées (Figure 103 – d). Ces décalages angulaires montrent que les différentes régions fonctionnalisées de la lame résonnent à des angles différents et que l'imagerie SPR a une bonne sensibilité de détection des différentes variations d'indice à la surface. Le choix de l'angle de résonance optimal est sélectionné dans la plage angulaire des courbes représentée par les traits gris au niveau de la zone nanostructurée (Figure 103 – d). Le choix de cet angle optimal permet de procéder aux expériences de cinétique de cellules vivantes par imagerie SPR à $\lambda_{\text{res}} = 850 \text{ nm}$.

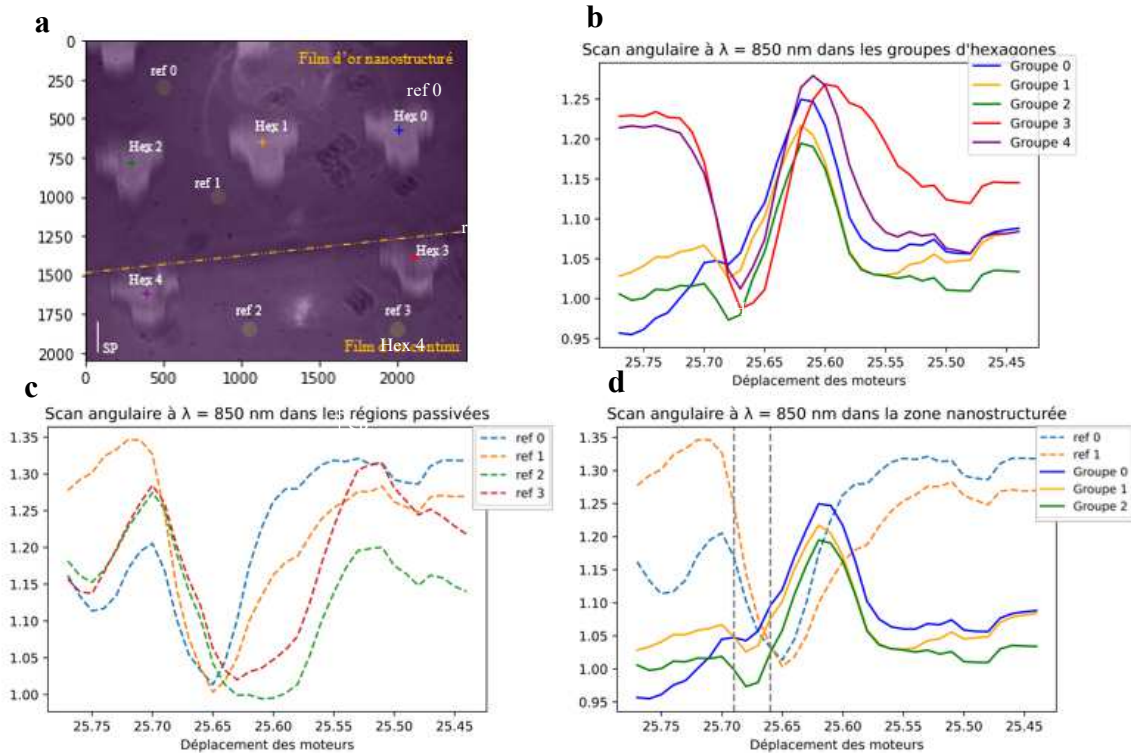


Figure 103: Scan angulaire d'une lame d'or nanostructurée par lithographie électronique selon des réseaux de piliers de $w = 200$ nm, $\Lambda = 400$ nm et microstructurée par illumination DUV selon des groupes de 3 hexagones de $30 \mu\text{m}$ de diamètre, espacés de $3 \mu\text{m}$. **a)** Image SPR avec les régions d'intérêts sélectionnées dans les microstructures (Hex0, Hex1, Hex2, Hex3, Hex4) ou dans les régions passivées (ref1, ref2 et ref3) au niveau des zones du film d'or nanostructuré ou continu (délimitation avec la ligne jaune). La direction de propagation des plasmons est montrée avec la ligne blanche (SP). **b – d)** Signal SPR en fonction des différents angles de résonance définis par le déplacement des moteurs du système d'imagerie SPR au niveau des groupes de 3 hexagones où les cellules ont adhéré (**b**), au niveau des régions passivées (**c**) et uniquement au niveau de la zone où le film d'or est continu pour les groupes de 3 hexagones et les régions passivées (**d**). Ici sont représentées les courbes correspondant à des régions de la lame au niveau des microstructures (traits pleins) ou au niveau des régions passivées (traits pointillés). Les traits en pointillés gris délimitent la plage angulaire qui contient l'angle de résonance optimal.

ii- Optimisation de la résolution des images SPRI

Concernant la résolution, les images SPR montrent une petite amélioration de la résolution entre les groupes de cellules dans les assemblages à 3 hexagones dans la zone nanostructurée (Hex 0, 1 et 2) et les groupes dans la zone du film d'or continu (hex 3 et 4) (Figure 104). Cette petite amélioration est observée au niveau de la netteté des images : en effet, plein de petits traits sont observés dans la direction de propagation des plasmons de surface dans les groupes de 3 hexagones 3 et 4 au niveau de la zone d'or où le film d'or est continu (représentés par la flèche verte). Ainsi, les bords des

cellules dans les groupes de 3 hexagones sont moins nets que pour les hexagones 0, 1 et 2 au niveau de la zone nanostructurée.

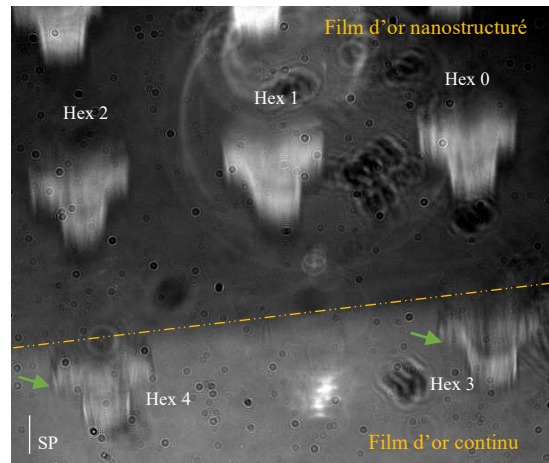
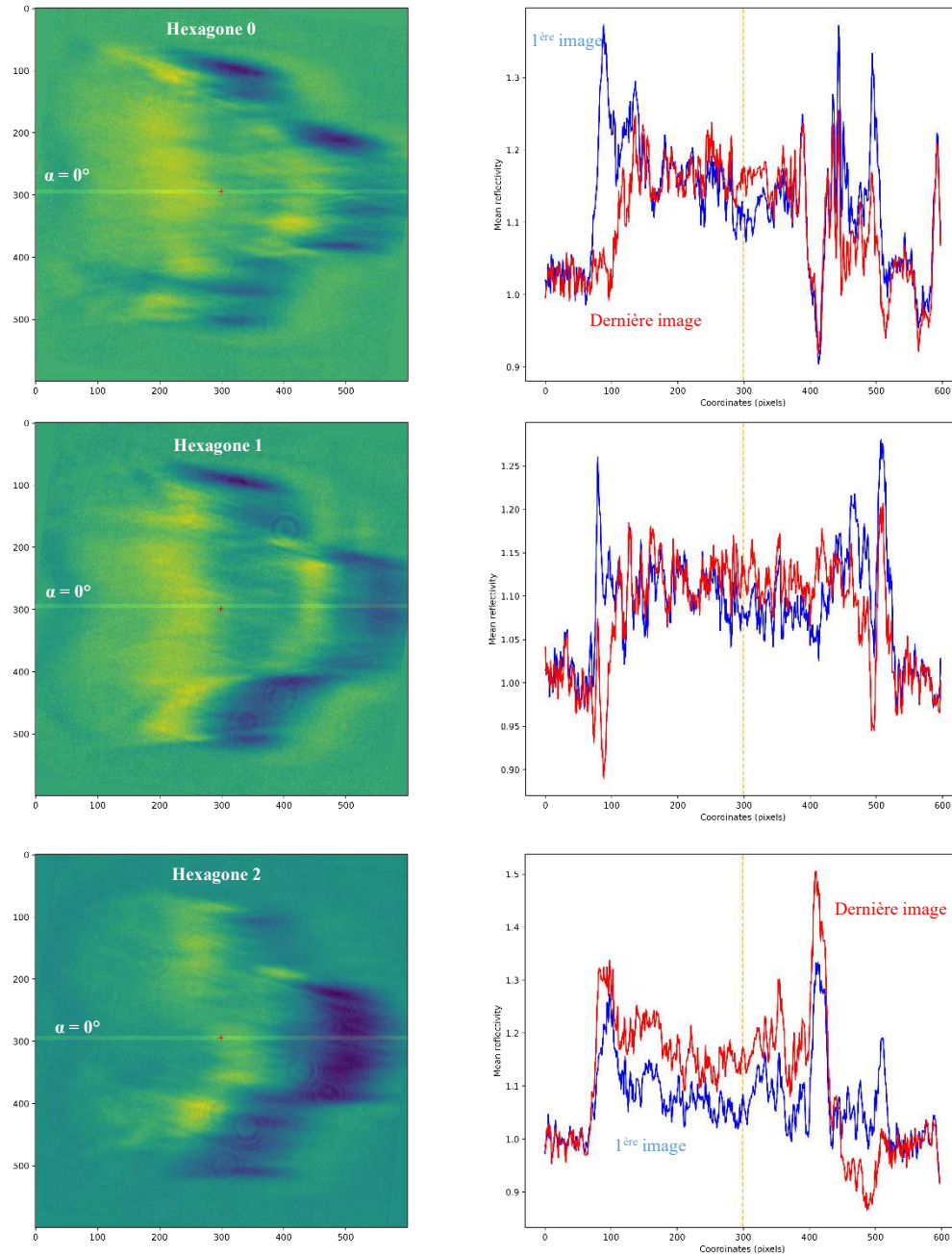


Figure 104: Image SPR normalisée en divisant l'image en TM par TE. La ligne jaune en pointillés représente la délimitation entre la partie du film d'or nanostructuré (hex0, 1 et 2) et l'autre partie du film d'or continu (hex 3 et 4). La ligne blanche en bas à gauche montre la direction de propagation des plasmons de surface. Il s'agit de la même expérience décrite en 2-a.

Une expérience de cinétique de ces cellules vivantes a été effectuée par imagerie SPR à $\lambda_{\text{res}} = 850 \text{ nm}$ et selon l'angle optimal de résonance sélectionné après le balayage angulaire (Figure 103). Après stabilisation des cellules, la thrombine est injectée à une concentration de 1 U/mL. Dans le but de quantifier la petite amélioration de la résolution visible sur les images SPR, des lignes de profil ont été tracées montrant l'évolution des valeurs d'intensités des pixels selon l'axe de la direction de propagation des plasmons de surface. Les images SPR sont ensuite normalisées : les images en polarisation TM sont divisées par l'image en polarisation TE, puis les valeurs des régions passivées entourant chaque groupe de cellules dans les assemblages à 3 hexagones sont soustraites. Une ligne de profil est tracée dans la direction de propagation des plasmons de surface ($\alpha = 0^\circ$) pour chacun des 4 groupes d'hexagones montrés dans la Figure 104. La Figure 105 montre, à gauche, l'image de différence entre l'image SPR au début de l'expérience avant injection de la thrombine, et l'image SPR à la fin de l'expérience. À droite sont montrés les profils d'intensités en fonction des coordonnées de l'axe de la direction de propagation des plasmons décrits en pixels à deux temps différents : - au début de l'expérience avant injection de la thrombine (ligne bleue) ; - à la fin de l'expérience (ligne rouge). Ainsi, il semblerait que les profils d'intensité des groupes de cellules au niveau de la zone nanostructurée présentent plus nettement les bords de la cellule. En effet, il est possible de définir les coordonnées correspondant aux régions passivées puis à l'entrée et la sortie des groupes de cellules pour les assemblages de 3 hexagones 0, 1 et 2. Les profils d'intensités des groupes de cellules dans les assemblages à 3 hexagones se trouvant dans la région où le film d'or est continu (hexagones 3 et 4) sont moins évidents à lire et les bords de cellules sont moins évidents à délimiter. De plus, il est difficile de voir une différence entre les courbes bleues correspondant aux images SPR de début d'expérience avant injection de la thrombine, et des courbes rouges montrant le signal des images SPR de fin d'expériences, et ce pour les 4 groupes de cellules

qu'ils soient dans la zone nanostructurée ou pas. Ces résultats restent des résultats qualitatifs qui donnent une idée sur l'amélioration de la résolution sur des substrats nanostructurés et les limites de détection dans le cadre d'imagerie plasmonique d'activités cellulaires. Il faudrait refaire des expériences plus poussées, avec des quantifications plus approfondies comme celles montrées dans les travaux de Frédéric Banville (Figure 101) avec des ajustements multiparamétriques.



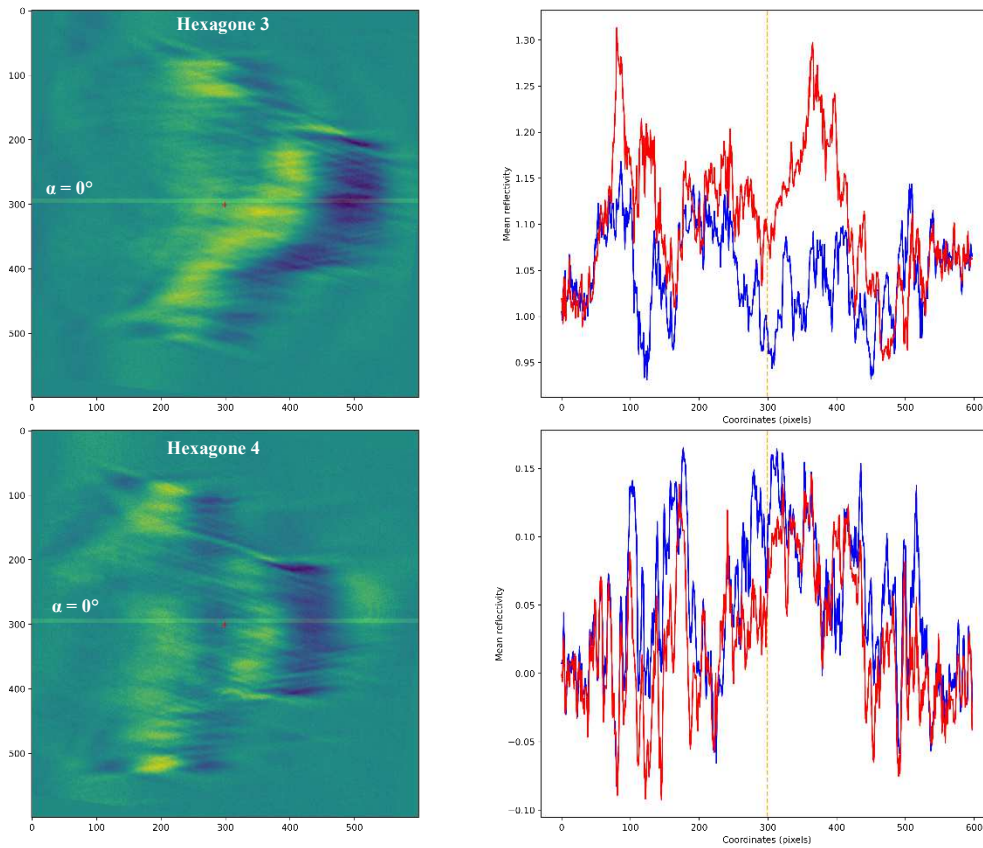
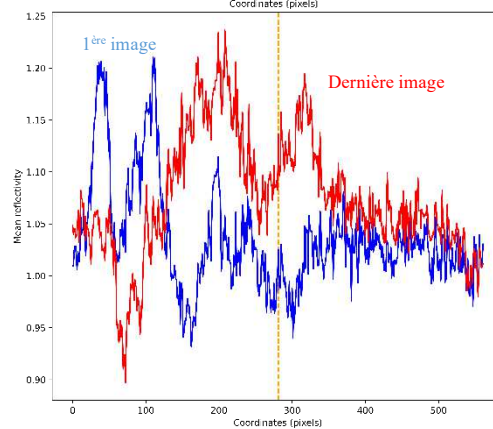
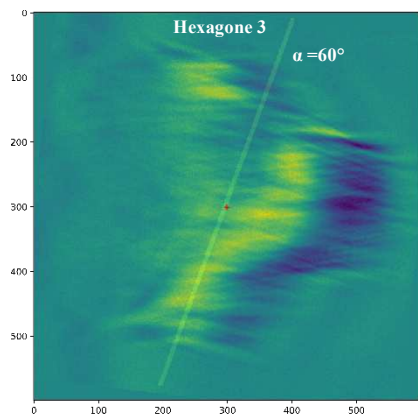
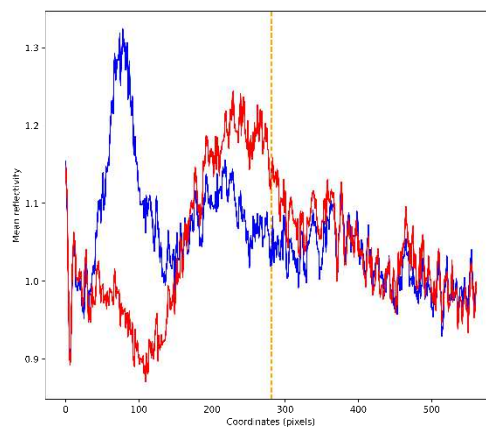
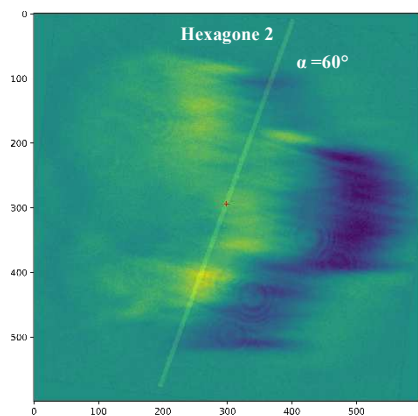
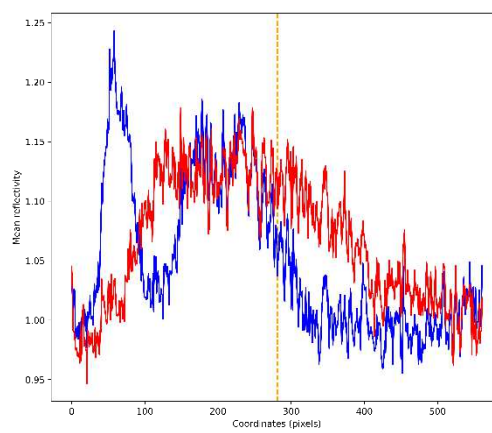
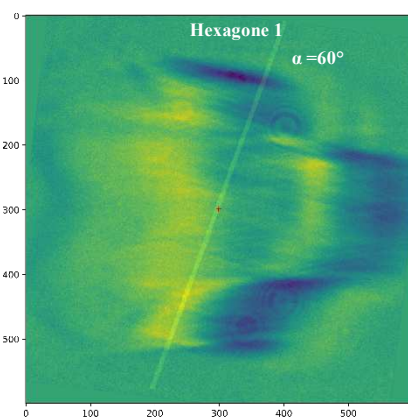
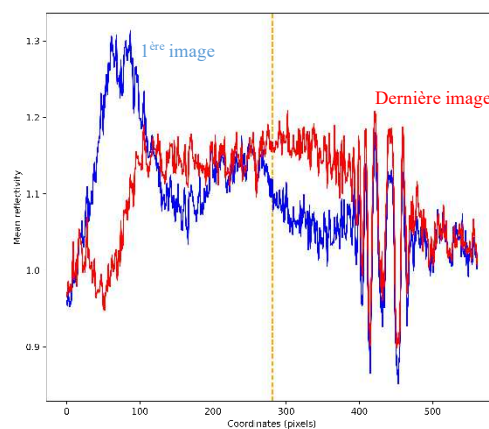
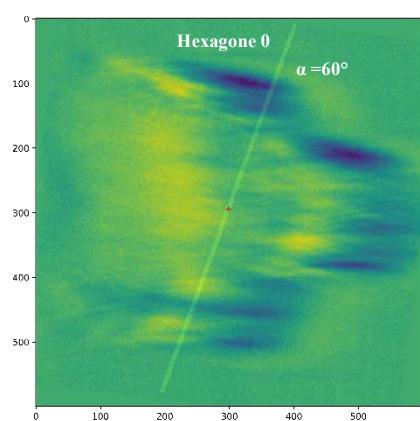


Figure 105: Profils d'intensité des 4 groupes de cellules dans les assemblages à 3 hexagones montrés plus haut selon la direction de propagation des plasmons de surface ($\alpha = 0^\circ$). A gauche sont représentées les images de différence entre la 1^{ère} image avant injection de la thrombine (1 U/mL) et la dernière image. A droite sont tracés les profils d'intensités pour la 1^{ère} image (bleu) et la dernière image (rouge) normalisées comme décrit dans le texte.

De plus, il a été observé que lorsque la ligne de profil est tournée de $\alpha = 60^\circ$ montrant une ligne quasi orthogonale à la direction de propagation des plasmons, les profils d'intensité semblent plus informer sur la cinétique des groupes de cellules avant et après injection de la thrombine (Figure 106). Sauf pour le groupe d'hexagones n°4, tous les autres groupes montrent des groupes de cellules plutôt impactés au niveau des bords des assemblages à 3 hexagones avec une baisse du signal d'intensité des pixels correspondant à une baisse de l'adhésion cellulaire. Encore une fois, il s'agit de résultats qualitatifs présentés en perspectives de futurs travaux possibles. Les résultats présentés ici sont cependant en accord avec la théorie de la perte de résolution selon la direction de propagation des plasmons et en effet présentent la nanostructuration combinée à la microstructuration comme des solutions pour optimiser à fabrication de biocapteurs plasmoniques pour la mesure cellulaire.



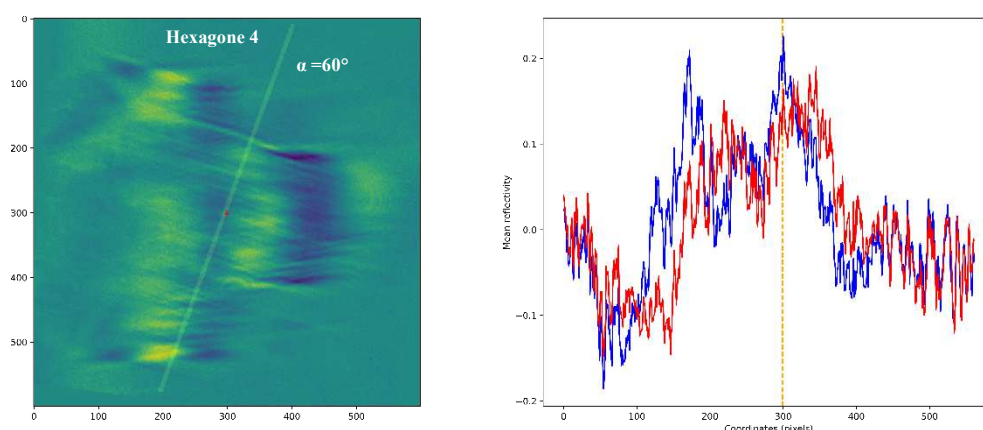


Figure 106: Profils d'intensité des 4 groupes de cellules dans les assemblages à 3 hexagones montrés plus haut selon un angle $\alpha = 60^\circ$ de la direction de propagation des plasmons de surface. A gauche sont représentées les images de différence entre la 1^{ère} image avant injection de la thrombine (1 U/mL) et la dernière image. A droite sont tracés les profils d'intensités pour la 1^{ère} image (bleu) et la dernière image (rouge) normalisées comme décrit dans le texte.

iii- Evaluation du phénotype dynamique des cellules dans les groupes de 3 hexagones sur des substrats nano et microstructurés

Toujours sur cette même expérience, après la stabilisation, le phénotype dynamique des cellules dans les groupes de 3 hexagones est ensuite évalué, de la même lame présentée plus haut, par imagerie SPR en temps réel après injection de 1 U/mL de thrombine. Il est difficile d'observer une réponse des cellules après injection de la thrombine sur les images en champ clair ou sur les images SPR d'avant et après injection (Figure 107). Les réponses au cours du temps des groupes de cellules dans les assemblages à 3 hexagones ont été mesurées. Ensuite, les images sont normalisées en divisant par TE et en soustrayant des petites régions d'intérêt au niveau des régions passivées autour des groupes de cellules. Ensuite ? La moyenne d'une région d'intérêt (500x500 pixels) contenant chacun des groupes de cellules pour chaque image est calculée au cours du temps. Le graphique de l'évolution du signal SPR au cours du temps montre que les cellules dans les groupes de 3 hexagones au niveau de la partie du film d'or nanostructuré répondent à l'injection de la thrombine. En effet, les groupes 0, 1 et 2 voient leur signal SPR baisser au cours du temps, puis augmenter. Cette réponse correspond à celle mesurée dans nos expériences précédentes et retrouvée dans la littérature. Les cellules dans les groupes de 3 hexagones se trouvant dans la partie du film d'or continu, quant à elles, ne semblent pas répondre de la même manière que les autres. Il est difficile de dire si cette différence entre les réponses cellulaires est liée à la nanostructuration du substrat ou à l'hétérogénéité de réponses de cellules vivantes. Il faudrait ainsi refaire ces expériences afin d'élucider les avantages de la nanostructuration sur la mesure des réponses de cellules vivantes par imagerie SPR.

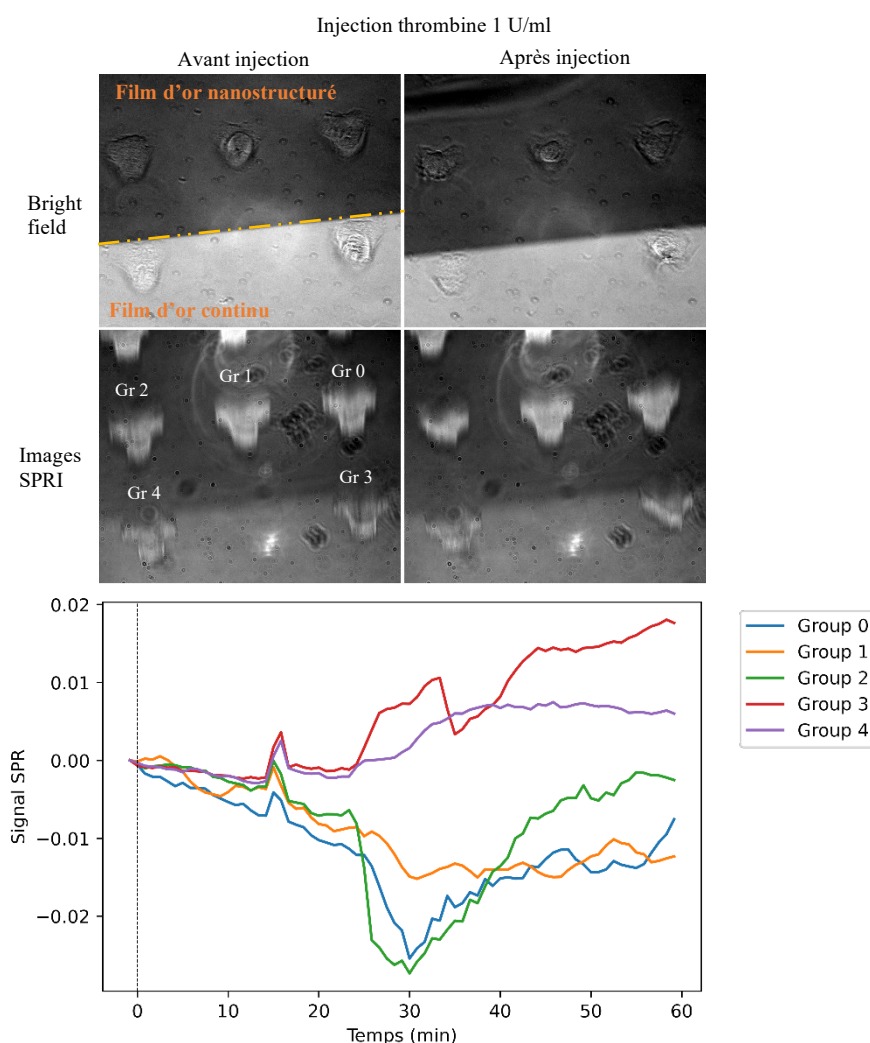


Figure 107: Cinétique des cellules dans les groupes de 3 hexagones au cours du temps adhérant sur un substrat nano et microstructuré (délimitation avec la ligne jaune). à gauche : images BF et SPR prises simultanément avant et après injection de la thrombine (1 U/mL). à droite : évolution du signal SPR au cours du temps pour chacun des 5 groupes de 3 hexagones.

Conclusion partielle : Les résultats obtenus dans cette expérience avec un substrat nanostructuré et microstructuré selon le protocole de microstructuration développé dans le cadre de cette thèse montrent que la nanostructuration pourrait optimiser la résolution des images SPR obtenus et permettrait de quantifier de façon plus précise les réponses de cellules vivantes en augmentant la sensibilité dans l'analyse des réponses cellulaires. Dans cette partie, le substrat a été nanostructuré selon les résultats obtenus de la thèse de Frédéric Banville. Les nanostructures utilisées correspondent à des réseaux de piliers en 2D de 200 nm de diamètre, espacés de 200 nm. Cependant ces paramètres correspondent-ils aux paramètres optimaux permettant et d'améliorer la résolution de l'imagerie SPR et de contrôler l'adhésion des cellules à une échelle nanométrique ?

Il serait intéressant de fixer les cellules dans les assemblages de 3 hexagones sur les substrats nano et microstructurés et de marquer les jonctions VE-cadhérines et les filaments d'actine afin de confirmer le phénotype de la monocouche endothéliale avant stimulation mais également si la présence de nanostructures sur le substrat présente une réponse différente du marquage des jonctions par imagerie de fluorescence. De même, refaire un marquage des jonctions et du cytosquelette après stimulation avec la thrombine afin de vérifier et de visualiser la rupture des jonctions intercellulaires.

B- La nanostructuration pour contrôler l'adhésion cellulaire à l'échelle nanoscopique selon l'état de l'art

1- Quelques articles sur l'adhésion cellulaire à l'échelle nanométrique

En se basant sur l'état de l'art, cette partie est une discussion de l'impact de la nanostructuration sur le phénotype cellulaire. En effet, la cellule est sensible à son microenvironnement et détecte les propriétés physiques du substrat sur lequel elle adhère (ECM ou biocapteur *in vitro*) à l'échelle micro et nanométrique. *In vitro*, les propriétés physiques correspondent à la chimie de fonctionnalisation appliquée au biocapteur, sa géométrie, sa topographie et les propriétés mécaniques de ce dernier. Ainsi, les signaux chimiques sont modulés en fonction du micro/nano environnement et permettent la régulation des interactions cellule/substrat et le contrôle de l'adhésion cellulaire. Dans leur article, Gautrot et al. dressent une revue bibliographique des importants mécanismes moléculaires sous-jacents à l'adhésion de cellules sur des substrats micro et nanostructurés¹⁴². En effet, la formation des adhésions cellulaires que ce soit *in vivo* sur la matrice extracellulaire ou *in vitro* sur un substrat, dépend de l'autoassemblage de complexes moléculaires à l'échelle nanométrique. Ainsi, il est important de comprendre l'architecture de ces complexes et leurs dynamiques afin de comprendre les mécanismes d'adhésion et la réponse des cellules aux propriétés physico-chimiques du substrat à l'échelle nanométrique. Comme décrit précédemment dans l'état de l'art du chapitre 2, les cellules adhèrent sur les substrats via des regroupements des intégrines appelés des points focaux d'adhésion (PFA). Il a été démontré que ces PFA correspondent à des structures multicouches nano organisées dans la direction Z. Huang et al. ont vérifié si l'ordre nanoscopique de ces multicouches avait un impact sur l'adhésion de cellules d'ostéoblastes¹⁴³. Ainsi, ils ont déposé des nanostructures d'or fonctionnalisées avec des molécules d'adhésion RGD-SH sur des substrats de verre passivés avec du PEG via une procédure de silanisation (Figure 108 – a). Dans cette étude, les auteurs ont déposé les nanostructures d'or de façon organisée ou désorganisée sur des substrats de verre en faisant varier les distances entre les nanoparticules. Dans un premier temps, ils ont identifié un espacement critique de 70 nm entre les nanoparticules. Pour des distances inférieures à 70 nm, les complexes de PFA peuvent être formés, mais au-delà de cet espacement critique, les interactions entre les intégrines sont limitées, les PFA ne sont pas formées et l'adhésion cellulaire est réduite (Figure 108 – b). Au-delà de 70 nm d'espacement entre les nanoparticules, les

cellules sont sensibles à l'organisation des complexes d'adhésion à l'échelle nanoscopique. En effet, les auteurs ont démontré que les cellules adhéraient mieux sur des substrats où les nanoparticules ont été déposées de façon désorganisée quasi-hexagonale même au-delà des 70 nm d'espacement critique entre elles. Tandis que dans des schémas d'adhésion organisés de façon hexagonale, l'adhésion cellulaire est très réduite pour des distances supérieures à 70 nm (Figure 108 – c). Par conséquent, dans cet article, les auteurs ont démontré que l'ordre nanoscopique et la distance entre les ligands d'intégrines jouaient un rôle majeur dans la formation des complexes de PFA et dans l'adhésion cellulaire. Ces résultats ont été confirmés par les travaux de Arnold et al. qui ont étudié l'impact de la distance entre des nanodots de taille strictement inférieure à 8 nm pour n'accrocher qu'une molécule unique d'intégrine et qui sont positionnés selon une configuration hexagonale¹⁴⁴. Ils démontrent ainsi que pour les nanodots espacés de plus de 73 nm, l'adhésion et la formation de PFA est très réduite par rapport à des nanodots espacés d'une distance inférieure ou égale à 58 nm. Ils considèrent que cette perte d'adhésion pour les espacements supérieurs ou égaux à 73 nm sont liés à l'incapacité des molécules d'intégrines de former des regroupements (clusters) moléculaires.

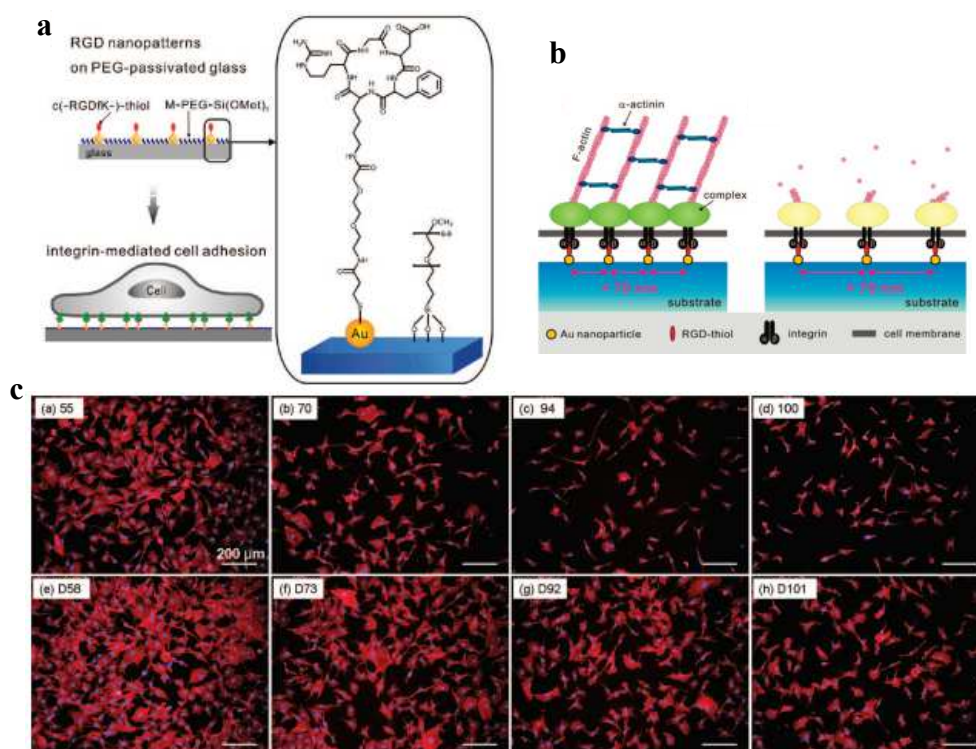


Figure 108: Impact de l'ordre ou désordre des complexes moléculaires du peptide RGD à l'échelle nanométrique sur l'adhésion cellulaire d'ostéoblastes¹⁴³. **a)** Schéma de la nanostructuration et de la fonctionnalisation des substrats. **b)** L'espacement entre les ligands de RGD impacte la formation des complexes de PFA. Un espacement de 70 nm entre les nanoparticules correspond à un espacement critique pour l'adhésion cellulaire. **c)** Marquage des filaments d'actine (en rouge) et des noyaux en bleu pour des cellules MC3T3-E1 ostéoblastes adhérant, après 24 h de culture cellulaire, sur des nanoparticules organisées (a – d) et désorganisées (e – h) en fonction des espacements inter ligands. Les numéros à côté des indices correspondent à la distance entre les nanoparticules.

2- Problématique de combiner la nanostructuration et la plasmonique

Ainsi, selon l'état de l'art, la nanostructuration joue un rôle dans le contrôle de l'adhésion cellulaire. En effet la formation des complexes moléculaires de points focaux d'adhésion dépend de la taille et de la géométrie des nanostructures, la distance entre ces dernières et de leur configuration si elle est ordonnée ou pas. La distance entre les nanostructures doit être entre 58 nm et 73 nm afin que les intégrines puissent se regrouper et former des points focaux d'adhésion permettant aux cellules d'adhérer et de migrer. Cependant, il est difficile d'appliquer cette information dans ce cas d'étude. En effet, les études présentées précédemment consistent à déposer des nanoparticules d'or sur des lames de verre avec une chimie de surface différenciée entre la chimie de thiols pour l'or et la silanisation sur du verre. Dans ce cas d'étude où il s'agit de nanoparticules d'or sur du verre, il est impossible d'exciter des plasmons de surface et de faire des études de plasmonique. De plus, en termes de nanostructuration, même s'il existe différentes techniques de nanostructuration et de fonctionnalisation¹²², il n'existe pas aujourd'hui de techniques permettant de fonctionnaliser différemment des nanostructures d'or sur des lames d'or. Dans les travaux présentés de l'équipe, il a été démontré que la nanostructuration permettrait d'améliorer la résolution de l'imagerie SPR pour des cellules vivantes. Mais est-il possible, un jour, en plus d'optimiser la résolution de l'imagerie SPR, de contrôler à l'échelle nanométrique l'adhésion cellulaire sur des substrats plasmoniques ?

III- Etudes sur des cellules de cultures primaires de l'endothélium cornéen

La cornée est la partie antérieure et transparente de l'œil. Elle est constituée de 3 couches parallèles entre elles, jouant chacune un rôle différent. Parmi ces couches, se trouve l'endothélium cornéen qui correspond à la couche la plus profonde de la cornée. Il s'agit d'une monocouche constituée de cellules endothéliales aux contours hexagonaux. L'endothélium cornéen joue un rôle dans la régulation constante de l'hydratation du stroma, une autre couche de la cornée, et assure également une fonction de barrière entre le stroma et l'humeur aqueuse. L'ensemble de ces fonctions permettent le maintien de la transparence de la cornée. Une dysfonction ou un dommage au niveau des cellules endothéliales de la cornée peut provoquer la cécité, et le premier traitement envisageable aujourd'hui est la transplantation cornéenne. Une alternative serait d'utiliser des cellules de culture afin de remplacer l'endothélium cornéen¹⁴⁵. Cependant, la densité des cellules endothéliales est maximale à la naissance et diminue progressivement pendant toute la vie. En effet, les cellules endothéliales de la cornée prolifèrent rarement *in vivo*, ce qui fait leur difficulté dans les cultures cellulaires *in vitro*. Ainsi, différentes techniques de culture cellulaire ont été développées afin d'améliorer les cultures primaires des cellules endothéliales de la cornée en mettant en place des méthodes de préservation et d'isolation des cellules primaires récupérées directement de donneurs potentiels, et en prenant en compte différents facteurs tels la

densité cellulaire, les milieux de culture, la transdifférenciation et l'évaluation des différents biomarqueurs¹⁴⁶. Malgré la prise en compte de l'ensemble de ces facteurs afin d'assurer la réplique des cellules endothéliales de la cornée, ces cultures cellulaires résultent en un changement morphologique des cellules induisant un changement phénotypique des cellules de l'endothélium cornéen à des cellules de fibroblastes¹⁴⁷. Cette perte problématique du phénotype endothélial *in vitro* limite l'utilisation de cellules endothéliales de la cornée en culture dans le domaine du génie tissulaire et dans le cadre d'applications cliniques.

Afin de répondre à cette problématique, le protocole de microstructuration développé dans le cadre de ces travaux de thèse a été appliqué afin de contraindre géométriquement les cellules endothéliales de la cornée selon des géométries hexagonales caractéristiques de leur morphologie *in vivo*. Ces travaux ont été effectués avec Mathieu Thériault, chercheur post doctorant dans l'équipe de Stéphanie Proulx au Centre de recherche du centre hospitalier universitaire (CHU) de la ville de Québec. Les lames d'or ont été fabriquées, puis passivées avec du PEG et microstructurées par illumination DUV à l'IPS de Sherbrooke. Les lames ont ensuite été stockées sous vide puis transportées à Québec. Avant de déposer les cellules endothéliales de la cornée sur les lames, les substrats d'or microstructurés ont d'abord été nettoyés avec de l'alcool (> 99 %) avant de les fonctionnaliser avec des molécules d'adhésion. Les cellules endothéliales de la cornée avaient été récupérées d'un donneur (mort d'un trauma crânien) et environ un million de cellules ont été initialement déposées sur le substrat fonctionnalisé. Les cellules ont adhéré pendant 1 jour dans des conditions d'incubateur, puis avons fixé les cellules et marqué leurs noyaux avec un marquage Hoechst et les filaments d'actine avec de la phalloïdine - FITC. Les substrats ont été microstructurés selon les géométries du masque 1 appelé le masque de confinement (masque 2). Les cellules ont ainsi adhéré sur des hexagones de diamètres différents (de 100 μm à 10 μm avec un pas de 10 μm). Le marquage des filaments d'actine ainsi que des noyaux a montré qu'il était possible de contrôler l'adhésion des cellules endothéliales primaires de la cornée selon les géométries du photomasque. Comme il a été démontré dans ces travaux de thèse, varier les surfaces adhésives des hexagones permet de réduire le nombre de cellules par microstructure jusqu'à atteindre le confinement d'une cellule individuelle par hexagone. Dans ce cas d'étude, il a été observé, grâce au marquage des noyaux, que le nombre de cellules baisse en effet en fonction des surfaces adhésives des hexagones jusqu'à observer des cellules individuelles pour des surfaces adhésives égales à 585 μm^2 et équivalent à des diamètres de 30 μm . Mais le marquage des filaments d'actine montre que les cellules adhérant dans les hexagones espacés de 25 μm ont formé des contacts et communiquent entre eux (Figure 109). Ceci peut être dû à plusieurs facteurs : La densité initiale de cellules déposée sur le substrat, le pourcentage de facteurs de croissance dans le milieu de culture et la durée d'adhésion et de formation des jonctions dans l'incubateur. Pour cette expérience, les premières expériences ont été effectuées en se basant sur les conditions expérimentales utilisées par l'équipe de Québec lorsqu'ils font les cultures cellulaires primaires sur des boîtes de pétri. Cependant, il est nécessaire de faire varier les paramètres expérimentaux de culture cellulaire afin de les adapter aux substrats microstructurés et de trouver les paramètres optimaux permettant de réduire les divisions et prolifération cellulaire. Ces premiers tests ont permis de confirmer l'utilisation du protocole de microstructuration

avec des cellules endothéliales de la cornée. Pour la suite, il faudrait refaire ces expériences et évaluer les paramètres expérimentaux permettant dans un premier temps d'identifier une gamme de diamètre pour laquelle est observé le confinement d'une cellule endothéliale cornéenne individuelle par hexagone. Ensuite, il faudrait évaluer les paramètres expérimentaux de connectivité permettant d'induire la formation de jonctions cellule/cellule dans les assemblages à 3 hexagones comme développé dans le cadre de ces travaux de thèse. Cette étude serait une première brique pour, in fine, reproduire une monocouche cellulaire endothéliale de la cornée selon un pavage hexagonal contrôlé dans les études de génie tissulaire, pour des applications cliniques.

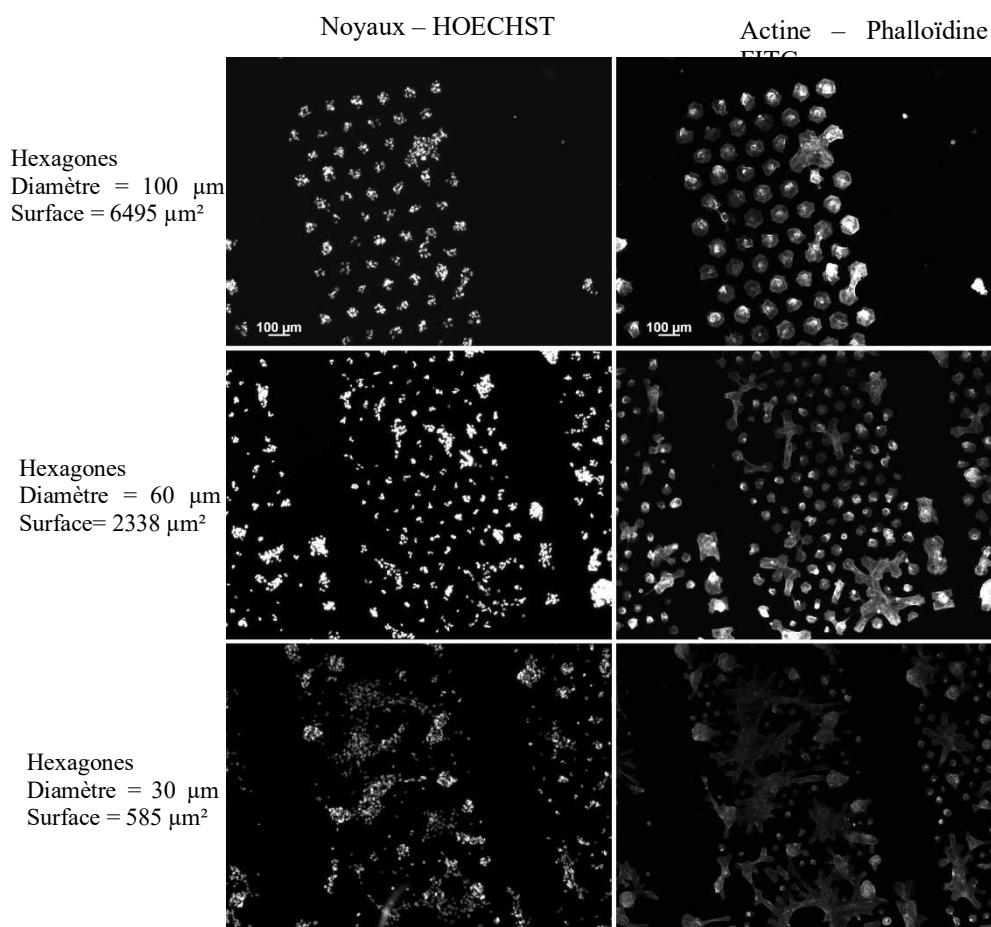


Figure 109: Images de fluorescence des cellules endothéliales de la cornée adhérant sur des substrats microstructurés selon des géométries hexagones de surfaces adhésives différentes (6495 μm^2 , 2338 μm^2 et 585 μm^2). Les cellules ont été fixées et leurs filaments d'actine et noyaux marqués respectivement avec un marquage phalloïdine – FITC et un marquage Hoechst après 1 jours d'adhésion dans l'incubateur.

REFERENCES

1. F  l  tou, M. *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. (an Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2011).
2. Pierres, A. & Benoliel, A. M. Les molecules d’adhésion en cancérologie. 15.
3. Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G. & Turner, C. Focal Adhesions: Transmembrane Junctions Between the Extracellular Matrix and the Cytoskeleton. 41.
4. Stoffels, J. M. J., Zhao, C. & Baron, W. Fibronectin in tissue regeneration: timely disassembly of the scaffold is necessary to complete the build. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 4243–4253 (2013).
5. Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma’ayan, A., Iyengar, R. & Geiger, B. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature Cell Biology* **9**, 858–867 (2007).
6. Singh, A. V., Patil, R., Thombre, D. K. & Gade, W. N. Micro-nanopatterning as tool to study the role of physicochemical properties on cell–surface interactions. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **101**, 3019–3032 (2013).
7. Dejana, E., Tournier-Lasserre, E. & Weinstein, B. M. The Control of Vascular Integrity by Endothelial Cell Junctions: Molecular Basis and Pathological Implications. *Developmental Cell* **16**, 209–221 (2009).
8. Dejana, E. Endothelial cell–cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 261–270 (2004).

-
9. Wallez, Y. & Huber, P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1778**, 794–809 (2008).
 10. Vandenbroucke, E., Mehta, D., Minshall, R. & Malik, A. B. Regulation of Endothelial Junctional Permeability. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1123**, 134–145 (2008).
 11. Huber, F. *et al.* Emergent complexity of the cytoskeleton: from single filaments to tissue. *Advances in Physics* **62**, 1–112 (2013).
 12. Fletcher, D. A. & Mullins, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**, 485–492 (2010).
 13. Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. & Plastino, J. Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiological Reviews* **94**, 235–263 (2014).
 14. Gong, B., Wei, X., Qian, J. & Lin, Y. Modeling and Simulations of the Dynamic Behaviors of Actin-Based Cytoskeletal Networks. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **5**, 3720–3734 (2019).
 15. Marieb, E., Hoehn, K., Lachaîne, R. & Moussakova, L. *Anatomie et physiologie humaines*. (2005).
 16. Davies, P. F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiological Reviews* **75**, 519–560 (1995).
 17. Komarova, Y. & Malik, A. B. Regulation of Endothelial Permeability via Paracellular and Transcellular Transport Pathways. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 463–493 (2010).

-
18. Pober, J. S., Min, W. & Bradley, J. R. Mechanisms of Endothelial Dysfunction, Injury, and Death. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **4**, 71–95 (2009).
 19. Behrendt, D. & Ganz, P. Endothelial Function: From Vascular Biology to Clinical Applications. 9.
 20. van Hinsbergh, V. W. M. The endothelium: vascular control of haemostasis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **95**, 198–201 (2001).
 21. Aitoufella, H., Maury, E., Guidet, B. & Offenstadt, G. L'endothélium : un nouvel organe. *Réanimation* **17**, 126–136 (2008).
 22. Conway, E. M. & Carmeliet, P. The diversity of endothelial cells: a challenge for therapeutic angiogenesis. *Genome Biology* **5** (2004).
 23. Aird, W. C. Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: I. Structure, Function, and Mechanisms. *Circulation Research* **100**, 158–173 (2007).
 24. Rubin, L. L. & Staddon, J. M. THE CELL BIOLOGY OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 11–28 (1999).
 25. Jourde-Chiche, N. *et al.* Endothelium structure and function in kidney health and disease. *Nat Rev Nephrol* **15**, 87–108 (2019).
 26. Waring, G. O., Bourne, W. M., Edelhauser, H. F. & Kenyon, K. R. The Corneal Endothelium. *Ophthalmology* **89**, 531–590 (1982).
 27. Guthoff, R. F., Zhivov, A. & Stachs, O. *In vivo* confocal microscopy, an inner vision of the cornea - a major review. *Clinical & Experimental Ophthalmology* **37**, 100–117 (2009).

-
28. Doughty, M. J. Concerning the symmetry of the ‘hexagonal’ cells of the corneal endothelium. *Experimental Eye Research* **55**, 145–154 (1992).
 29. Mergler, S. & Pleyer, U. The human corneal endothelium: New insights into electrophysiology and ion channels. *Progress in Retinal and Eye Research* **26**, 359–378 (2007).
 30. Parkin, J. & Cohen, B. An overview of the immune system. *The Lancet* **357**, 1777–1789 (2001).
 31. Aird, W. C. Endothelial Cell Heterogeneity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2**, a006429–a006429 (2012).
 32. Rocha, V. Z. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. 11 (2009).
 33. Rubanyi, G. M. The Role of Endothelium in Cardiovascular Homeostasis and Diseases: *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **22**, S1–S14 (1993).
 34. Lucas, R., Verin, A. D., Black, S. M. & Catravas, J. D. Regulators of endothelial and epithelial barrier integrity and function in acute lung injury. *Biochemical Pharmacology* **77**, 1763–1772 (2009).
 35. Dauphinee, S. M. & Karsan, A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* **86**, 9–22 (2006).
 36. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801 (2016).
 37. Opal, S. M. & van der Poll, T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *Journal of Internal Medicine* **277**, 277–293 (2015).

-
38. Nguyen, H. B. *et al.* Severe Sepsis and Septic Shock: Review of the Literature and Emergency Department Management Guidelines. *Annals of Emergency Medicine* **48**, 54.e1 (2006).
 39. Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* **420**, 885–891 (2002).
 40. Hotchkiss, R. S., Tinsley, K. W., Swanson, P. E. & Karl, I. E. Endothelial cell apoptosis in sepsis: *Critical Care Medicine* **30**, S225–S228 (2002).
 41. Shapiro, N. I. *et al.* The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. *Critical Care* **14**, R182 (2010).
 42. Volk, T. & Kox, W. J. Endothelium function in sepsis. *Inflammation Research* **49**, 185–198 (2000).
 43. Lee, W. L. Sepsis and Endothelial Permeability. *n engl j med* **3** (2010).
 44. Huang, G. *et al.* Functional and Biomimetic Materials for Engineering of the Three-Dimensional Cell Microenvironment. *Chem. Rev.* **117**, 12764–12850 (2017).
 45. Parker, K. K. *et al.* Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *The FASEB Journal* **16**, 1195–1204 (2002).
 46. Théry, M. *et al.* The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nature Cell Biology* **7**, 947–953 (2005).
 47. Théry, M. Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *J Cell Sci* **123**, 4201–4213 (2010).
 48. Singhvi, R. *et al.* Engineering cell shape and function. *Science* **264**, 696–698 (1994).

-
49. Trepap, X., Lenormand, G. & Fredberg, J. J. Universality in cell mechanics. *Soft Matter* **4**, 1750 (2008).
 50. Ingber, D. E. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB j.* **20**, 811–827 (2006).
 51. Anselme, K., Ploux, L. & Ponche, A. Cell/Material Interfaces: Influence of Surface Chemistry and Surface Topography on Cell Adhesion. *Journal of Adhesion Science and Technology* **24**, 831–852 (2010).
 52. Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M. & Ingber, D. E. Geometric Control of Cell Life and Death. *Science* **276**, 1425–1428 (1997).
 53. Tan, J. L. *et al.* Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 1484–1489 (2003).
 54. Théry, M., Pépin, A., Dressaire, E., Chen, Y. & Bornens, M. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **63**, 341–355 (2006).
 55. Lin, A. S. P., Barrows, T. H., Cartmell, S. H. & Guldberg, R. E. Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds. *Biomaterials* **24**, 481–489 (2003).
 56. Ogaki, R., Alexander, M. & Kingshott, P. Chemical patterning in biointerface science. *Materials Today* **13**, 22–35 (2010).
 57. Jeon, H., Simon, C. G. & Kim, G. A mini-review: Cell response to microscale, nanoscale, and hierarchical patterning of surface structure. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **102**, 1580–1594 (2014).

-
58. Holmes, C. & Tabrizian, M. Surface Functionalization of Biomaterials. in *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences* 187–206 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-397157-9.00016-3.
 59. McGovern, M. E., Kallury, K. M. R. & Thompson, M. Role of Solvent on the Silanization of Glass with Octadecyltrichlorosilane. *Langmuir* **10**, 3607–3614 (1994).
 60. Cuvelier, D., Rossier, O., Bassereau, P. & Nassoy, P. Micropatterned ‘adherent/repellent’ glass surfaces for studying the spreading kinetics of individual red blood cells onto protein-decorated substrates. *European Biophysics Journal* **32**, 342–354 (2003).
 61. Kessel, C. R. & Granick, S. Formation and characterization of a highly ordered and well-anchored alkylsilane monolayer on mica by self-assembly. *Langmuir* **7**, 532–538 (1991).
 62. Mrksich, M. & Whitesides, G. M. Using Self-Assembled Monolayers to Understand the Interactions of Man-made Surfaces with Proteins and Cells. 25.
 63. Fenter, P., Eberhardt, A., Liang, K. S. & Eisenberger, P. Epitaxy and chainlength dependent strain in self-assembled monolayers. *The Journal of Chemical Physics* **106**, 1600–1608 (1997).
 64. Porter, M. D., Bright, T. B., Allara, D. L. & Chidsey, C. E. D. Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3559–3568 (1987).

-
65. Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G. & Whitesides, G. M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **105**, 1103–1170 (2005).
 66. Choi, S. & Chae, J. Methods of reducing non-specific adsorption in microfluidic biosensors. *J. Micromech. Microeng.* **20**, 075015 (2010).
 67. Frederix, F. *et al.* Enhanced Performance of an Affinity Biosensor Interface Based on Mixed Self-Assembled Monolayers of Thiols on Gold. *Langmuir* **19**, 4351–4357 (2003).
 68. Folkers, J. P., Laibinis, P. E. & Whitesides, G. M. Self-assembled monolayers of alkanethiols on gold: comparisons of monolayers containing mixtures of short- and long-chain constituents with methyl and hydroxymethyl terminal groups. *Langmuir* **8**, 1330–1341 (1992).
 69. Piehler, J., Brecht, A., Hehl, K. & Gauglitz, G. Protein interactions in covalently attached dextran layers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **13**, 325–336 (1999).
 70. Ishihara, K., Ishikawa, E., Iwasaki, Y. & Nakabayashi, N. Inhibition of fibroblast cell adhesion on substrate by coating with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **10**, 1047–1061 (1999).
 71. Faucheux, N., Schweiss, R., Lützow, K., Werner, C. & Groth, T. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials* **25**, 2721–2730 (2004).

-
72. Houseman, B. T. & Mrksich, M. The microenvironment of immobilized Arg-Gly-Asp peptides is an important determinant of cell adhesion. *Biomaterials* **22**, 943–955 (2001).
 73. Afara, N., Omanovic, S. & Asghari-Khiavi, M. Functionalization of a gold surface with fibronectin (FN) covalently bound to mixed alkanethiol self-assembled monolayers (SAMs): The influence of SAM composition on its physicochemical properties and FN surface secondary structure. *Thin Solid Films* **522**, 381–389 (2012).
 74. Yoon, S.-H. & Mofrad, M. R. K. Cell adhesion and detachment on gold surfaces modified with a thiol-functionalized RGD peptide. *Biomaterials* **32**, 7286–7296 (2011).
 75. Tew, L. S., Ching, J. Y., Ngalm, S. H. & Khung, Y. L. Driving mesenchymal stem cell differentiation from self-assembled monolayers. *RSC Advances* **8**, 6551–6564 (2018).
 76. Kumar, A. & Whitesides, G. M. Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol “ink” followed by chemical etching. *Appl. Phys. Lett.* **63**, 2002–2004 (1993).
 77. Alom Ruiz, S. & Chen, C. S. Microcontact printing: A tool to pattern. *Soft Matter* **3**, 168–177 (2007).
 78. Azioune, A., Carpi, N., Tseng, Q., Théry, M. & Piel, M. Protein Micropatterns. in *Methods in Cell Biology* vol. 97 133–146 (Elsevier, 2010).
 79. Alvarado, R. E. *et al.* Optically Assisted Surface Functionalization for Protein Arraying in Aqueous Media. *Langmuir* **33**, 10511–10516 (2017).

-
80. Jeyachandran, Y. L., Terfort, A. & Zharnikov, M. Controlled Modification of Protein-Repelling Self-Assembled Monolayers by Ultraviolet Light: The Effect of the Wavelength. *The Journal of Physical Chemistry C* **116**, 9019–9028 (2012).
 81. Toomre, D. & Bewersdorf, J. A New Wave of Cellular Imaging. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **26**, 285–314 (2010).
 82. Palonpon, A. F. *et al.* Raman and SERS microscopy for molecular imaging of live cells. *Nature Protocols* **8**, 677–692 (2013).
 83. Giaever, I. & Keese, C. R. A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature* **366**, 591–592 (1993).
 84. Fang, Y. Label-Free Biosensors for Cell Biology. *International Journal of Electrochemistry* **2011**, 1–16 (2011).
 85. Homola, J. On the sensitivity of surface plasmon resonance sensors with spectral interrogation. **5**.
 86. Homola, J. *Surface Plasmon Resonance Based Sensors. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors.* (2006).
 87. Lecaruyer, P., Maillart, E., Canva, M. & Rolland, J. Generalization of the Rouard method to an absorbing thin-film stack and application to surface plasmon resonance. *Appl. Opt.* **45**, 8419 (2006).
 88. Lecaruyer, P., Mannelli, I., Courtois, V., Goossens, M. & Canva, M. Surface plasmon resonance imaging as a multidimensional surface characterization instrument—Application to biochip genotyping. *Analytica Chimica Acta* **573–574**, 333–340 (2006).

89. Bardin, F., Bellemain, A., Roger, G. & Canva, M. Surface plasmon resonance spectro-imaging sensor for biomolecular surface interaction characterization. *Biosensors and Bioelectronics* **24**, 2100–2105 (2009).
90. Mannelli, I. *et al.* DNA immobilisation procedures for surface plasmon resonance imaging (SPRI) based microarray systems. *Biosensors and Bioelectronics* **22**, 803–809 (2007).
91. Wong, C. L. & Olivo, M. Surface Plasmon Resonance Imaging Sensors: A Review. *Plasmonics* **9**, 809–824 (2014).
92. Rothenhäusler, B. & Knoll, W. Surface-plasmon microscopy. *Nature* **332**, 615–617 (1988).
93. Huang, B., Yu, F. & Zare, R. N. Surface Plasmon Resonance Imaging Using a High Numerical Aperture Microscope Objective. *Analytical Chemistry* **79**, 2979–2983 (2007).
94. Yanase, Y. *et al.* Living cell positioning on the surface of gold film for SPR analysis. *Biosensors and Bioelectronics* **23**, 562–567 (2007).
95. Chabot, V. *et al.* Biosensing based on surface plasmon resonance and living cells. *Biosensors & bioelectronics* **24**, 1667–73 (2009).
96. Giebel, K.-F. *et al.* Imaging of Cell/Substrate Contacts of Living Cells with Surface Plasmon Resonance Microscopy. *Biophysical Journal* **76**, 509–516 (1999).
97. Laplatine, L. Spatial resolution of prism-based surface plasmon resonance microscopy. (2014).
98. Peterson, A. W., Halter, M., Tona, A. & Plant, A. L. High resolution surface plasmon resonance imaging for single cells. *BMC Cell Biology* **15**, 35 (2014).

-
99. Söllradl, T. *et al.* Label-free visualization and quantification of single cell signaling activity using metal-clad waveguide (MCWG)-based microscopy. *Biosensors and Bioelectronics* **100**, 429–436 (2018).
 100. Banville, F. A. *et al.* Spatial resolution versus contrast trade-off enhancement in high-resolution surface plasmon resonance imaging (SPRI) by metal surface nanostructure design. *Opt. Express* **26**, 10616 (2018).
 101. Lecaruyer, P., Canva, M. & Rolland, J. Metallic film optimization in a surface plasmon resonance biosensor by the extended Rouard method. *Appl. Opt.* **46**, 2361 (2007).
 102. Spadavecchia, J., Moreau, J., Hottin, J. & Canva, M. New cysteamine based functionalization for biochip applications. *Sensors and Actuators B: Chemical* **143**, 139–143 (2009).
 103. Baba, A., Taranekar, P., Ponnampati, R. R., Knoll, W. & Advincula, R. C. Electrochemical surface plasmon resonance and waveguide-enhanced glucose biosensing with N-alkylaminated polypyrrole/glucose oxidase multilayers. *ACS Applied Materials and Interfaces* **2**, 2347–2354 (2010).
 104. Grandy, C., Kolb, P., Port, F. & Gottschalk, K.-E. Micropatterning of Cells on Gold Surfaces for Biophysical Applications. *STAR Protocols* **1**, 100106 (2020).
 105. Sereda, A., Moreau, J., Canva, M. & Maillart, E. High performance multi-spectral interrogation for surface plasmon resonance imaging sensors. *Biosensors and Bioelectronics* **54**, 175–180 (2014).
 106. Legland, D., Arganda-Carreras, I. & Andrey, P. MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. **3**.

-
107. Abu Taha, A. & Schnittler, H.-J. Dynamics between actin and the VE-cadherin/catenin complex: Novel aspects of the ARP2/3 complex in regulation of endothelial junctions. *Cell Adhesion & Migration* **8**, 125–135 (2014).
 108. Platt, J. C. Probabilistic Outputs for Support Vector Machines and Comparisons to Regularized Likelihood Methods. in *ADVANCES IN LARGE MARGIN CLASSIFIERS* 61–74 (MIT Press, 1999).
 109. Nelson, W. J. Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**, 766–774 (2003).
 110. Théry, M. *et al.* Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 19771–19776 (2006).
 111. Versaevel, M., Grevesse, T. & Gabriele, S. Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells. *Nat Commun* **3**, 671 (2012).
 112. Abadian, P. N., Kelley, C. P. & Goluch, E. D. Cellular Analysis and Detection Using Surface Plasmon Resonance Techniques. *Anal. Chem.* **86**, 2799–2812 (2014).
 113. Söllradl, T. *et al.* Metal clad waveguide (MCWG) based imaging using a high numerical aperture microscope objective. *Opt. Express, OE* **25**, 1666–1679 (2017).
 114. Minami, T. *et al.* Thrombin and Phenotypic Modulation of the Endothelium. 13.
 115. Laposata, M., Dohnarsky, D. & Shin, H. Thrombin-induced gap formation in confluent endothelial cell monolayers in vitro. *Blood* **62**, 549–556 (1983).

-
116. Vouret-Craviari, V., Boquet, P., Pouysségur, J. & Van Obberghen-Schilling, E. Regulation of the Actin Cytoskeleton by Thrombin in Human Endothelial Cells: Role of Rho Proteins in Endothelial Barrier Function. *MBoC* **9**, 2639–2653 (1998).
117. Slack, M. D., Martinez, E. D., Wu, L. F. & Altschuler, S. J. Characterizing heterogeneous cellular responses to perturbations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 19306–19311 (2008).
118. Altschuler, S. J. & Wu, L. F. Cellular Heterogeneity: Do Differences Make a Difference? *Cell* **141**, 559–563 (2010).
119. Paszek, P. *et al.* Population robustness arising from cellular heterogeneity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 11644–11649 (2010).
120. Michl, J., Park, K. C. & Swietach, P. Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems. *Commun Biol* **2**, 144 (2019).
121. Jiang, Y. & Wang, W. Point Spread Function of Objective-Based Surface Plasmon Resonance Microscopy. *Anal. Chem.* **90**, 9650–9656 (2018).
122. Ermis, M., Antmen, E. & Hasirci, V. Micro and Nanofabrication methods to control cell-substrate interactions and cell behavior: A review from the tissue engineering perspective. *Bioactive Materials* **3**, 355–369 (2018).
123. Vartanian, K. B., Berny, M. A., McCarty, O. J. T., Hanson, S. R. & Hinds, M. T. Cytoskeletal structure regulates endothelial cell immunogenicity independent of fluid shear stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **298**, C333–C341 (2010).

-
124. Vartanian, K. B., Kirkpatrick, S. J., Hanson, S. R. & Hinds, M. T. Endothelial cell cytoskeletal alignment independent of fluid shear stress on micropatterned surfaces. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **371**, 787–792 (2008).
125. Anderson, D. E. J. & Hinds, M. T. Endothelial Cell Micropatterning: Methods, Effects, and Applications. *Ann Biomed Eng* **39**, 2329–2345 (2011).
126. Lin, X. & Helmke, B. P. Micropatterned Structural Control Suppresses Mechano-taxis of Endothelial Cells. *Biophysical Journal* **95**, 3066–3078 (2008).
127. Wu, C.-C. *et al.* Directional shear flow and Rho activation prevent the endothelial cell apoptosis induced by micropatterned anisotropic geometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 1254–1259 (2007).
128. Lin, X. & Helmke, B. P. Cell Structure Controls Endothelial Cell Migration under Fluid Shear Stress. *Cel. Mol. Bioeng.* **2**, 231–243 (2009).
129. Roca-Cusachs, P. *et al.* Micropatterning of Single Endothelial Cell Shape Reveals a Tight Coupling between Nuclear Volume in G1 and Proliferation. *Biophysical Journal* **94**, 4984–4995 (2008).
130. Mrksich, M., Dike, L. E., Tien, J., Ingber, D. E. & Whitesides, G. M. Using Microcontact Printing to Pattern the Attachment of Mammalian Cells to Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Transparent Films of Gold and Silver. *Experimental Cell Research* **235**, 305–313 (1997).
131. Heumann, D. & Roger, T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta* **323**, 59–72 (2002).

-
132. Frey, E. A. & Brett Finlay, B. Lipopolysaccharide induces apoptosis in a bovine endothelial cell line via a soluble CD14 dependent pathway. *Microbial Pathogenesis* **24**, 101–109 (1998).
133. van Nieuw Amerongen, G. P. *et al.* Involvement of Rho Kinase in Endothelial Barrier Maintenance. *ATVB* **27**, 2332–2339 (2007).
134. Ishizaki, T. *et al.* Pharmacological Properties of Y-27632, a Specific Inhibitor of Rho-Associated Kinases. **8**.
135. Adamson, R. H. *et al.* Rho and rho kinase modulation of barrier properties: cultured endothelial cells and intact microvessels of rats and mice. *The Journal of Physiology* **539**, 295–308 (2002).
136. Wilkerson, B. A., Grass, G. D., Wing, S. B., Argraves, W. S. & Argraves, K. M. Sphingosine 1-Phosphate (S1P) Carrier-dependent Regulation of Endothelial Barrier: HIGH DENSITY LIPOPROTEIN (HDL)-S1P PROLONGS ENDOTHELIAL BARRIER ENHANCEMENT AS COMPARED WITH ALBUMIN-S1P VIA EFFECTS ON LEVELS, TRAFFICKING, AND SIGNALING OF S1P1. *J. Biol. Chem.* **287**, 44645–44653 (2012).
137. James, J., Goluch, E. D., Hu, H., Liu, C. & Mrksich, M. Subcellular curvature at the perimeter of micropatterned cells influences lamellipodial distribution and cell polarity. *Cell Motil. Cytoskeleton* **65**, 841–852 (2008).
138. Vogel, V. & Sheetz, M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 265 (2006).
139. Abercrombie, M. Contact inhibition in tissue culture. *In Vitro* **6**, 128–142 (1970).

-
140. Banville, F. A. *et al.* Nanoplasmonics-enhanced label-free imaging of endothelial cell monolayer integrity. *Biosensors and Bioelectronics* **141**, 111478 (2019).
141. Banville, F. A., Söllradl, T., Zermatten, P.-J., Grandbois, M. & Charette, P. G. Improved resolution in SPR and MCWG microscopy by combining images acquired with distinct mode propagation directions. *Opt. Lett.* **40**, 1165 (2015).
142. Di Cio, S. & Gautrot, J. E. Cell sensing of physical properties at the nanoscale: Mechanisms and control of cell adhesion and phenotype. *Acta Biomaterialia* **30**, 26–48 (2016).
143. Huang, J. *et al.* Impact of Order and Disorder in RGD Nanopatterns on Cell Adhesion. *Nano Lett.* **9**, 1111–1116 (2009).
144. Arnold, M. *et al.* Activation of Integrin Function by Nanopatterned Adhesive Interfaces. *ChemPhysChem* **5**, 383–388 (2004).
145. Okumura, N., Kinoshita, S. & Koizumi, N. Cell-Based Approach for Treatment of Corneal Endothelial Dysfunction. *Cornea* **33**, S37–S41 (2014).
146. Wongvisavavit, R., Parekh, M., Ahmad, S. & Daniels, J. T. Challenges in corneal endothelial cell culture. *Regenerative Medicine* **16**, 871–891 (2021).
147. Roy, O., Beaulieu Leclerc, V., Bourget, J.-M., Theriault, M. & Proulx, S. Understanding the Process of Corneal Endothelial Morphological Change In Vitro. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **56**, 1228–1237 (2015).

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Adhésion aléatoire de cellules endothéliales EAhy926 sur une lame d'or après 2 jours d'adhésion dans un incubateur.....2

Figure 2: Structure de la fibronectine⁴ et structure chimique du tripeptide RGD (Pubchem CID 104802). 12

Figure 3: Interactions moléculaires pour la formation de points focaux d'adhésion⁶. 13

Figure 4: Différentes protéines d'adhésion entre les différentes jonctions des cellules endothéliales⁹. 14

Figure 5: Schéma des composantes structurelles principales du cytosquelette dans une cellule eucaryote et les différentes architectures des filaments d'actine et leurs protéines spécifiques¹⁴. **a**, Structure cristalline de l'actine globulaire. **b**, Structure de tous les atomes et schéma d'un simple filament d'actine. **c**, Réseau branché d'actine formé grâce au complexe protéique Arp 2/3 et des protéines de coiffage qui bloquent la croissance du filament. **d**, Fagot de filaments parallèles d'actine et leurs protéines de réticulation (fascine). **e**, Module d'actine interconnectée par des protéines de pontage (filamine..). **f**, Les fibres de stress correspondant à des fagots d'actine antiparallèles réorganisés sous l'effet de la myosine et de l' α -actinine. 15

Figure 6: Structure du réseau vasculaire¹⁵. 16

Figure 7: **a**, Image en microscopie électronique à balayage d'un endothélium cornéen de lapin (barre d'échelle = 60 μm)²⁸. **b**, Arrangement en mosaïque du centre d'un endothélium cornéen d'un jeune adulte caucasien montrant des cellules hexagonales à 6 cotés communicants (barre d'échelle = 135 μm)²⁹. 18

Figure 8: Ruptures des jonctions intercellulaires induites par des cytokines et d'autres médiateurs d'inflammation. La génération de ces trous dans le tissu endothélial provoque des fuites micro vasculaires et des œdèmes caractéristiques du sepsis⁴³.....20

Figure 9: Schéma illustratif des principaux composants du microenvironnement cellulaire. Les facteurs déterminants sont : **a**, Les cellules voisines qui adhèrent entre-elles via des jonctions intercellulaires. **b**, La MEC à laquelle les cellules adhèrent au niveau des points focaux d'intégrines. **c**, Des facteurs biochimiques composés de nutriments (oxygène, glucose et acides aminés), de molécules de signalisation (facteurs de croissance, cytokines et hormones) et d'un ensemble d'acides et de bases (eau...) régulant le pH. **d**, Des facteurs biophysiques comme des contraintes mécaniques, du stress, et des stimuli électriques, magnétiques, acoustiques, et thermiques auxquelles répondent les cellules in-vivo. [Adapté de 44].21

Figure 10: Les différentes cinétiques et phases de l'adhésion cellulaire⁵¹.22

Figure 11: Effets de la microstructuration sur l'adhésion, la structure et la contractilité cellulaire⁴⁷. **a**, Cellules adhérant sur des petits patrons adaptés à la surface des cellules. **b**, Cellules adhérant sur des patrons dont la surface est plus grande. **c**, Adhésion des cellules dans des microstructures ayant des bords droits adhésifs en forme triangulaire. **d**, Adhésion des cellules dans une forme en V avec 2 cotés adhésifs et un non adhésif.24

Figure 12: Schéma d'un SAM idéal monocristallin d'alcanethiols sur un substrat d'or. Les caractéristiques du SAM sont présentées en détails⁶⁵.26

Figure 13: Schéma d'ensemble de la différenciation de CSM en fonction des groupements terminaux fonctionnels à la surface pendant 14 jours de culture cellulaire sur un substrat⁷⁵.28

Figure 14: Les différentes étapes de la technique de microcontact printing.....29

Figure 15: Principe d'un biocapteur cellulaire sans marquage et ses différentes études. A- étalement et adhésion des cellules sur le substrat. B- Interactions intercellulaires et formation d'une barrière cellulaire. C- Réponse cellulaire à différents stimuli comme des molécules de signalisation, virus et toxines. Cette réponse est mesurée par un système d'acquisition adapté.31

Figure 16: Diagramme de Jablonski simplifié pour l'absorption de 1 photon.32

Figure 17: Schémas simplifiés d'un microscope optique, microscope à épifluorescence et microscope confocal.34

Figure 18: Schéma des ondes de plasmons de surface se propageant à l'interface entre un diélectrique et un métal. L'intensité de l'onde décroît proportionnellement en fonction de la distance à l'interface. (+) et (-) correspondent à l'oscillation collective des électrons de conduction à la surface d'un métal semi-infini.38

Figure 19: Excitation des plasmons de surface en configuration de Kretschmann avec un prisme d'indice n_p recouvert d'une couche métallique d'indice n_m et d'épaisseur e_m de quelques nanomètres.39

Figure 20: Illustration de l'atténuation exponentielle de l'intensité du champ électrique à l'interface métal/diélectrique.40

Figure 21: **a)** Profondeur de pénétration d'un plasmon de surface (L_z, d) à l'interface entre le métal (= or) et un milieu diélectrique (= eau) (en nm) en fonction de la longueur d'onde⁸⁶. **b)** Longueur de propagation L_x en (μm) en fonction de la longueur d'onde à l'interface entre un substrat d'or et soit un milieu diélectrique soit l'air. [figure extraite de la thèse de JF Bryche]41

Figure 22: **(a)** Décalage angulaire dû à la formation d'un film biomoléculaire de différentes épaisseurs⁸⁸. **(b)** Décalage spectral dû à un changement de l'indice de réfraction à la surface de l'or⁸⁹.42

Figure 23: Principe d'un microscope SPRI avec objectif à forte ouverture numérique ($\text{NA}=1,40$)⁹³.43

Figure 24: Schéma du protocole de microstructuration des substrats d'or en combinant des techniques de chimie de surface et microstructuration par illumination Deep-UVs. I- dépôt d'une couche d'or sur les substrats de verre nettoyés. II- Passivation des substrats d'or avec des molécules de PEG-SH. III- Photo dégradation des molécules de PEG par illumination Deep-UVs selon les géométries du photomasque. IV- fonctionnalisation des substrats d'or microstructurés avec des molécules d'adhésion. V- Dépôt de cellules sur les substrats microstructurés et contrôle de l'adhésion cellulaire.47

Figure 25: Nomenclature chimique du PEG-SH utilisé pour la passivation des surfaces d'or.48

Figure 26: Caractérisation de l'étape de passivation des substrats d'or dans une solution de PEG-SH à 0.5 mM : Caractérisation XPS de la surface des substrats d'or : **a)** après nettoyage **b1)** après incubation dans la solution de PEG-SH pendant 1 h. **b2)** après

incubation dans la solution de PEG-SH pendant 12 h. Caractérisations cellulaires et image en champs clair des échantillons d'or où les cellules endothéliales EAhy926 ont été déposées : c) après l'étape de nettoyage d) après incubation dans une solution de PEG-SH pendant 1 h. Les images ont été effectuées avec un objectif 10X permettant d'observer une grande surface de l'échantillon. (Barre d'échelle = 100 μm).50

Figure 27: Caractérisation de l'étape de microstructuration de la surface des substrats d'or par illumination DUVs. Caractérisations XPS de la surface des substrats d'or : a) au niveau des régions quartz du photomasque et b) au niveau des régions chrome du photomasque. Caractérisations SPR de la surface des substrats d'or passivés après expositions aux DUVs à travers un photomasque : c) balayage spectral à un angle fixé à 26° dans l'air. d) Image SPR de la surface du substrat d'or à $\theta_{\text{res}} = 26^\circ$ et $\lambda_{\text{res}} = 700$ nm.53

Figure 28: Cinétique en SPR de la déposition de molécules d'adhésion à la surface des substrats d'or passivés et exposés aux DUVs à travers un photomasque selon des structures définies : a) Incubation dans une solution de fibronectine (5 $\mu\text{g/mL}$) pendant 45 min. b) Incubation dans le mix d'une solution de fibronectine, collagène, laminine pendant 5 min. Les courbes noires représentent la moyenne dans les 5 régions d'intérêts choisies dans les microstructures (cercles jaunes dans les images SPR), tandis que les courbes bleues représentant la moyenne des 5 régions d'intérêts choisies dans les régions passivées (cercles bleus dans les images SPR). L'unité du signal SPR est en unité arbitraire (u.a).55

Figure 29: Marquage au Bleu de Coomassie des molécules d'adhésion déposées dans les régions adhésives où les films de PEG-SH ont été photodégradés selon les géométries du photomasque : a) hexagones de 35 μm de diamètre, espacés de 50 μm , observés en lumière en champs clair et le profil d'intensité correspondant à la ligne noire. b) hexagones de 35 μm de diamètre, espacés de 3 μm , observées en lumière en champs clair et le profil d'intensité correspondant à la ligne noire (en abscisse sont représentées les coordonnées (μm) et en ordonnées l'intensité des pixels (a. u)).56

Figure 30: Images en champs clair de cellules EAhy926 adhérant sur les substrats d'or microstructurés selon différentes géométries des microstructures du photomasque (les microstructures en quartz sont représentées sur les images BF du photomasque en blanc) : a) géométries carrées de 250 μm de côté, espacés de 250 μm . ; 1) sans fonctionnalisation avec des molécules d'adhésion, 2) fonctionnalisation avec mix fibronectine/laminine/collagène. b) géométries en lignes : lignes de 100 μm d'épaisseur, espacées de 100 μm . c) géométries hexagonales : hexagones de 100 μm de diamètre, espacés de 25 μm . (Barre d'échelle = 100 μm).57

Figure 31: Résumé du protocole de dépôt et de culture des cellules dans les microstructures.60

Figure 32: Distribution du nombre de cellules EAhy926 dans des régions adhésives de surfaces différentes : $6595 \mu\text{m}^2$, $2338 \mu\text{m}^2$ et $584 \mu\text{m}^2$. **(a)** Les régions adhésives fonctionnalisées avec les molécules d'adhésion ont été révélées par lumière en champs clair (BF) au bleu de Coomassie. Après fixation, les cellules sont également observées en lumière en champs clair et leurs noyaux marqués au DAPI sont observées avec un microscope à fluorescence. **(b)** La distribution des cellules dans les 3 différentes régions adhésives est représentée par le graphique en violons. Les quantifications pour les surfaces $6595 \mu\text{m}^2$, $2338 \mu\text{m}^2$ et $584 \mu\text{m}^2$ ont été effectuées, respectivement, sur un nombre total $N = 43$, 224 et 690 . Nous avons comparé les mêmes surfaces de travail, ainsi le nombre d'hexagones augmente lorsqu'on réduit leurs diamètres.62

Figure 33: **a)** Distribution du nombre moyen de cellules EAhy926 dans des régions adhésives pour 10 surfaces différentes. Les points représentent les moyennes et l'ombre bleue correspond à l'écart type. **b)** Pourcentage d'occupation des microstructures par un nombre supérieur ou égal à 1 cellule (zone orange), par exactement 1 cellule (zone verte) et par exactement 0 cellule (zone rouge). Le nombre total de cellules pour a et b est, pour chaque point de mesure allant de $6495 \mu\text{m}^2$ (diamètre de $100 \mu\text{m}$) à $65 \mu\text{m}^2$ (diamètre de $10 \mu\text{m}$) avec un pas de $10 \mu\text{m}$ entre les diamètres est respectivement : $N = 45, 43, 55, 90, 156, 224, 340, 396, 525, 690$64

Figure 34: **a)** Distribution du nombre de cellules RBE4 dans des régions adhésives de surfaces différentes : $6595 \mu\text{m}^2$, $2338 \mu\text{m}^2$, $584 \mu\text{m}^2$ et $260 \mu\text{m}^2$. Les régions adhésives fonctionnalisées avec les molécules d'adhésion ont été révélées par lumière en champs clair (BF) au bleu de Coomassie. Après fixation, les cellules sont également observées en lumière en champs clair et leurs noyaux marqués au DAPI sont observées avec un microscope à fluorescence. **b)** La distribution des cellules dans les 4 différentes régions adhésives est représentée par le graphique en violons. **c)** Distribution du nombre moyen de cellules RBE4 dans des régions adhésives de 10 surfaces différentes. Les points représentent les moyennes et l'ombre bleue correspond à l'écart type. **d)** Pourcentage d'occupation des microstructures par un nombre supérieur ou égal à 1 cellule (zone orange), par exactement 1 cellule (zone verte) et par exactement 0 cellule (zone rouge). Le nombre total de cellules pour b, c et d est, pour chaque point de mesure allant de $6495 \mu\text{m}^2$ (diamètre de $100 \mu\text{m}$) à $65 \mu\text{m}^2$ (diamètre de $10 \mu\text{m}$) avec un pas de $10 \mu\text{m}$ entre les diamètres est respectivement : $N = 40, 40, 64, 55, 52, 96, 135, 179, 213, 140$66

Figure 35: Images en lumière blanche de cellules EAhy926 fixées après 48 h d'adhésion sur des substrats d'or microstructurés selon des hexagones de $30 \mu\text{m}$ de diamètre et des espacements variants entre $12 \mu\text{m}$ et $0 \mu\text{m}$68

Figure 36: Formation de jonctions VE-cadhérines entre les cellules EAhy926 fixées après 48 h d'adhésion sur des substrats d'or microstructurés selon des hexagones de 30 μm de diamètres espacés de 0 μm et 8 μm . Les cellules fixées sont observées en lumière blanche (colonne de gauche) et leurs jonctions VE-cadhérines marquées sont observées par microscopie à fluorescence (colonne de droite) (Barre d'échelle : 20 μm - objectif 40X). 69

Figure 37: Prolifération et division cellulaire dans les groupes hexagonaux. Colonne de gauche : images en lumière blanche du masque chrome/quartz (les hexagones sont en quartz) pour les hexagones de 30 μm de diamètre et des espacements de 3 μm et 6 μm . Colonne de droite : Image en fluorescence de noyaux marqués au DAPI pour les deux espacements aussi. 70

Figure 38: Unité élémentaire de la monocouche cellulaire endothéliale in vitro : Gauche : Patron du groupe de 3 hexagones définis par leur diamètre (d) et l'espacement entre eux (e). Milieu : Image en lumière blanche d'un groupe de 3 hexagones de 30 μm de diamètres espacés de 3 μm et révélés avec marquage au bleu de Coomassie. Droite : Image SPR du même groupe de 3 hexagones observé en lumière blanche (au milieu). La flèche blanche montre le sens de propagation du plasmon. (Barre d'échelle = 30 μm). 71

Figure 39: Protocole expérimental pour la fabrication d'un modèle de monocouche cellulaire endothéliale dans le groupe de 3 hexagones. 71

Figure 40: Distribution du nombre de cellules dans les groupes de 3 hexagones de 30 μm de diamètre en fonction de la taille des espacements qui les séparent. L'axe des coordonnées en X correspond au nombre de cellules dans les hexagones tandis que l'axe des coordonnées en Y représentent le nombre de groupes de 3 hexagones. Le comptage a été effectué sur 21 groupes de 3 hexagones pour chaque espacement. 72

Figure 41: Schéma du banc SPR à prisme en configuration de Kretschmann disponible au Laboratoire Charles Fabry¹⁰⁵. 75

Figure 42: Segmentation des images : a) en lumière blanche des cellules, b) en fluorescence des noyaux en utilisant MorpholibJ. 76

Figure 43: La segmentation des images en BF des cellules permet d'associer un label pour chaque hexagone (a). Ensuite, nous quantifions le nombre de couleurs (labels) de noyaux, segmentés également au sein des hexagones. 77

Figure 44: Résumé de tous les paramètres expérimentaux importants pour la fabrication de la monocouche cellulaire endothéliale.80

Figure 45: Schéma du protocole expérimental de formation des jonctions entre les cellules confinées dans les microstructures dans les groupes de 3 hexagones.81

Figure 46: Vérification de la formation des jonctions cadhérines entre les cellules confinées dans des hexagones dont la surface d'adhésion est de $3400 \mu\text{m}^2$. **a)** Distribution du nombre de cellules dans les hexagones en fonction des surfaces des régions adhésives. Une surface de $3400 \mu\text{m}^2$ correspond à des hexagones de $72.5 \mu\text{m}$ de diamètre où, en moyenne, 3 cellules sont confinées. **b)** Marquage au bleu de Coomassie des hexagones de $72.5 \mu\text{m}$ de diamètre, espacés de $25 \mu\text{m}$. **c)** Images en fluorescence des noyaux marqués au DAPI et des jonctions marquées avec CD144-FITC de 4 hexagones.82

Figure 47: Images en fluorescence des filaments d'actine et des noyaux de groupes de 3 hexagones de surface identique égale à $584 \mu\text{m}^2$ et dont les espacements varient entre $3 \mu\text{m}$ (a) et $7 \mu\text{m}$ (b). La 1^{ère} ligne correspond aux noyaux marqués au DAPI, tandis que la 2^{ème} ligne correspond au marquage des filaments d'actine avec de la phalloïdine conjuguée au Texas-Red. Les flèches orange correspondent aux fibres de stress.....84

Figure 48: Images en fluorescence : des noyaux marqués au DAPI prises simultanément des les images de fluorescence des jonctions cellule/cellule marquées avec un marqueur de VE-cadhérines conjugué au FITC de 5 groupes de 3 hexagones différents. Chaque hexagone a une surface adhésive de $584 \mu\text{m}^2$ soit $30 \mu\text{m}$ de diamètre et sont espacés soit de $3 \mu\text{m}$, $4 \mu\text{m}$ ou $5 \mu\text{m}$. Les cellules sont fixées après 24 h d'adhésion dans l'incubateur.85

Figure 49: Traitement des images pour la génération de la carte d'intensité des jonctions formées entre les cellules dans les groupes de 3 hexagones.87

Figure 50: Carte d'intensité de la superposition des images de fluorescence des jonctions VE-cadhérines formées entre les cellules dans les groupes de 3 hexagones (diamètre = $30 \mu\text{m}$, espacement = $3 \mu\text{m}$). **a)** carte de la moyenne des intensités de 52 images de fluorescence de jonctions VE-cadhérines de groupes de 3 hexagones. **b)** La carte d'intensité représentée en (a) avec la reconstitution des hexagones estimés du photomasque de microstructuration. Les hexagones sont reconstitués à partir du barycentre des noyaux calculés précédemment et des dimensions théoriques connues des hexagones. Ils sont redimensionnés en fonction de la taille des pixels des images de fluorescence.88

Figure 51: Distribution de la distance moyenne entre les noyaux des 3 cellules dans les groupes de 3 hexagones. En bleu : après 2 h d'adhésion ; En rouge : après 24 h d'adhésion. La ligne en pointillés correspond à la distance théorique entre les centres de masse des hexagones dans les groupes de 3 hexagones sur le photomasque. Les expériences ont été effectuées sur 30 groupes de 3 hexagones de 30 μm de diamètre, espacés de 3 μm89

Figure 52: Protocole expérimental et imagerie par microscopie SPR des groupes de 3 hexagones microstructurés sur des substrats d'or.....91

Figure 53: Cinétique des cellules dans les groupes de 3 hexagones (diamètre : 30 μm , espacement = 3 μm) après injection de la thrombine à une concentration de 1 U/mL. Les images en contraste de phase ont été acquises dans des conditions d'incubateur, pendant 2h. Ici, nous montrons un aperçu de la cinétique toutes les 30 minutes.93

Figure 54: protocole expérimental pour les expériences de marquage des jonctions et des filaments d'actine après stimulation avec la thrombine.93

Figure 55 : Cellules dans les groupes de 3 hexagones de 30 μm de diamètre, espacés de 3 μm après stimulation avec de la thrombine à 1 U/mL. Les cellules sont fixées après 24 h d'adhésion dans l'incubateur et les jonctions VE cadhérines et les noyaux sont marqués. Les images 3D ont été obtenues avec un microscope confocal.95

Figure 56: Cellules dans les groupes de 3 hexagones espacés de différents espacements (1 μm , 3 μm et 7 μm). Les cellules dans ces groupes ont été stimulées avec de la thrombine à 1 U/mL pendant 1 h dans un incubateur cellulaire. Les filaments d'actine et les noyaux sont marqués avec respectivement Texas-Red phalloïdine et du DAPI. Les images en 3D sont obtenues avec un microscope confocal.97

Figure 57: Suivi des réponses cellulaires au cours du temps des groupes de 3 hexagones dans une condition expérimentale de contrôle (aucune injection). Les images BF et les images SPR sont prises simultanément au début et à la fin de l'expérience. Nous représentons le signal SPR moyen pour chacun des 5 groupes de 3 hexagones isolés (**Matériels et méthodes**).99

Figure 58: Suivi des réponses cellulaires au cours du temps des groupes de 3 hexagones après injection de différentes concentrations de thrombine. Pour chaque expérience, les images BF et les images SPR sont prises simultanément avant et après injection de la thrombine. Pour toutes ces expériences, nous représentons le signal SPR moyen pour chaque groupe de 3 hexagones isolés (**Matériels et méthodes**). a) Injection de 10 U/mL

de thrombine. **b)** Injection de 1 U/ml de thrombine. **c)** Injection de 0.1 U/mL de thrombine. 101

Figure 59: Graphique représentant les médianes et leurs quartiles figurés avec les espaces colorés autour des courbes après : En noir : Pas d'injection de thrombine ; En rouge : Injection de 0.1 U/mL de thrombine ; En vert : Injection de 1 U/mL de thrombine. 102

Figure 60: Injection de 10 μ M de l'antagoniste des récepteurs PAR-1 appelés RWJ56110, suivie de l'injection de 1 U/mL de thrombine. Les images SPR sont prises avant injection de l'antagoniste (haut) et après injection de la thrombine, à la fin de l'expérience (bas). Les courbes correspondent au signal SPR moyen des valeurs des pixels de chaque groupe de 3 hexagones. Dans le 1^{er} graphique, la normalisation est effectuée par rapport à l'injection de l'antagoniste, tandis que dans le 2^{ème} graphique, la normalisation est effectuée par rapport à l'injection de la thrombine (**matériels et méthodes**)..... 103

Figure 61: Cinétique des cellules dans les groupes de 3 hexagones après 2 h de temps d'adhésion initial dans l'incubateur. La thrombine est injectée après 30 minutes de stabilisation des cellules. **a)** Protocole expérimental et imagerie par microscopie SPR des groupes de 3 hexagones microstructurés sur des substrats d'or. **b)** Cinétiques après injection de 10 U/mL de thrombine. Les images SPR sont extraites de l'expérience de cinétique toutes les 20 minutes. Pour toutes ces expériences, nous représentons le signal SPR moyen pour chaque groupe de 3 hexagones isolés (**Matériels et méthodes**)... 106

Figure 62 : Cinétique des cellules dans les groupes de 3 hexagones après 24 h de temps de formation des jonctions dans l'incubateur. à gauche : images SPR extraites de la cinétique des cellules toutes les 20 minutes. à droite : évolution du signal SPR au cours du temps pour chacun des 6 groupes de 3 hexagones..... 107

Figure 63: Le phénol rouge est utilisé comme un indicateur de pH. La couleur du milieu de culture informe sur la physiologie des cellules et les solutions à adopter. 110

Figure 64: Microscope à contraste interférentiel contenant une chambre environnementale pour les études de cellules vivantes (LSM Olympus FV1000 spectral)..... 111

Figure 65: Cinétique des cellules dans les groupes de 3 hexagones dans un milieu de culture contenant le tampon L-15. **a)** Images obtenues en microscopie DIC des cellules dans les groupes de 3 hexagones au cours du temps. **b)** Images en BF prises

simultanément que les images SPR des cellules dans les groupes de 3 hexagones au cours du temps. 113

Figure 66: Cinétique des cellules dans les groupes de 3 hexagones dans un milieu de culture contenant de l'HEPES. Les images ont été obtenues par microscopie DIC des cellules dans les groupes de 3 hexagones au cours du temps. 114

Figure 67: Cinétique des cellules dans les groupes de 3 hexagones dans un milieu de culture contenant de l'HEPES mais sans contrôle de la T°. Les images en BF ont été prises simultanément que les images SPR des cellules dans les groupes de 3 hexagones au cours du temps..... 115

Figure 68: Schéma du système d'imagerie SPR utilisé pour les études de cinétiques en temps réel. 116

Figure 69: Nappe angulo-spectrale expérimentale d'un échantillon d'or plan de 30nm d'épaisseur et en pointillés la courbe simulée du plasmon de surface à l'interface or/eau [Figure extraite de la thèse de JF Bryche]. 117

Figure 70: Résolution spatiale (μm) en fonction de la profondeur de pénétration (μm). Nous nous intéressons à la courbe SPR-Au dans l'eau pour différentes longueurs d'onde allant de 555 nm à 900 nm¹¹³. 118

Figure 71: Scan angulaire d'une lame d'or microstructurée selon des hexagones de 30 μm de diamètre, espacés par des régions passivées (RP) de 25 μm . a) Signal SPR en fonction des différents angles de résonance définis par le déplacement des moteurs du système d'imagerie SPR. Ici sont représentées des courbes correspondant à des régions de la lame au niveau des microstructure (traits pleins) ou au niveau des régions passivées (traits pointillés). b) Images SPR avec les régions d'intérêts sélectionnées dans les microstructures (Hex0, Hex1 et Hex2) ou dans les régions passivées (RP1, RP2 et RP3). Les traits en pointillés noirs dans (a) délimitent la plage angulaire qui contient l'angle de résonance optimal (la direction de propagation est montrée par la barre SP). 119

Figure 72: Vérification du focus des cellules dans les groupes de 3 hexagones pour les expériences de cinétique. à gauche : Image SPR des cellules dans les groupes de 3 hexagones (hexagones : $d = 30 \mu\text{m}$ et $e = 3 \mu\text{m}$). à droite : image en FFT correspondant à l'image SPR de gauche. Les carrés bleus montrent des patrons de diffractions nous permettant de nous positionner au focus..... 120

Figure 73: Les différentes étapes de traitement des images SPR pour générer les graphiques de l'évolution du signal SPR au cours du temps. 1) Division des images TM au cours du temps par l'image moyenne en TE. 2) Sélection de ROIs dans les régions passivées autour des groupes de 3 hexagones (R1, R2 et R3) et pour isoler et centrer chaque groupe de 3 hexagones (ex : ROI rouge). On soustrait la valeur moyenne de la ROI (rouge) la valeur moyenne des régions R1, R2 et R3 au cours du temps. 3) On soustrait la 1^{ère} image à toutes les images au cours du temps afin de normaliser le signal. Idéalement, nous choisissons 4 ROIs dans les régions passivées autour des groupes de 3 hexagones (carrés bleus) afin de calculer une moyenne à soustraire à la ROI rouge.
..... 123

Figure 74: Plan du masque n°1 fabriqué dans ces travaux de thèse 134

Figure 75: Plan du masque n°2 fabriqué dans ces travaux de thèse. **a)** Plan général d'une matrice élémentaire qui est répétée 4 fois dans ce masque. **b)** Plan détaillé pour chaque géométrie avec les variations des tailles des cotés ou des diamètres..... 136

Figure 76: Plan du masque n°3 fabriqué dans cette thèse. **a)** Plan général du masque avec des groupes d'hexagones dont les diamètres varient de 60 μm à 5 μm avec un pas de 2.5 μm . **b)** Pour chaque groupe d'hexagones d'un diamètre fixé, nous faisons varier les espacements entre les hexagones à 50 μm , puis de 25 μm à 0 μm entre les hexagones avec un pas de 1 μm 137

Figure 77: Plan général du masque n°4 fabriqué dans cette thèse. **a)** Structures des groupes contenant un nombre défini d'hexagones (1, 3, 7, 19, 37, 61, 91 hexagones). **b)** Variation des diamètres des hexagones entre 50 μm et 5 μm avec un pas de 2.5 μm pour les 7 groupes d'hexagones présentés dans (a). Ensuite pour tous ces groupes, nous faisons varier les espacements entre 0 μm et 15 μm avec un pas de 0.5 μm et ensuite de 15 μm à 20 μm avec un pas de 1 μm 138

Figure 78: Plan général du masque n°5 fabriqué dans cette thèse. Plan général du masque avec la disposition des 8 différentes matrices élémentaires. Chaque matrice est détaillée avec le nombre d'hexagones dans les structures, les variations des diamètres et des espacements. 143

Figure 79: Image de fluorescence des molécules d'adhésion de poly-L-ornithine – FITC déposées selon un timbre de lignes de 2 μm d'épaisseur espacées de 5 μm 144

Figure 80: Images de fluorescence d'une lamelle de verre où 30 nm d'or ont été déposés sur une moitié de lame. Les molécules d'adhésion poly-L-ornithine - FITC ont été

déposées par μ CP selon un timbre négatif de cercles de 10 μ m à 15 μ m de diamètre. Ensuite des cellules PC3 ont été incubées pendant 2 jours, fixées et observées par microscopie à fluorescence. 145

Figure 81: Images de fluorescence des molécules d'adhésion streptavidine - Cy3 déposées par μ CP selon un moule PDMS contenant des microstructures en ligne. L'image de gauche est le résultat de la stratégie 1 et l'image de droite a été obtenue avec la stratégie 2. 146

Figure 82: Schéma de l'angle réfléchi par l'échantillon vers l'objectif formant un angle θ à l'interface. r est le rayon de l'annulus au niveau du BFP de l'objectif. 149

Figure 83 : Groupes de cellules dans les groupes de 3 hexagones observés par microscopie SPR pour 2 expériences différentes (a et b). Ces groupes ont ensuite été observés par microscopie à fluorescence afin de compter le nombre de noyaux dans les groupes. Pour l'expériences (b), nous montrons également l'image BF prise simultanément que l'image SPR (BF SPRI) avec le microscope SPR. Toutes les autres images BF et de fluorescence ont été acquises avec un microscope Zeiss Axiovert 200 inversé disponible à l'IPS à Sherbrooke. 152

Figure 84: Cellules dans les groupes de 3 hexagones de 30 μ m de diamètre, espacés de 3 μ m. **a)** protocole de fixation des cellules après 24 h d'adhésion dans l'incubateur. **b)** Les cellules sont fixées après injection de 0.1 mg/mL de LPS pendant 1 h, et les jonctions VE-cadhérines ont été marquées avec CD144 conjugué au FITC et les noyaux ont été marqués au DAPI. 154

Figure 85: Cinétiques des groupes de 3 hexagones après injection de différentes concentrations de LPS. Pour chaque expérience, les images BF et les images SPR sont prises simultanément avant et après injection de LPS. Pour toutes ces expériences, nous représentons le signal SPR moyen pour chaque groupe de 3 hexagones isolés (**Matériels et méthodes**). **a)** Contrôle sans aucune injection de LPS. **b)** Stabilisation des cellules avant injection de LPS. Zoom sur la courbe de contrôle. **c)** Injection de 0.1 mg/mL de LPS. **d)** Injection de 0.5 mg/mL de LPS. 157

Figure 86: Gauche : Patron du groupe de 7 hexagones définis par leur diamètre (d) et l'espacement entre eux (e). Droite : Protocole expérimental pour l'adhésion initiale de cellules EAhy926 dans les groupes de 7 hexagones. 157

Figure 87: a) Image de fluorescence des noyaux marqués des cellules EAhy926 dans les groupes de 7 hexagones pour les espacements à 3 μ m, 6 μ m et 9 μ m. b) Distribution

du nombre de cellules dans les assemblages de 7 hexagones dont les surfaces d'adhésion sont égales à $585 \mu\text{m}^2$ en fonction des espacements entre les hexagones. (respectivement le nombre total des groupes de 7 hexagones (N) est égal à 38, 40, 38, 43, 36, 38, 29, 31, 27, 25). 159

Figure 88: Distribution du nombre de cellules dans les assemblages de 7 hexagones de surfaces adhésives égales à $406 \mu\text{m}^2$ en fonction des espacements entre les hexagones. 160

Figure 89: **a)** Protocole expérimental de formation de jonctions pour les groupes de 7 hexagones. **b)** marquage des noyaux pour les groupes de 7 hexagones espacés de $9 \mu\text{m}$: à gauche : après 2 h d'adhésion ; à droite : après 24 h d'adhésion dans l'incubateur. 161

Figure 90: Formation des jonctions entre les cellules dans les assemblages de 7 hexagones de surface égale à $406 \mu\text{m}^2$. Exemples de groupes de 7 hexagones après 24 h d'adhésion dans l'incubateur avec marquage des jonctions et des noyaux. Le marquage des jonctions est effectué par un anticorps monoclonal conjugué au FITC qui se lie spécifiquement aux jonctions VE-cadhérines et les révèle par microscopie à fluorescence. 161

Figure 91: Exemple d'un modèle de groupe de 7 hexagones espacés de $6 \mu\text{m}$ avec 1 cellule par hexagone. Les jonctions VE-cadhérines sont révélées par un immunomarquage conjugué au FITC (vert) et les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). 162

Figure 92: Protocole expérimental de l'adhésion des cellules dans les groupes de 3 hexagones après ajouts de l'inhibiteur de ROCK appelé Y-27632 et le stabilisateur de jonctions S1P. 164

Figure 93: **a)** Images en fluorescence des jonctions cellule/cellule marquées avec un marqueur de VE-cadhérines conjugué au FITC de 5 groupes de 3 hexagones différents après ajout de Y-27632 et S1P. Les hexagones font $30 \mu\text{m}$ de diamètre et sont espacés de $3 \mu\text{m}$. Les cellules sont fixées et leurs noyaux sont marqués au DAPI. **b)** Carte d'intensité de la superposition des images de fluorescence des jonctions VE-cadhérines formées entre les cellules dans les groupes de 3 hexagones (diamètre = $30 \mu\text{m}$, espacement = $3 \mu\text{m}$). à gauche : carte de la moyenne des intensités de 62 images de fluorescence de jonctions VE-cadhérines de groupes de 3 hexagones. à droite : La carte d'intensité représentée en (a) avec la reconstitution des hexagones estimés du photomasque de microstructuration. Les hexagones sont reconstitués à partir du barycentre des noyaux calculés précédemment et des dimensions théoriques connues

des hexagones. Ils sont redimensionnés en fonction de la taille des pixels des images de fluorescence. 165

Figure 94: Distribution du nombre de cellules dans les groupes de 3 hexagones après formation des jonctions : sans ajout des inhibiteurs de la ROCK et du stabilisateur de jonctions (N = 55 groupes de 3 hexagones) et avec ajout de Y-27632 et S1P (N = 50 groupes de 3 hexagones). 166

Figure 95: Cinétique des cellules dans les groupes de 3 hexagones après ajout de Y-27632 et S1P au cours du temps. **a)** protocole expérimental et imagerie par microscopie SPR des groupes de 3 hexagones. **b)** à gauche : images BF et SPR prises simultanément avant et après injection de la thrombine (1 U/ml). à droite : évolution du signal SPR au cours du temps pour chacun des 6 groupes de 3 hexagones. 168

Figure 96: Distribution moyenne de la vinculine (b) et de l'actine (c) pour des cellules adhérant selon des patrons adhésifs de fibronectine (a) de géométries différentes⁵⁴. 169

Figure 97: Géométries des patrons adhésifs sur des substrats passivés en fonction du rapport d'aspect (A) ou en fonction des courbures locales définies comme convexes ou concaves. 170

Figure 98: Résumé des réponses des lamellipodes selon les géométries des microstructures adhésives¹³⁷. 170

Figure 99: Schéma récapitulatif des différentes géométries de microstructures possibles pour contrôler l'adhésion des cellules sur des substrats d'or fonctionnalisés. 173

Figure 100: **a)** Schéma du substrat SPRI nanostructuré. Une couche d'or continue d'épaisseur h_1 est déposée sur un substrat de verre via une couche d'accroche (Cr). Les réseaux métalliques d'or d'épaisseur h_2 sont ensuite fabriqués par lithographie électronique. **b)** Images en microscopie électronique à balayage (MEB) de réseaux de piliers en 2D avec : $w = 200$ nm, $\Lambda = 400$ nm, $h_1 = 25$ nm, $h_2 = 25$ nm. **c)** Modélisation du contraste en fonction de la longueur de propagation pour pour différentes configurations de substrats comme montré dans la figure 87a à $\lambda = 830$ nm¹⁰⁰. 175

Figure 101: Images d'un trou en forme de croix sur différentes configurations de substrat. Le diélectrique au-dessus du métal correspond à de l'eau à l'intérieur de la croix et de la résine KMPR à l'extérieur. **a)** Images en BF. **b – e)** Images en SPRI normalisées à $\lambda = 830$ nm de la croix sur : des substrats d'or continus de 50 nm d'épaisseur (b), des substrats d'or continus de 25 nm d'épaisseur (c), des substrats avec

des nanostructures en lignes (1D) de 200 nm d'épaisseur espacés de 200 nm (d) et des substrats nanostructurés avec des réseaux périodiques en piliers (2D) comme décrits dans la figure 87¹⁰⁰..... 175

Figure 102: Caractérisation au MEB des lames nanostructurées par lithographie électronique. Selon la figure 87 – a : $w = 200$ nm, $\Lambda = 400$ nm..... 176

Figure 103: Scan angulaire d'une lame d'or nanostructurée par lithographie électronique selon des réseaux de piliers de $w = 200$ nm, $\Lambda = 400$ nm et microstructurée par illumination DUV selon des groupes de 3 hexagones de 30 μ m de diamètre, espacés de 3 μ m. **a)** Image SPR avec les régions d'intérêts sélectionnées dans les microstructures (Hex0, Hex1, Hex2, Hex3, Hex4) ou dans les régions passivées (ref1, ref2 et ref3) au niveau des zones du film d'or nanostructuré ou continu (délimitation avec la ligne jaune). La direction de propagation des plasmons est montrée avec la ligne blanche (SP). **b – d)** Signal SPR en fonction des différents angles de résonance définis par le déplacement des moteurs du système d'imagerie SPR au niveau des groupes de 3 hexagones où les cellules ont adhéré (**b**), au niveau des régions passivées (**c**) et uniquement au niveau de la zone où le film d'or est continu pour les groupes de 3 hexagones et les régions passivées (**d**). Ici sont représentées les courbes correspondant à des régions de la lame au niveau des microstructures (traits pleins) ou au niveau des régions passivées (traits pointillés). Les traits en pointillés gris délimitent la plage angulaire qui contient l'angle de résonance optimal..... 178

Figure 104: Image SPR normalisée en divisant l'image en TM par TE. La ligne jaune en pointillés représente la délimitation entre la partie du film d'or nanostructuré (hex0, 1 et 2) et l'autre partie du film d'or continu (hex 3 et 4). La ligne blanche en bas à gauche montre la direction de propagation des plasmons de surface. Il s'agit de la même expérience décrite en 2-a. 179

Figure 105: Profils d'intensité des 4 groupes de cellules dans les assemblages à 3 hexagones montrés plus haut selon la direction de propagation des plasmons de surface ($\alpha = 0^\circ$). A gauche sont représentées les images de différence entre la 1^{ère} image avant injection de la thrombine (1 U/mL) et la dernière image. A droite sont tracés les profils d'intensités pour la 1^{ère} image (bleu) et la dernière image (rouge) normalisées comme décrit dans le texte. 181

Figure 106: Profils d'intensité des 4 groupes de cellules dans les assemblages à 3 hexagones montrés plus haut selon un angle $\alpha = 60^\circ$ de la direction de propagation des plasmons de surface. A gauche sont représentées les images de différence entre la 1^{ère} image avant injection de la thrombine (1 U/mL) et la dernière image. A droite sont tracés les profils d'intensités pour la 1^{ère} image (bleu) et la dernière image (rouge) normalisées comme décrit dans le texte..... 183

Figure 107: Cinétique des cellules dans les groupes de 3 hexagones au cours du temps adhérent sur un substrat nano et microstructuré (délimitation avec la ligne jaune). à gauche : images BF et SPR prises simultanément avant et après injection de la thrombine (1 U/mL). à droite : évolution du signal SPR au cours du temps pour chacun des 5 groupes de 3 hexagones. 184

Figure 108: Impact de l'ordre ou désordre des complexe moléculaires du peptide RGD à l'échelle nanométriques sur l'adhésion cellulaire d'ostéoblastes¹⁴³. **a)** Schéma de la nanostructuration et de la fonctionnalisation des substrats. **b)** L'espacement entre les ligands de RGD impacte la formation des complexes de PFA. Un espacement de 70 nm entre les nanoparticules correspond à un espacement critique pour l'adhésion cellulaire. **c)** Marquage des filaments d'actine (en rouge) et des noyaux en bleu pour des cellules MC3T3-E1 ostéoblastes adhérent, après 24 h de culture cellulaire, sur des nanoparticules organisées (a – d) et désorganisées (e – h) en fonction des espacements inter ligands. Les numéros à côté des indices correspondent à la distance ente les nanoparticules. 186

Figure 109: Images de fluorescence des cellules endothéliales de la cornée adhérent sur des substrats microstructurés selon des géométries hexagones de surfaces adhésives différentes (6495 μm^2 , 2338 μm^2 et 585 μm^2). Les cellules ont été fixées et leurs filaments d'actine et noyaux marqués respectivement avec un marquage phalloïdine – FITC et un marquage Hoechst après 1 jours d'adhésion dans l'incubateur. 189