Caractérisation par imagerie en temps réel de cultures cellulaires hépatiques en biopuces microfluidiques

Marie Naudot

▶ **To cite this version:**

Marie Naudot. Caractérisation par imagerie en temps réel de cultures cellulaires hépatiques en biopuces microfluidiques. Biomécanique [physics.med-ph]. Université de Technologie de Compiègne, 2013. Français. NNT : 2013COMP2118 . tel-00965539

HAL Id: tel-00965539

https://theses.hal.science/tel-00965539

Submitted on 25 Mar 2014

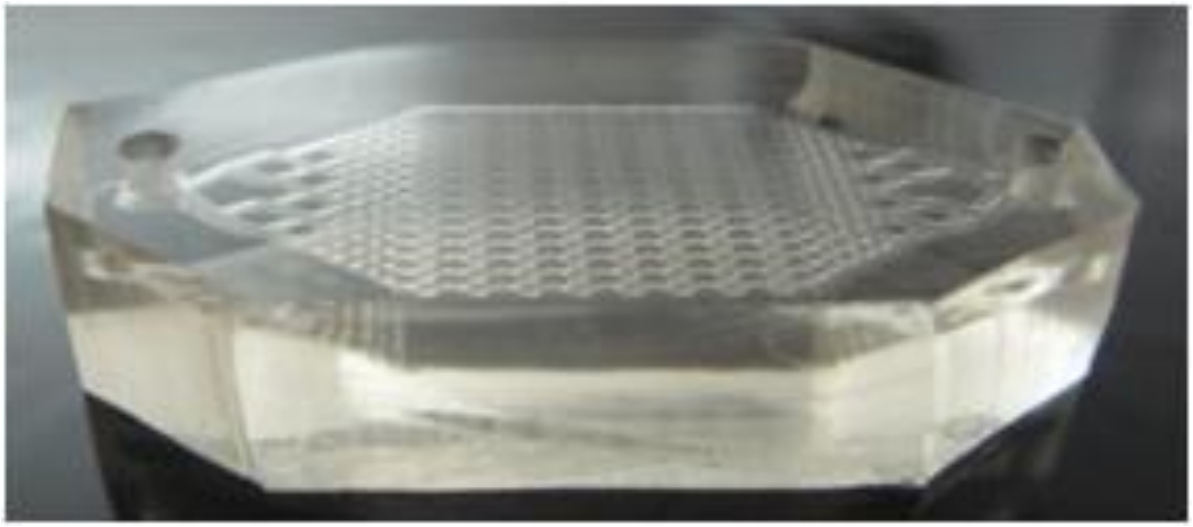
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

Par **Marie NAUDOT**

Caractérisation par imagerie en temps réel de cultures cellulaires hépatiques en biopuces microfluidiques

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 29 novembre 2013
Spécialité : Bio-ingénierie, Biomécanique, Biomatériaux

D2118

UNIVERSITÉ DE TECHNOLOGIE DE COMPIÈGNE

ECOLE DOCTORALE

DOCTORAT

BIO-INGÉNIERIE, BIOMÉCANIQUE, BIOMATÉRIAUX

NAUDOT Marie

Caractérisation par imagerie en temps réel de cultures cellulaires hépatiques en biopuces microfluidiques

Thèse dirigée par Leclerc Eric et Claude Isabelle

Date de soutenance prévue le 29 novembre 2013

Membres du jury :

Dr Martine AGGERBECK, Chargé de recherche, Paris Descartes, rapporteur

Dr Pascal SILBERZAN, Directeur de recherche, Institut Curie, rapporteur

Dr Isabelle CLAUDE, Maître de conférences, UTC, examinateur

Dr Eric LECLERC, Directeur de recherche, UTC, examinateur

Dr Cécile LEGALLAIS, Directeur de recherche, UTC, examinateur

Dr Alexandre PERY, Chargé de recherche, INERIS, examinateur

Résumé en français

Le développement de méthodes alternatives à la culture *in vivo* pour l'évaluation de la toxicité des molécules chimiques s'est accéléré ces dernières années, l'objectif étant de limiter l'utilisation d'animaux. Préconisés par l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques), ces modèles alternatifs visent à mimer les conditions physiologiques en employant des systèmes *in vitro* ou *in silico*. Parmi les différents systèmes développés, les biopuces microfluidiques ont prouvé leur contribution à l'amélioration des fonctions cellulaires, ce qui permet des études toxicologiques pertinentes.

Les travaux de ce doctorat sont basés sur l'emploi de ces biopuces pour cultiver des hépatocytes (cellules du foie) et portent sur la mise au point d'une méthode d'analyse d'images issues de ces cultures sous microscope au cours du temps. L'acquisition d'images tout au long de l'expérience permet de suivre, après traitement, l'évolution et le comportement des cellules au contact de molécules chimiques et d'évaluer les réponses toxicologiques.

Les premiers résultats de ces travaux ont permis l'amélioration du procédé de culture microfluidique adaptée au matériel d'acquisition d'images, la sélection de sondes fluorescentes, et le choix d'un algorithme de traitement des images sur CellProfiler. Cela nous a permis de quantifier et caractériser certaines fonctions biologiques au sein de la biopuce comme l'activité mitochondriale. Le potentiel de cet outil pour évaluer la toxicité de molécule a été testé grâce à l'emploi d'un toxique connu : la staurosporine. Les résultats obtenus ont révélé l'impact de la mise en culture en dynamique sur le comportement des hépatocytes, et la toxicité de la staurosporine visible en biopuce.

Mot clés : Biopuces microfluidiques, culture en dynamique, hépatocytes, fluorescence, CellProfiler

Résumé en anglais

Characterization of liver cell culture in micro-fluidic biochips by a real time imaging analysis

The development of alternative methods of *in vivo* cultures for the toxicological evaluation of chemical molecules has accelerated this last years, in order to limit the use of animals. Recommended by the OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development), these alternative models are designed to mimic the physiological conditions using *in vitro* or *in silico* systems. Among the developed systems, microfluidic biochips have proven their contribution to the improvement of cellular functions, which allows relevant toxicological studies.

This PhD thesis is based on the use of these biochips for hepatocytes culture and focus on the development of an analysis method for study these cultures under microscope over time using imaging. Image acquisition throughout the experiment enables to analyze, after image processing, the evolution and the behavior of cells in contact with chemical molecules and to evaluate toxicological responses.

The first results of this work led to the optimization of the microfluidic cultures under the microscope used to get the image sequences, the selection of fluorescent probes and the development of an image processing system with CellProfiler. These works allowed the quantification and the characterization of some biological functions within the biochip such as the mitochondrial activity. Staurosporine, a well-known toxic, has been used to test the potential of this tool to evaluate the toxicity of molecules. The results showed the impact of dynamic culture on the hepatocytes behavior, and the staurosporine toxicity, in biochip cultures.

Keywords : Microfluidic Biochips, dynamic culture, hepatocytes, fluorescence, CellProfiler

Intitulé et adresse de l'unité dans laquelle la thèse a été préparée

UMR CNRS 7338

Laboratoire de Biomécanique – Bio-ingénierie

Centre de Recherche de Royallieu

Université de Technologie de Compiègne

60205 Compiègne

France

Communication scientifiques dans le cadre de la thèse

- Participation à des congrès

Imagerie – Vivant : Nouvelles méthodologies en imagerie du vivant, du 11 au 13 décembre 2012, Lyon, France

Poster : Caractérisation par imagerie en temps réel de culture cellulaire hépatique au sein d'une biopuce microfluidique.
M.NAUDOT, R.MOURA, L. CHOUCHA-SNOUBER, P. PAULLIER, E.LECLERC, Z.KHARBOUTLY

XXXIXe ESAO Congress, du 26 au 29 septembre 2012, Rostock, Allemagne

Poster : Characterization of liver cell culture in micro-fluidic biochips by a real time imaging analysis.
M.NAUDOT, R.MOURA, L. CHOUCHA-SNOUBER, P. PAULLIER, E.LECLERC, Z.KHARBOUTLY

- Articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture

Choucha Snouber L, Bunescu A, **Naudot M**, Legallais C, Brochot C, Dumas ME, Elena-Herrmann B, Leclerc E. Metabolomics-on-a-chip of hepatotoxicity induced by anticancer drug flutamide and Its active metabolite hydroxyflutamide using HepG2/C3a microfluidic biochips. Toxicol Sci. (2013) 132 : 8-20.

Legendre A, Baudoin R, Alberto G, Paullier P, **Naudot M**, Bricks T, Brocheton J, Jacques S, Cotton J, Leclerc E. Metabolic characterization of primary rat hepatocytes cultivated in parallel microfluidic biochips. J Pharm Sci. (2013) 102 : 3264-76.

Baudoin R, Alberto J, Legendre A, Paullier P, **Naudot M**, Fleury M-J, Jacques S, Griscom L, Leclerc E. Investigation of Expression and Activity Levels of Primary Rat Hepatocyte Detoxication Genes Under Various Flow Rates and Cell Densities in Microfluidic Biochips. Biotechnol. Prog. (publié en ligne le 11 janvier 2014).

Legendre A, Fleury M-J, Allora I, **Naudot M**, Bricks T, Jacques S, Leclerc E. Cellular responses of hepatocytes induced by hypothermia : modulation of cytokinesis and drug metabolism related functions. Journal of Biochemistry (soumis).

Naudot M, Paullier P, Dargent T, Senez V, Kharboutly Z, Claude I, Leclerc E. Characterization of the acute HepG2/3a cells response to a microfluidic culture in liver biochips by a multi parametric real time images processing. Biomedical Microdevice (soumis).

Remerciements

Je souhaite remercier l'ensemble des personnes qui ont participé de près ou de loin à ces 3 années de travail représenté par ce manuscrit.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse : Eric Leclerc, Zaher Kharboutly et Isabelle Claude pour leur implication dans ce projet. Leur conseil et leur aide lors de mon apprentissage des matières qui ne faisaient pas partie de mes compétences : l'imagerie et la microfluidique. Je tiens tout particulièrement à exprimer ma gratitude à Isabelle Claude qui a accepté de « prendre le train en marche », de remplacer Zaher après son départ pour le Canada. Je sais à quel point il n'a pas été évident de comprendre les problématiques de ce projet, et de raccrocher à la réflexion développée depuis plus d'un an et demi.

Un grand merci à Martine Aggerbeck chargé de recherche à Paris Descartes, à Pascal Silberzan directeur de recherche à l'Institut Curie pour leur implication et leur évaluation de ce rapport, ainsi qu'à Alexandre Pery chargé de recherche à l'INERIS et Cécile Legallais directeur de recherche à l'UTC, d'avoir consacré du temps à évaluer mon travail que ce soit lors de la lecture du manuscrit ou de la soutenance.

Je remercie Cécile Legallais pour son soutien et la confiance qu'elle m'a accordée en me donnant l'occasion d'effectuer les TP de sa matière enseignée en étude d'ingénieur branche Génie Biologique : Organes artificiels et Biorhéologie. Merci de m'avoir permis de transmettre avec passion ce que j'ai appris et découvert au sein du laboratoire.

Merci à Murielle Dufresne pour son aide lors de la rédaction de ce manuscrit, et lorsqu'il a fallu comprendre les phénomènes biologiques non attendus mais néanmoins présents à l'intérieur des biopuces microfluidiques.

Je remercie également Anne-Virginie Salsac d'avoir décripté pour moi la mécanique des fluides, ce language jusqu'alors étranger à ma compréhension.

Merci à Patrick Paullier pour ta gentillesse, ton écoute, et pour toutes ces heures que nous avons passé à tester des prototypes.

A Jean-Mathieu Prot, Régis Baudoin et Léila Choucha Snouber, pour m'avoir formé et m'avoir expliqué tout les secrets des biopuces.

A mes collègues : Stéphanie Capone, Thibault Bricks, Timothée Baudequin, Sarah Figaro, Ulysse Pereira, Rachid Jellali et Perrine Zeller pour la bonne ambiance, l'émulation et le partage présent au sein du groupe.

Merci à Audrey Legendre d'avoir passé avec moi une année, je crois la plus importante, pour ce soutien avec un grand S, cet appui mutuel qui nous à permis d'avancer. Encore merci ma mamoutheuse !

A ma famille qui m'a encouragé durant toutes ces années et bien avant la thèse.

Merci à Antoine qui m'a porté et supporté durant ma thèse. Merci pour toutes ces heures que tu as consacré à la correction du manuscrit.

Liste des figures

(Chapitre 1 : Introduction bibliographique)

Figure 1 : L'absorption à l'échelle cellulaire : transporteurs membranaires et diffusion simple

Figure 2 : Structure globale du foie

Figure 3 : Représentation de la structure d'un lobule du foie

Figure 4 : Zonation structurale et fonctionnelle de lobule du foie

Figure 5 : Exemples de bioréacteurs hépatiques

Figure 6 : Exemple d'un modèle PBPK de l'ensemble du corps humain

Figure7 : Représentation de la technique de photolithographie

Figure 8 : Représentation de quelques biopuces microfluidiques

Figure 9 : Biopuce microfluidique développé par le Dr Leclerc

Figure 10 : Exemple d'une cellule observée par différentes techniques

Figure 11 : Protéines auto-fluorescentes observées dans le visible et avec une lampe fluorescente

Figure 12 : Les Quantums Dots

Figure 13 : Etapes de traitement nécessaire à l'extraction d'informations

Figure 14 : Exemples de microscopes inversés à incubateur intégré

Figure 15 : Quantification de données d'imagerie en temps réel

Figure 16 : Présentation du système µCCA

Figure 17 : Système microfluidique adapté à l'analyse par imagerie

(Chapitre 2 : Matériels et Méthodes)

Figure 18 : Protocole de fabrication du moule de la réplique inférieure microstructurée

Figure 19 : Procédé de fabrication d'un microsystème en PDMS

Figure 20 : Caractéristiques géométriques de la biopuce

Figure 21 : Circuit de perfusion

Figure 22 : Plan expérimental

Figure 23 : Microscope Leica DMI6000B avec incubateur intrégré permettant la culture d'hépatocytes en biopuces microfluidiques

Figure 24 : Positions des images prises dans la biopuce et dans la boîte de Pétri

(Chapitre 3 : Acquisition sous microscope en « time-lapse »)

Figure 25 : Marquage des noyaux au Hoechst 33342, réalisé sur des HepG2/C3A cultivées en LabTek®

Figure 26 : Evaluation de l'intensité de fluorescence au cours du temps du Hoechst 33342 à 2 µg/mL en LabTek®

Figure 27 : Marquage d'HepG2/C3A au Hoechst 33342 réalisé en biopuce microfluidique

Figure 28 : Marquage à la Calcein AM d'HepG2/C3A cultivées en LabTek®

Figure 29 : Exemple de quenching observé avec la Calcein AM dans un intervalle de temps de 5 min

Figure 30 : Marquage d'HepG2/C3A à l'EthD-1 obtenu après 22 h de culture

Figure 31 : Marquage à l'EthD-1 d'HepG2/C3A mis en contact avec 5 µM de Staurosporine

Figure 32 : Marquage d'HepG2/C3A au $DiOC_6(3)$

Figure 33 : Evaluation de l'intensité de fluorescence au cours du temps du $DiOC_6(3)$

Figure 34: Marquage d'HepG2/C3A obtenu en biopuce après 10 h au $DiOC_6(3)$

Figure 35 : Evaluation de l'intensité de fluorescence au cours du temps du TMRE à 4 µM en LabTek®

Figure 36 : Marquage d'HepG2/C3A au Mitotracker® Green FM à différentes concentrations

Figure 37 : Evaluation de l'intensité de fluorescence au cours du temps du Mitotracker® Green FM à 1 µM en LabTek®

Figure 38 : Marquage d'HepG2/C3A en biopuce réalisé au Mitotracker® Green FM

Figure 39 : Evolution du nombre de cellules cultivées avec et sans Mitotracker® Green FM à 1 µM

Figure 40 : Marquage d'HepG2/C3A en LabTek® après 2h de culture avec du Fluo4-AM

Figure 41 : Evaluation de l'intensité de fluorescence au cours du temps du Fluo-4AM

Figure 42 : Marquage d'HepG2/C3A cultivées en LabTek® au Red FLICA™

Figure 43 : Suivi d'HepG2/C3A en apoptose par marquage des noyaux au Hoechst33342

Figure 44 : Marquage d'HepG2/C3A cultivées en LabTek® réalisé avec du CarboxyDCFDA-2AM

Figure 45 : Phénomène de « bleaching » observé avec le CarboxyDCFDA-2AM

Figure 46 : Evaluation de l'intensité de fluorescence au cours du temps du CarboxyDCFDA-2AM

Figure 47 : Phènoméne de co-marquage des noyaux au Hoechst 33342 et à l'EthD-1

(Chapitre 4 : Traitement des images de cultures cellulaires en biopuces)

Figure 48 : Représentation du pipeline de traitement sur CellProfiler

Figure 49 : Traitement de l'image en contraste de phase par CellProfiler

Figure 50 : Les différentes étapes de modification des images nécessaire à l'obtention de la surface occupée par les cellules dans la zone d'intérêt dans CellProfiler.

Figure 51 : Exemple d'un comptage de cellules réalisé par CellProfiler

Figure 52 : Exemple de comptage des cellules mortes réalisé par CellProfiler

Figure 53: Exemple d'attribution d'intensité de fluorescence des mitochondries aux cellules

(Chapitre 5 : Caractérisation de culture en biopuces)

Figure 54 : Evaluation du nombre de cellules présentent dans les différentes zones de la biopuce (A) et de la boite de Pétri (B)

Figure 55 : Courbe de tendance de l'évolution de la surface occupée sur les 6 positions en biopuce en condition dynamique

Figure 56 : Exemple d'images représentant la surface occupée par les cellules dans une chambre microfluidique de la biopuce

Figure 57 : Nombre de cellules dans les 6 positions de la biopuce en condition dynamique

Figure 58 : Taux de mortalité de la population cellulaire dans les 6 positions de la biopuce

Figure 59 : Courbe de tendance de l'évolution de l'intensité de fluorescence des mitochondries pour les 6 positions de la biopuce

Figure 60 : Histogramme 3D de la répartition de l'intensité de fluorescence des mitochondries pour une population cellulaire dans les 6 positions de la biopuce

Figure 61 : (A) Evolution de la surface occupée au cours du temps, en biopuce statique (courbe bleu), en biopuce dynamique (courbe rouge) et en boite de Pétri (courbe verte)

Figure 62 : (A) Taux de mortalité de la population cellulaire dans les 3 conditions de culture : biopuce statique (bleu), biopuce dynamique (rouge) et en boite de Pétri (vert)

Figure 63 : Evolution de l'intensité de fluorescence des mitochondries pour les 3 conditions

Figure 64 : Simulation d'écoulement fixé à 10 µl/min en biopuce microfluidique.

Figure 65 : La zone d'observation correspond à la zone centrale délimitée par les bandes rouges

Figure 66 : Exemple de cellules mortes observées dans des amas cellulaires présents dans une micro-chambre de la biopuce microfluidique.

Figure 67 : Mortalité observée en biopuce cultivée pendant 24 h en dynamique sans sondes fluorescentes.

Figure 68: Effet des marqueurs utilisés séparément sur les cellules cultivées en biopuce dynamique

Figure 69 : Taux de mortalité au cours du temps en biopuce dynamique avec comme seul marqueur l'EthD-1

Figure 70 : Techniques permettant d'identifier l'avancement de la voie d'apoptose par Cytométrie en Flux

(Chapitre 6 : Test de toxicité : effet de la staurosporine)

Figure 71 : Evolution de la surface occupée par les cellules

Figure 72 : Cellules traitées avec 5 µM de Staurosporine

Figure 73 : Histogramme représentant l'évolution de la surface occupée obtenue pour les différentes conditions après 2h, 5h et 10h d'expérience

Figure 74 : Evaluation du taux de mortalité au cours du temps en présence ou non de STS

Figure 75 : Histogramme de la mortalité observée pour les différentes conditions

Figure 76 : Evolution de l'intensité de fluorescence des mitochondries en présence ou non de STS

Figure 77 : Histogramme représentant l'évolution de l'intensité de fluorescence obtenue pour les différentes conditions

Figure 78 : Histogramme 3D de la répartition de l'intensité de fluorescence des mitochondries pour une population cellulaire dans les 6 conditions testées

Liste des tableaux

(Chapitre 1 : Introduction bibliographique)

Tableau 1 : Les transporteurs ABC impliqués dans la résistance de médicaments anticancéreux

Tableau 2 : Fonctions métaboliques des familles de CYP

Tableau 3 : Descriptif des caractéristiques de biopuces microfluidiques dédiées aux tests toxicologiques

Tableau 4 : Représentation des différentes méthodes de marquage fluorescent, leur fonctionnement, avantages et inconvénients

(Chapitre 3 : Acquisition sous microscope en « time-lapse »)

Tableau 5 : Synthèse des résultats obtenus lors des tests réalisés sur les différents marqueurs en LabTek® et en biopuce.

(Chapitre 5 : Caractérisation de culture en biopuces)

Tableau 6 : Evaluation de la localisation des cellules mortes dans les micro-chambres

Liste des Abréviations

ΔΨm : variation du potentiel de membrane mitochondrial

3D-µFCCS : 3D microfluidic cell culture system

µCCA : microscale cell culture analog

ABC : ATP Binding Casette

ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFP : Alpha fétoprotéine

AhR : Aryl hydrocarbon receptor

ANOVA : Analysis Of Variance

APTMS : 3-aminopropyltrimethosiloxane

ATP : Adénosine Triphosphate

ATCC : American Type Culture Collection

BCRP : Breast Cancer Resistant Protein

BHF : acide fluorhydrique

CAR : Constitutive androstane receptor

CarboxyDCFDA-2AM : 6-Carboxy-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate, Di(Acetoxymethyl Ester)

CCD : Charge-Coupled Device

CdSe : Sélénium de Cadmium

CYP : Cytochrome P450

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

$DiOC_6(3)$: 3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide

DL50 : Dose létale tuant 50% des animaux

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique

EthD-1 : Ethidium homodimère

GFP : Green Fluorescent Protein

GSH : Glutathion

H2B : Histone 2B

HμREL®: Humain Relevant, Hurel Corp., USA

HCS : High Content Screening

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

HPLC : High-performance liquid chromatography

IC_{50} : half maximal inhibitory concentration

IDCCM : Integrated Dynamic Cell Cultures in Microsystem

LDH : Lactates déshydrogénases

LRP : Lung Resistance Protein

MDR : Multi Drug Resistance

MEM : Minimal Essential Medium

MET : Microscope électronique en transmission

MPC : 2-(methacryloyloxyethyl) phosphorylcholine

MRP : Multidrug Resistance Protein

MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem

MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NOAEL : No Observable Effect Level

OATPs : Organic anion-transporting polypeptids

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

PμSs : Pneumatic microstructures

PBPK : Physiologically based pharmacokinetics

PCLS : Precision-cut liver slices

PCNA : Proliferating Cell Number Antigen

PCTS : Precision cut tissues slices

PDMS : Polydiméthylsiloxane

PEG : Polyéthylène glycol

PET : Polyethylene terephtalate

PF : Protéines auto-fluorescentes

pH : potentiel Hydrogène

PLLA : poly-L-lactic acid

PMMA : Polymethyl Methacrylate

POP : Poly-oléfines plastomères

PSMA : poly(styrene-co-maleic anhydride)

PXR : Pregnane X receptor

QDots : Quantums dots

QSAR : Quantitative Structure-Activity Relationship

REACH : Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals

RGB : Red, Green, Blue

ROI : Region Of Interest

ROS : Reactive *oxygen* species

SDS : dodécylsulfate de sodium

SEM : Scanning electron microscopy

SPGP : Sister P-GlycoProtein

STS : Staurosporine

TMRE : Tetramethylrhodamine, ethyl ester

UDP : Uridine Diphosphate

UV : Ultra Violet

ZnSe : Sélénium de Zinc

Sommaire

Contexte du sujet et objectif de la thèse p 19

Chapitre 1 : Introduction bibliographique p22

1. Les études toxicologiques 22
2. La prise en charge d'un xénobiotique par l'organisme 24
   - 2.1. L'absorption 24
   - 2.2. La distribution 27
   - 2.3. Le métabolisme - biotransformation 28
     - 2.3.1.Les enzymes de phase I 28
     - 2.3.2.Les enzymes de phase II 30
   - 2.4. L'élimination et excrétion 31
3. Le foie : organe majeur du métabolisme des xénobiotiques 33
   - 3.1. Structure et organisation fonctionnelle 33
   - 3.2. Fonction métabolique et zonation 35
   - 3.3. Les types cellulaires du foie 36
4. L'évolution des méthodes en toxicologie hépatique 38
   - 4.1. Les différents modèles et outils développés 38
     - 4.1.1.Les modèles *in vivo* 39
     - 4.1.2.Les modèles *in vitro* 40
       - 4.1.2.1. Les cellules utilisées pour la culture 40
         - 4.1.2.1.1. Les cellules primaires humaines 40
         - 4.1.2.1.2. Les lignées cellulaires immortalisées 41
       - 4.1.2.2. Les méthodes basées sur l'ingénierie tissulaire 43
     - 4.1.3.Les modèles *in silico* 44
   - 4.2. Les microsystèmes : modèle alternatif issue des nouvelles technologies 47
     - 4.2.1.Fabrication et Biomatériaux 47
     - 4.2.2.Intérêt des systèmes microfluidiques pour les cellules 50
     - 4.2.3.Les biopuces microfluidiques hépatiques pour les tests de toxicité 51
5. L'imagerie appliquée à l'analyse *in vitro* 55
   - 5.1. La qualité de l'image 56
   - 5.2. Les types d'images 57
     - 5.2.1.Contraste de phase 58
     - 5.2.2.Fluorescence 59
       - 5.2.2.1. Les sondes fluorescentes 59
       - 5.2.2.2. Les protéines auto-fluorescentes 60
       - 5.2.2.3. L'immunofluorescence 61
       - 5.2.2.4. Les Quantums Dots 62
   - 5.3. Les logiciels de traitement d'images 64
   - 5.4. Les caractéristiques recherchées 65
6. L'imagerie en « time-lapse » et biopuce microfluidique 65

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes P71

1. Microfabrication du microsystème 71
1.1. Le Polydiméthylsiloxane 71
1.2. Procédé de fabrication du moule 71
1.3. Description et assemblage du microsystème 73
1.4. Nettoyage de la biopuce 75
2. Fabrication du circuit de perfusion 75
3. Matériel biologique et réactifs 76
3.1. Lignée HepG2/C3A 76
3.2. Marquage fluorescent des cellules 77
3.2.1. Marqueurs testés 77
3.2.1.1. Marquage de viabilité cellulaire 77
3.2.1.2. Marquage des mitochondries 77
3.2.1.3. Marqueur du calcium intracellulaire 78
3.2.1.4. Marqueur d'apoptose 78
3.2.1.5. Marquage de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) 78
3.2.2. Marqueurs utilisés pour les tests de toxicité 78
3.3. Molécule chimique testée : la Staurosporine 79
4. Culture cellulaire 79
4.1. Plan expérimental 79
4.2. Mise en culture en microsystème 80
4.3. Mise en culture en boite de Pétri 80
5. Analyses des cultures cellulaires sous microscope 81
6. Retraitements des images 82
6.1. Format d'images 82
6.2. Sélection de la zone d'intérêt 83
6.3. Méthode de segmentation 83
7. Tests Statistiques 84

Chapitre 3 : Acquisition sous microscope en « time-lapse » p86

1. Adaptation des biopuces à la culture sous microscope 86
2. Choix des sondes fluorescentes 87
2.1. Marquage de viabilité cellulaire 87
2.1.1. Hoechst 33342 87
2.1.2. Calcein AM 90
2.1.3. L'éthidium homodimère : EthD-1 92
2.2. Marquage des mitochondries 93
2.2.1. $DiOC_6(3)$ 93
2.2.2. TMRE 96
2.2.3. Mitotracker® Green FM 97
2.3. Marqueur du calcium intracellulaire : Fluo4-AM 100
2.4. Marquage d'apoptose : Red FLICA™ 102
2.5. Marquage de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) : CarboxyDCFDA-2AM 104
2.6. Bilan 106

3. Optimisation des paramètres de prise d'images 109

Chapitre 4 : Traitement des images de cultures cellulaires en biopuces p111

1. Choix du logiciel d'imagerie : CellProfiler 111
2. Obtention des caractéristiques biologiques 112
   2.1. Nombre de cellules totales 113
   2.2. Surface occupée 114
   2.3. Nombre de cellules mortes 114
   2.4. Fluorescence des mitochondries 114
3. Analyse des données 115
4. Estimation de l'erreur générée par CellProfiler 116
   4.1. Surface occupée par les cellules 117
   4.2. Nombre total de cellules 119
   4.3. Nombre de cellules mortes 121
   4.4. Activité mitochondriale 122
5. Bilan 123

Chapitre 5 : Caractérisation de culture en biopuce p125

1. Impact de l'ensemencement 125
2. Etude de la réorganisation des cellules au sein de la biopuce 126
   2.1. Evolution de la surface occupée 127
   2.2. Nombre de cellules totales 128
   2.3. Taux de mortalité des cellules 129
   2.4. Activité mitochondriale 130
3. Comparaison des différentes conditions 133
   3.1. Surface occupée par les cellules 133
   3.2. Taux de mortalité des cellules 134
   3.3. L'activité mitochondriale 136
4. Effet toxique en biopuce dynamique 137
   4.1. Localisation des cellules mortes 137
   4.2. Effet dynamique seul 140
   4.3. Effet des sondes fluorescentes 142
   4.4. Effet dynamique combiné à la présence des sondes fluorescentes 142

Chapitre 6 : Test de toxicité : effet de la staurosporine p146

1. Evolution de la surface occupée par les cellules traitées à la STS 146
2. Taux de mortalité des cellules en présence de STS 149
3. Activité mitochondriales des cellules traitées à la STS 151

Conclusions et perspectives p156

Références bibliographiques p161

Contexte de l'étude et objectifs de la thèse

En 2007, l'Union Européenne a mis en place la directive REACH (Registration Evaluation Authorisation of Chemicals) avec pour objectifs de déterminer les dangers et les risques liés aux produits chimiques fabriqués ou importés en Europe. Le but est d'améliorer la protection de la santé humaine et de l'environnement. Les coûts liés à l'évaluation des risques et à la démonstration de l'innocuité des substances chimiques mises sur le marché sont pris en charge par l'industrie concernée par le produit. Durant les 11 premières années d'application de la directive, l'enregistrement devrait porter sur près de 30 000 substances déjà commercialisées et qui n'ont fait l'objet d'aucun test toxicologique préalable. Les données demandées pour l'évaluation de chaque produit chimique concernent sa composition et ses propriétés, les mesures à prendre pour une utilisation et un transport sans risque, celles à prendre en cas d'accident, ainsi que les informations toxicologiques et écologiques. Les informations toxicologiques requièrent la mise en place de tests très réglementés et très longs (pouvant aller jusqu'à 3 ans). C'est pourquoi, au vu du grand nombre de substances à évaluer mais surtout du temps nécessaire à chaque évaluation, la directive REACH préconise le partage des données mais également le développement de dispositifs alternatifs. Ceux-ci visent à limiter les essais sur les animaux mais aussi à réduire le temps des essais ainsi que les coûts supportés par l'industrie. De nombreuses équipes de recherche se sont alors lancées dans la recherche et le développement de modèles alternatifs avec la création de modèles bioinformatiques et mathématiques (modèles *in silico)* ou la conception de modèles innovants de cultures de cellules ou de tissus (modèles *in vitro)*. Ces modèles utilisent des paramètres qui visent à se rapprocher des conditions physiologiques afin de limiter l'usage d'animaux.

L'équipe dirigée par le Dr. Eric Leclerc du laboratoire Biomécanique - Bio-ingénierie (UMR CNRS 7338) de l'Université de Technologie de Compiègne a récemment développé un de ces dispositifs alternatifs. Appelé biopuce microfluidique, il permet de réaliser une culture cellulaire au sein d'un microsystème de 2 cm^2 présentant une géométrie 3D spécialement créée pour favoriser la culture cellulaire (Baudoin *et al.,* 2007). Ce dispositif fabriqué au laboratoire est réalisé dans un matériau biocompatible et permet une culture en condition dynamique grâce à un renouvellement en continu du milieu de culture. Déjà employé pour

cultiver des cellules rénales et hépatiques, il a prouvé son efficacité lors de tests de toxicité réalisés sur le paracétamol et l'ifosfamide (Prot *et al.,* 2011b ; Choucha-Snouber *et al.,* 2012b). Il a également été utilisé pour réaliser de la co-culture par connexion de deux biopuces, chacune ensemencée avec un type cellulaire spécifique reproduisant ainsi les interactions inter-tissulaires observées dans l'organisme. Les travaux entrepris avec ces biopuces microfluidiques ont permis de valider un protocole permettant la culture des cellules rénales ou hépatiques sur une durée de 4 jours. Les cellules hépatiques en particulier se sont révélées d'un grand intérêt lors de tests de pharmaco-toxicité réalisés en biopuces. En effet, ces cellules réalisent la majorité des transformations biochimiques effectuées sur les substances médicamenteuses par l'organisme. Les analyses réalisées sur ces cultures en biopuce microfluidique ont concerné : la viabilité cellulaire, certaines activités enzymatiques (principalement les cytochromes), l'immuno-marquage du cytosquelette, la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire par cytométrie de flux, et l'expression des protéines clés du métabolisme hépatique par la génomique et la protéomique. Le modèle de biopuce microfluidique s'avère donc être un système alternatif prometteur permettant une analyse pertinente du comportement cellulaire par différentes approches complémentaires et ceci sur une courte durée de culture.

L'objectif de ma thèse consiste à enrichir cette palette de tests par un suivi par imagerie des cellules hépatiques cultivées en biopuces microfluidiques. Bien que ces biopuces aient prouvé leur efficacité lors de tests de toxicité, certains points importants peuvent être améliorés : sur un temps de culture aussi court, il est important de comprendre le comportement des cellules en particulier lors des premières heures de culture en dynamique. De même, lors des tests toxicologiques, il apparait nécessaire de connaître quels effets le produit toxique déclenche chez les cellules (stress, apoptose, nécrose). L'étude par imagerie de ces cellules en biopuce a pour but d'améliorer ces points. Les cellules hépatiques sont cultivées dans l'enceinte thermostatée et contrôlée en CO_2 d'un microscope. Certains aspects de leur comportement sont suivis au cours du temps (time-lapse) par une prise d'images à un intervalle de temps donné pendant 10 h. Afin d'obtenir un nombre d'informations conséquent, la fluorescence va être employée. Pour ce faire, une étude préliminaire a été réalisée dans le but de sélectionner les sondes fluorescentes

permettant un marquage fluorescent efficace des cellules cultivées en biopuce. Les images « time-lapse » obtenues de ces cultures sont ensuite traitées grâce au logiciel CellProfiler afin d'en extraire les informations et données d'intérêt, tels que la surface occupée par les cellules, le nombre de cellules, la mortalité ou l'activité mitochondriale. L'imagerie « time-lapse » permet d'observer et de comprendre l'évolution morphologique et fonctionnelle des cultures lors de tests toxicologiques. Cette technique présente l'avantage de ne pas dégrader l'échantillon, ce qui pourra permettre de la combiner avec les autres tests déjà mis au point au sein du laboratoire.

Chapitre 1 : Introduction bibliographique

1. Les études toxicologiques

Les études toxicologiques ont pour but de déterminer la toxicité des molécules testées appelées xénobiotiques (puisqu'étrangères à l'organisme). Ces molécules peuvent être un médicament, un polluant, ou toute autre substance chimique.

Dans le cas du médicament, l'étude toxicologique fait partie des tests précliniques qui ont pour objectif d'identifier l'efficacité et la toxicité des molécules avant que celles-ci soient testées chez l'humain.

Les études toxicologiques réalisées sur les substances chimiques ont été préconisées par la directive REACH (Registration-Evaluation-Authorisation of Chemicals), mise en place en 2007 par l'Union Européenne et réclamée par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économiques) qui souhaite améliorer la connaissance des substances chimiques utilisées par l'industrie pour protéger la santé humaine et l'environnement.

Les tests toxicologiques réalisés sont très réglementés (défini par l'OCDE) et ont pour but de caractériser :

- La toxicité aiguë (dose unique) : le test doit avoir lieu sur 2 mammifères, avec 2 voies d'administration différentes, et au moins 14 jours d'observation. Il permet d'évaluer la DL50 (dose létale tuant la moitié des animaux), ainsi que la dose maximale tolérée ou NOAEL (No Observable Adverse Effect Level).
- La toxicité chronique (doses répétées sur plusieurs semaines voire mois) : l'étude est réalisée chez au moins deux espèces animales dont un non-rongeur. La voie d'administration utilisée est celle choisie pour les indications humaines. En général, trois doses sont étudiées. L'objectif de ces essais est de déterminer des organes cibles ainsi que la nature et la fréquence des effets toxiques.
- L'effet sur la reproduction, où 3 types d'études sont réalisés portant sur :
    1- La fertilité et le développement embryonnaire précoce (sur une espèce de rongeur).
    2- Le développement embryo-fœtal (sur une espèce de rongeur et de non-rongeur).
    3- Le développement pré et post-natal (sur une espèce de rongeur).

Chez les femelles : en fonction de l'inclusion ou non de femmes fertiles, sous contraception ou non.

Chez les mâles : seule l'étude de fertilité est indispensable.

Néanmoins, lors des études de toxicologie animale, un examen des gonades mâles et femelles est systématiquement effectué.

- Le potentiel mutagène : 2 types de tests sont obligatoirement réalisés, un test de mutation génique et un test d'aberration chromosomique. Des tests supplémentaires sont effectués en cas de doute et dans tous les cas avant les essais cliniques de phase II pour les médicaments. Ces tests supplémentaires sont :
  1- Un test de mutation génique sur bactéries.
  2- Un test d'aberrations chromosomiques *in vitro* sur cellules de mammifères ou sur lymphome murin.
  3- Un test d'aberrations chromosomiques *in vivo* sur cellules hématopoïétiques (cellules à l'origine de toutes les lignées de cellules sanguines) de rongeur.

  Ils seront adaptés à chaque spécificité de médicaments testés (antibiotiques, composés non absorbés...)
- Le potentiel carcinogène : étude à long terme chez le rongeur, le plus souvent le rat, complétée par une deuxième étude. Les durées sont en général de 24 à 30 mois chez le rat et de 18 à 24 mois chez la souris et trois doses seront étudiées. La voie d'administration sera identique à celle utilisée en clinique.

Toutes ces batteries de tests ont pour but d'identifier une possible toxicité du xénobiotique. Cette toxicité peut être locale, en provoquant une réaction immédiate au point de contact avec l'organisme ou être systémique, c'est-à-dire que la molécule doit passer par la circulation sanguine et être acheminée à un organe cible pour exercer son effet délétère. Tous les effets toxiques découlent de l'interaction entre la molécule testée et un constituant de l'organisme (membrane biologique, enzyme, ADN etc…) (Doull *et al.,* 2007). Parmi les tests toxicologiques, l'analyse toxico-dynamique s'intéresse à décrire et à comprendre la relation qui existe entre la dose d'un xénobiotique et la réponse toxique pour l'organisme. Elle vise également à expliquer les mécanismes d'actions impliqués dans la production des effets toxiques qui se manifestent dans diverses cibles biologiques (récepteur, cellule, organisme etc…). La toxico-cinétique, autre composante des tests,

recherche à l'inverse, les modifications générées par l'organisme sur le xénobiotique. Ces deux analyses, l'analyse toxico-dynamique et l'analyse toxico-cinétique, sont parfois étroitement liées. En effet, certains xénobiotiques ne deviennent toxiques qu'après modification par l'organisme. Pour comprendre l'impact du xénobiotique sur l'organisme, il est donc indispensable de connaitre les voies que celui-ci emprunte (Viau and Tardif 2003 ; El Yamani and Seret 2006).

2. La prise en charge d'un xénobiotique par l'organisme

Le cheminement d'un xénobiotique dans l'organisme se réalise en 4 phases : l'absorption, la distribution, le métabolisme (ou biotransformation) et l'excrétion. C'est ce qu'on appelle les paramètres ADME, présentés ci-dessous.

2.1. L'absorption

L'absorption est le processus par lequel les xénobiotiques atteignent la circulation sanguine après avoir traversé des membranes ou barrières biologiques. Ce passage au travers des membranes cellulaires a lieu grâce à différents types de transports. Les xénobiotiques absorbés par les principales voies d'accès : poumons, peau, tractus gastro-intestinal, sont ensuite transférés par les milieux sanguins et lymphocytaires vers d'autres organes (reins, foie, etc…).

Pour rappel, la cellule est séparée du milieu extérieur par une membrane biologique, constituée d'un double feuillet de phospholipides qui la protège. Cette bicouche lipidique garantit le contrôle du passage des molécules et permet d'assurer l'homéostasie du milieu intracellulaire. Il existe différents modes de transport des molécules au travers de cette membrane. Certains modes ne requièrent pas l'utilisation d'énergie car ils se font dans le sens du gradient de concentration (ou électrochimique), c'est le cas de la diffusion simple et de la diffusion facilitée. Les autres modes sont des transports actifs qui nécessitent l'utilisation d'énergie pour permettre le transport contre le gradient de concentration (figure 1).

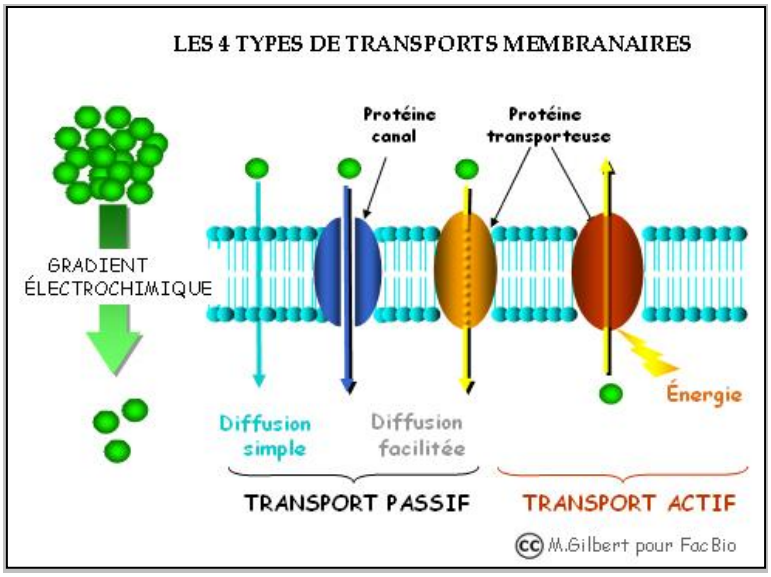


Figure 1 : L'absorption à l'échelle cellulaire : transporteurs membranaires et diffusion simple

La diffusion simple n'est possible que si la molécule est « soluble » dans la membrane phospholipidique, c'est-à-dire qu'elle peut traverser directement la bicouche de phospholipides. La molécule doit donc être lipophile ou, si elle est hydrophile, être suffisamment petite (cas de l'éthanol). La vitesse de diffusion dépend de la différence de concentration (gradient de concentration, ou électrochimique pour des ions) mais aussi de la taille de la protéine et de la température. Ce mécanisme est lent par rapport à la diffusion facilitée car les molécules doivent se dissoudre dans la double couche de phospholipides avant de passer de l'autre côté (De Sousa and Baertschi 2002, Silbernagl and Despopoulos 1992). La diffusion simple est la méthode de transport principalement utilisée au niveau du tractus gastro-intestinal et de la peau (Viau and Tardif 2003).

La diffusion facilitée emploie un transporteur transmembranaire afin de transporter des molécules polaires ou des protéines (glucose, Na^+, etc…). Ces transporteurs sont soit des canaux ioniques qui forment des pores, soit des protéines porteuses aussi appelées perméases qui changent de conformation pour déplacer la molécule d'un côté de la membrane à un autre. Ce type de transport est saturable et spécifique pour des substances ayant une étroite analogie de structures, ce qui rend les interactions médicamenteuses possibles (Sousa and Baertschi 2002 ; Silbernagl and Despopoulos 1992).

Le transport actif désigne le passage d'une molécule au travers d'une membrane contre son gradient de concentration. Cette action nécessite l'utilisation d'énergie qui peut être fournie par l'hydrolyse d'un nucléotide triphosphate (majoritairement ATP) ou par la présence d'une différence de potentiel électrochimique. Ce transport est très employé par les xénobiotiques, par exemple, au niveau de la muqueuse gastro-intestinale par le plomb, le manganèse ou par des médicaments mimant des peptides normalement pris en charge par une famille de transporteurs actifs. Parmi les protéines réalisant ce transport actif, on peut citer les transporteurs ABC (ATP Binding Casette). Elles permettent le transport de petits peptides, d'un certain nombre d'enzymes en particulier stéroïdiennes, de nombreux médicaments et produits toxiques (tableau 1). Ces transporteurs sont souvent étudiés lors d'études toxico-cinétiques. Le premier transporteur découvert est le MDR (Multi Drug Resistance). Il est fortement exprimé dans les cellules cancéreuses, ce qui exclut un traitement par chimiothérapie car les agents toxiques entrant dans la cellule pour la détruire vont être rapidement transportés par les MDR à l'extérieur de celle-ci. Ces protéines peuvent aussi être bénéfiques pour la cellule, l'expression de ces transporteurs (MDR, MRP, etc..) par les cellules permet de les protéger des agents toxiques en les éliminant du milieu intracellulaire (Kruh and Belinsky 2003).

Gene	Protein	Roles in Drug Resistance	Anticancer Drug Substrates/Inducers
ABCA2	ABC2	Drug transport	Estramustine, mitoxantrone
ABCA3	ABC3	Surfactant lipid transporter, lysosomal drug sequestration (Chapuy et al., 2008)	Doxorubicin, daunorubicin (Steinbach et al., 2006), imatinib (Chapuy et al., 2009)
ABCB1	P-gp/MDR1	Drug transport	Multiple, including *Vinca* alkaloids, anthracyclines, etoposide, taxanes, imatinib, irinotecan, methotrexate, mitoxantrone
ABCB4	PGY3/MDR3	Phosphatidylcholine and drug transport, bile acid secretion	Vinblastine (Wang et al., 2008), doxorubicin (Turton et al., 2001)
ABCB5	ABC19	Drug transport	5-Fluorouracil (Wilson et al., 2011), doxorubicin (Frank et al., 2005)
ABCB11	SPGP	Bile salt and drug transport	Paclitaxel
ABCC1	MRP1	Drug transport	Multiple, including *Vinca* alkaloids, anthracyclines, etoposide, imatinib, irinotecan, methotrexate, mitoxantrone
ABCC2	MRP2	Organic anion efflux, drug transport	Multiple, including *Vinca* alkaloids, anthracyclines, etoposide, taxanes, irinotecan, cisplatin, methotrexate, mitoxantrone
ABCC3	MRP3	Drug transport	Etoposide
ABCC4	MRP4	Nucleoside and drug transport	Irinotecan, thiopurines, methotrexate
ABCC5	MRP5	Nucleoside and drug transport	Thiopurines, cisplatin, methotrexate
ABCC6	MRP6	Drug transport	Anthracyclines, etoposide, cisplatin, gemcitabine (Ikeda et al., 2011)
ABCC10	MRP7	Drug transport	*Vinca* alkaloids, taxanes
ABCC11	MRP8	Drug transport	5-Fluorouracil
ABCC12	MRP9	Drug transport	None identified
ABCG2	ABCP/BCRP1	Toxin efflux, drug transport	Multiple, including anthracyclines, etoposide, imatinib, flavopiridol, irinotecan, methotrexate, mitoxantrone
LRP	LRP	Major vault transporter protein (Scheffer et al., 1995)	AML induction chemotherapy (List et al., 1996; Huh et al., 2006)

Tableau 1 : Les transporteurs ABC impliqués dans la résistance de médicaments anticancéreux. MRP (Multidrug Resistance Protein) ; BCRP (Breast Cancer Resistant Protein) ; LRP (Lung Resistance Protein) ; SPGP (Sister P-Glycoprotein) (d'après Xia and Smith 2012).

Enfin, le dernier type de transport cellulaire est l'endocytose (phagocytose pour les solides, pinocytose pour les liquides) qui est une forme spécialisée de transport limitée aux grosses molécules ou particules insolubles. Ce mécanisme implique un processus d'invagination de la membrane cellulaire participant aux défenses de l'organisme (macrophages, leucocytes l'utilisent). La pinocytose est utilisée par quelques médicaments ayant une masse moléculaire élevée ou par des colorants ou endotoxines bactériennes absorbés au niveau du tractus gastro-intestinal (Silbernagl and Despopoulos 1992 ; Custodio *et al.,* 2008).

Tous ces mécanismes de transport membranaire contribuent au maintien de la composition du milieu intracellulaire nécessaire au bon déroulement des réactions biochimiques intracellulaires et donc à la survie de la cellule. Également empruntés par les xénobiotiques, ces voies de transport présentent des spécificités selon les tissus ou organes. Ainsi certaines molécules vont être préférentiellement absorbées par un organe en empruntant un type de transport qui lui est spécifique.

2.2. La distribution

Une fois les xénobiotiques présents dans la circulation sanguine, ceux-ci sont distribués dans les divers tissus et organes, où ils vont exercer un effet (bénéfique ou délétère), être stockés ou être éliminés. Trois facteurs ont un impact important sur la distribution des xénobiotiques dans l'organisme : le débit sanguin de l'organe ou du tissu concerné, la capacité du xénobiotique à diffuser hors du sang vers les cellules de l'organe concerné et l'affinité des xénobiotiques pour les tissus ou organes. La forte vascularisation favorise l'arrivée rapide des xénobiotiques par voie sanguine dans certains organes (cerveau, viscères). L'affinité des xénobiotiques pour un tissu est influencée principalement par les caractéristiques physico-chimiques et la composition de ce tissu. Mais le transfert du xénobiotique du sang vers les tissus dépend également de l'efficacité des membranes biologiques à agir comme barrière. Ainsi certaines barrières très efficaces comme la barrière hémato-encéphalique ou hémato-placentaire ne laissent passer que les composés très liposolubles. Le xénobiotique parvenu dans la circulation sanguine peut se lier plus ou moins fortement et de façon réversible aux protéines plasmatiques. Les molécules d'albumine, présentes en grande quantité dans le plasma, représentent un site de stockage qui peut être

important pour certains xénobiotiques, et surtout pour les médicaments. La liaison aux protéines plasmatiques, bien que réversible, limite la distribution des substances en dehors du compartiment vasculaire vers d'autres tissus. D'autres facteurs plus dépendants de l'individu font varier la distribution du xénobiotique : l'âge, le taux d'hydratation, le rapport masse maigre/tissu adipeux, ou certains états physiopathologiques (état de choc, insuffisance cardiaque chronique, grands brûlés, état infectieux) (Viau and Tardif 2003, Shitara *et al.,* 2006).

2.3. Le métabolisme/biotransformation

Le métabolisme correspond à la transformation du xénobiotique par le système enzymatique de l'organisme. Cette modification est réalisée dans le but de le rendre plus hydrosoluble et donc plus facilement éliminable. De nombreux organes peuvent réaliser ces transformations (poumons, rein, intestin, etc.) mais c'est le foie qui métabolise majoritairement les xénobiotiques. Les modifications réalisées peuvent rendre les xénobiotiques inactifs mais peuvent également leur conférer une activité médicamenteuse, ou une activité toxique. Deux types de réactions enzymatiques interviennent lors de la biotransformation : les réactions enzymatiques de phase I et celles de phase II (Loichot and Grima 2004 ; Custodio *et al.,* 2008).

2.3.1. Les enzymes de phase I

La phase I est une étape de fonctionnalisation des médicaments, conduisant à la formation de métabolites, qui peuvent soit être éliminés directement s'ils ont atteint un degré d'hydro-solubilité suffisant, soit poursuivre les processus de métabolisation par la phase II. La phase I n'est pas obligatoire : certains médicaments peuvent subir immédiatement la phase II. Les réactions de phase I sont des réactions :

- d'oxydation qui impliquent des mono-oxygénases telles que le cytochrome P450. Elles ont essentiellement lieu au niveau des microsomes hépatiques.
- de réduction (moins fréquentes)
- d'hydrolyse qui ont lieu au niveau des organes (rein, foie, intestin, poumon..) mais aussi au niveau du plasma. Les estérases impliquées dans les réactions d'hydrolyse ne sont pas spécifiques.

Les métabolites formés par les réactions de phase I ont des groupes fonctionnels hydroxyles (OH), amines (NH2) ou carboxyles (COOH) qui peuvent ensuite être conjugués par les réactions de phases II.

Les cytochromes P450 aussi appelés CYP forment une superfamille de mono-oxygénases. Ce sont des protéines à noyau hème (hémoprotéine) qui catalysent des réactions d'oxydation nécessitant de l'oxygène et du NADPH. Il existe un grand nombre d'isoformes du cytochrome P450 (57 iso-enzymes identifiées en 2004 chez l'Homme) chacune ayant des caractéristiques et des spécificités de substrats différentes. Les cytochromes P450 sont présents dans le foie dans les microsomes hépatiques mais aussi dans l'intestin, les reins, les poumons. Les CYP des familles 1, 2 et 3 sont généralement impliqués dans la phase I du métabolisme des médicaments et d'autres composés étrangers à l'organisme, alors que les autres possèdent des fonctions endogènes (voir tableau 2). Dans le foie, les proportions des différents CYP sont connues : le CYP3A4 (20 à 50 %), le CYP2C8/9 (10 à 30 %), le CYP2D6 (2 à 6 %), le CYP2C19 (1 à 10 %), le CYP1A2 (1 à 13 %), le CYP2E1 (7 %) ainsi que les CYP2A6, et 4A. Ils représentent plus de 90 % des enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif des médicaments. Les mono-oxygénases à cytochrome P450 sont également essentielles dans les phénomènes de biotransformation de substances physiologiques (stéroïdes, acides biliaires, vitamine D, acides gras, prostaglandines, leucotriènes, rétinoïdes, etc...) (Engman 2003 ; Antolino-Lobo *et al.,* 2011 ; Soars *et al.,* 2007 ; Morgan 2009).

Cytochrome P450	Fonctions métaboliques
CYP1	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP2	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP3	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP4	Métabolisme des acides gras, eicosanoïdes, acide arachidonique et médicaments
CYP5	Thromboxane A2 synthase
CYP7	Synthèse des acides biliaires
CYP8	Synthèse des acides biliaires, prostacycline synthase
CYP11	Stéroïdogenèse
CYP17	Stéroïde 17-alpha hydroxylase
CYP19	Aromatase (synthèse des œstrogènes)
CYP21	Stéroïdogenèse, stéroïde 21-hydroxylase
CYP24	Dégradation de la vitamine D, vitamine D-24 hydroxylase
CYP26	Hydroxylation de l'acide rétinoïque
CYP27	Synthèse des acides biliaires, hydroxylations de la vitamine D3
CYP39	7α-hydroxylation du 24S-hydroxycholestérol
CYP46	Cholestérol 24S-hydroxylase
CYP51	Lanostérol 14-alpha déméthylase (biosynthèse du cholestérol)

Tableau 2 : Fonctions métaboliques des familles de CYP (d'après Gueguen *et al.,* 2006).

2.3.2. Les enzymes de phase II

Les réactions de phase II augmentent le caractère hydrosoluble des xénobiotiques en réalisant des réactions de conjugaison du métabolite fonctionnalisé avec un résidu endogène très polaire (glutathion, acide glucuronique, etc…). Les réactions de phase II sont des glucuronoconjugaisons (UDP-glycosyltransférases), des sulfoconjugaisons (sulfotransférases), des conjugaisons avec le glutation (glutation S-transférases), des conjugaisons avec des acides aminés qui peuvent être des glycines, taurines, acides glutamiques (acyltransférases), des acétylations (N-acétyltransférases) et des alcoylations (N ou O-méthyltransférases). Les réactions de phase II sont généralement plus rapides que celles de phases I. Comme les enzymes de la phase I, les enzymes de la phase II peuvent être inhibées, généralement suite à une diminution de la quantité des cofacteurs disponibles. Les réactions de phase II ont souvent comme substrat un produit de biotransformation de la phase I. Cependant, certains produits peuvent être directement impliqués dans la réaction de phase II.

Deux phénomènes peuvent contribuer à modifier de façon importante la biotransformation des xénobiotiques et affecter leur toxicité : l'induction et l'inhibition

enzymatique. L'induction enzymatique consiste en une augmentation de la quantité des enzymes capables de transformer le xénobiotique. Cette augmentation résulte d'un accroissement du taux de synthèse enzymatique ou d'une diminution du processus de dégradation. Elle est souvent due à une exposition répétée ou continue à un produit et peut conduire à un phénomène de tolérance caractérisé par une diminution graduelle des effets associés à une dose donnée d'un xénobiotique. Plusieurs médicaments (barbituriques, anti-inflammatoires) ou certaines substances telles que l'éthanol, les pesticides, les solvants sont capables de stimuler leur propre métabolisme et par la même occasion celui de substances biotransformées par les mêmes enzymes. Inversement, le métabolisme d'un xénobiotique peut être inhibé par l'action d'une autre substance biotransformée par les mêmes enzymes. Ce phénomène suppose que les substances soient présentes simultanément dans l'organisme (Viau and Tardif 2003 ; Soars *et al.,* 2007 ; Westerink and Schoonen 2007 ; Zamek-Gliszczynski *et al.,* 2005).

2.4. L'élimination et excrétion

Le processus d'excrétion conduit à l'élimination du xénobiotique hors de l'organisme. Les molécules et leur métabolites sont principalement éliminés par le rein (urine), mais l'élimination peut aussi se faire par la bile (fèces), par les poumons dans l'air exhalé, par le lait (allaitement), la salive et parfois même par les cheveux ou les ongles.

L'élimination rénale peut être de deux sortes : filtration glomérulaire, et sécrétion tubulaire. La filtration glomérulaire fait intervenir le transport passif (dépend de la taille des molécules, non spécifique, dans le sens du gradient de concentration). Les médicaments hydrosolubles sont éliminés par cette voie. Il arrive que des toxiques présentant un coefficient de partage lipide/eau élevé soient réabsorbés en partie, c'est ce qu'on appelle la réabsorption tubulaire. Cette réabsorption se fait toujours dans le sens du gradient de concentration ; elle concerne les molécules non ionisées au pH de l'urine (pH variable de 5 à 8). La réabsorption tubulaire correspond au passage d'une molécule de la lumière du néphron vers le sang. Les molécules peuvent être réabsorbées par diffusion passive (tout au long du néphron) ou par le biais de transport actif (au niveau du tubule proximal essentiellement). La réabsorption tubulaire active concerne les substances endogènes (Na^+, K^+, acide urique, acides aminés, glucose) et les médicaments ayant des structures proches de

ces substances endogènes (ex : lithium, alpha-méthyl-DOPA). La sécrétion tubulaire permet surtout l'élimination des molécules ionisées hydrosolubles, et a lieu au niveau des tubules rénaux. Elle fait intervenir un système de transport actif qui est donc spécifique et saturable. Lors du transport il y a possibilité de compétition entre différentes molécules (ex : pénicilline/probénécide) pour un même transporteur. Divers transporteurs sont impliqués dans ce mécanisme tels que les protéines MDR, MRP2 ou MPR4 qui sont sources de dys-régulations (interactions, polymorphismes génétiques).

Certains xénobiotiques sont éliminés par voie biliaire. C'est notamment le cas pour les substances qui sont peu ou pas absorbées au niveau du tractus gastro-intestinal. De plus il est très rare que 100 % de la dose d'un xénobiotique soit absorbée. Mais l'excrétion biliaire concerne les composés à fort poids moléculaire, les métabolites issus de la biotransformation des xénobiotiques et particulièrement les conjugués glucuronides, GSH. Il arrive qu'au niveau de l'intestin, les composés soient préférentiellement réabsorbés plutôt qu'éliminés. Ce phénomène est favorisé par la flore intestinale qui peut hydrolyser certains conjugués (glucuronides, sulfates) et les rendre réabsorbables. Les substances volatiles dont la concentration sanguine est en équilibre avec les concentrations tissulaires peuvent être excrétées dans l'air exhalé par les poumons. Certains produits liposolubles comme le DDT ou le méthylmercure peuvent se retrouver dans le lait maternel. D'autres xénobiotiques comme le plomb sont également excrétés par le lait mais en empruntant le système de transport du calcium. Certains autres métaux, comme le mercure se déposent dans les cheveux ; le plomb lui se retrouve également dans la salive (Viau and Tardif 2003 ; Zamek-Gliszczynski *et al.,* 2005 ; Shitara *et al.,* 2006).

Lors de l'étude toxicologique d'un xénobiotique (médicaments, pesticides, etc…) on cherche à déterminer l'impact et le devenir du produit à l'échelle d'un organe ou d'un tissu (généralement test *in vitro*) ou à l'échelle de l'organisme complet (test *in vivo*). Les études *in vitro* ne sont pas menées sur tous les organes constituant l'individu, certains organes sont sélectionnés, les organes cibles. Ils font l'objet d'études complexes ayant pour but d'identifier précisément la nature et la fréquence des effets toxiques. Pour une grande partie des médicaments, les organes cibles étudiés sont le foie, les reins et l'intestin (Williams and Latropoulos 2002). Le foie étant l'organe qui métabolise la majorité des xénobiotiques et principalement les médicaments, il fait l'objet de très nombreuses études.

3. Le foie : organe majeur du métabolisme des xénobiotiques

3.1. Structure et organisation fonctionnelle

Le foie est un organe polyvalent qui joue un rôle important dans une variété de fonctions essentielles : la digestion, l'épuration, le stockage, la désintoxication du sang ainsi que la production et la sécrétion des composants du plasma et la bile (LeCluyse *et al.,* 2012). Le foie est également impliqué dans le métabolisme des protéines, des stéroïdes et des graisses. Il permet le stockage de vitamines, du fer et du sucre.

Cet organe est constitué de deux parties, le lobe gauche (1/3 du volume) et le lobe droit (2/3 du volume), séparés par le ligament falciforme (figure 2). Il est alimenté par deux vaisseaux sanguins majeurs : la veine porte et l'artère hépatique. Le sang drainé par la veine porte provient de l'œsophage, de l'estomac et des intestins ; il s'agit d'un sang pauvre en oxygène mais riche en nutriments. L'artère hépatique provient du cœur et apporte au foie un sang riche en oxygène. Ces deux vaisseaux, en entrant dans le foie, se divisent en plusieurs branches pour en alimenter les différentes parties, ce qui fait du foie un organe fortement vascularisé. Après avoir irrigué l'ensemble des cellules du foie, le sang est évacué par la veine hépatique, qui se jette ensuite dans la veine cave inférieure qui retourne au cœur.

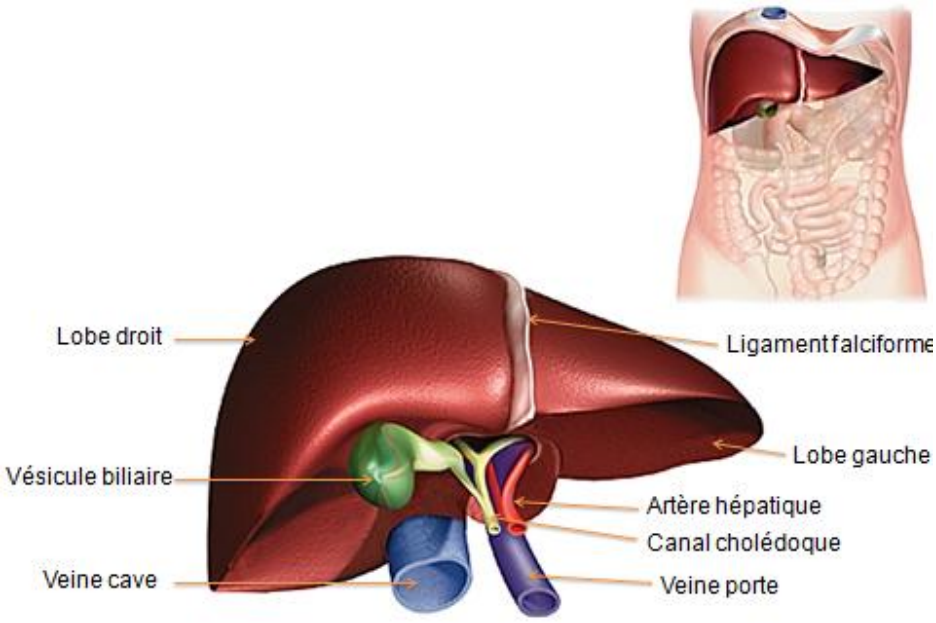


Figure 2 : Structure globale du foie (adaptée du Larousse Médical)

L'unité structurale du foie est appelée le lobule hépatique (figure 3). Vu en coupe, le lobule a la forme d'un polygone, généralement d'un hexagone, dont la périphérie est délimitée par des triades portales. Celles-ci sont chacune composée de l'artère hépatique, d'une voie biliaire et de la veine porte. La structure centrale du lobule correspond à la veine centrale. Des plaques de cellules hépatiques s'organisent à partir de cette veine centrale vers la périphérie du lobule. Elles sont généralement séparées les unes des autres par les sinusoïdes hépatiques (les «capillaires» du foie) qui sont bordées par l'endothélium sinusoïdal. Ces canalicules biliaires se trouvent enchâssées entre les cellules hépatiques afin de recueillir la bile sécrétée par les cellules (LeCluyse et al., 2012 ; Corbineau 2011 ; Bidault Godard 2011).

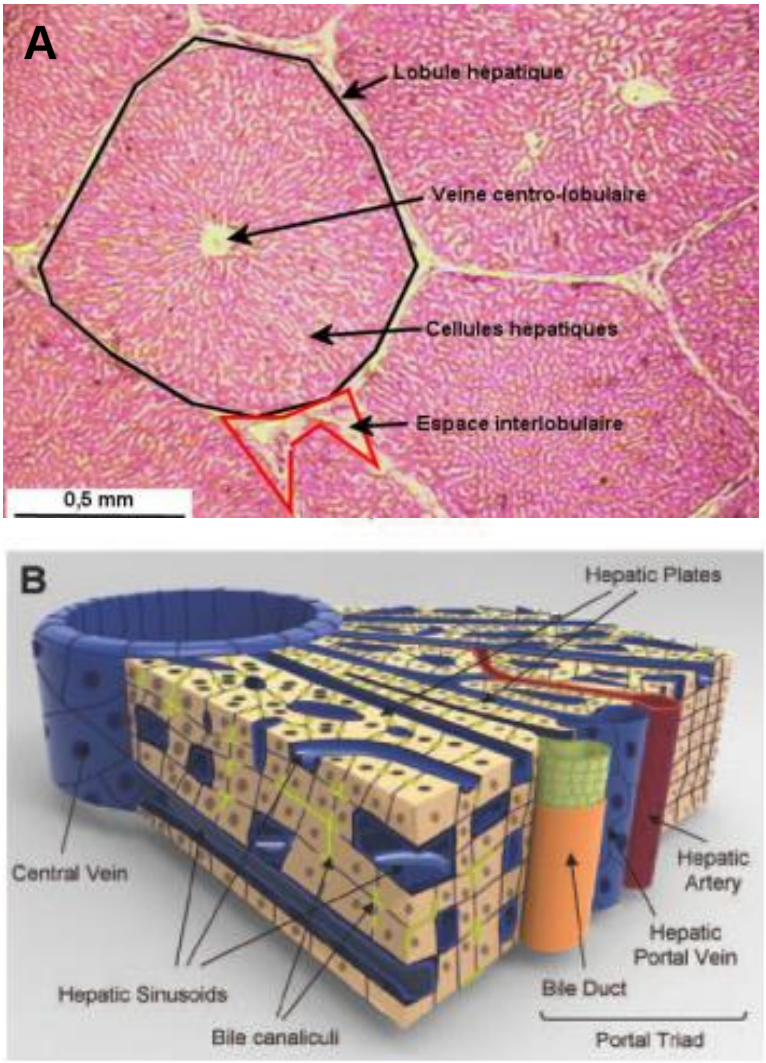
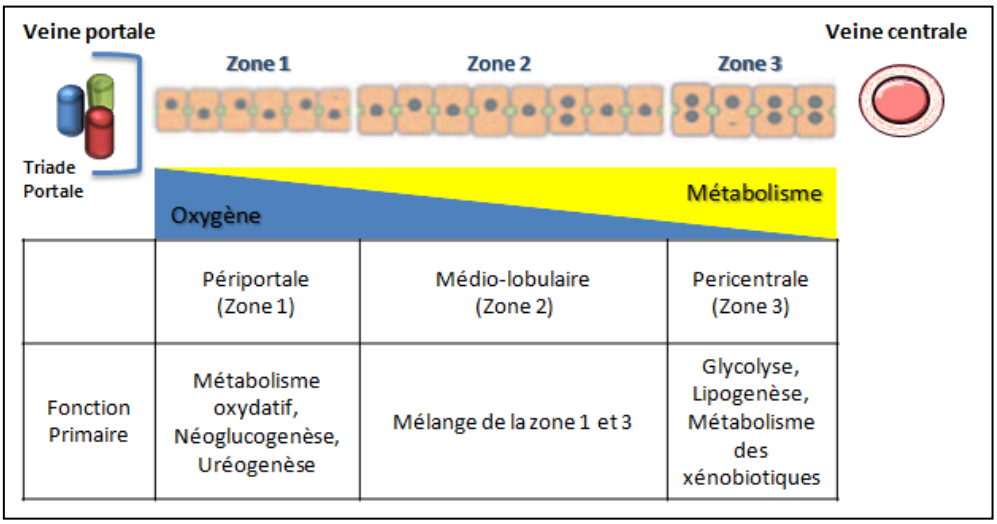


Figure 3 : Représentation de la structure d'un lobule du foie. (A) Coupe histologique, (B) Représentation schématique de l'organisation d'un lobule (adaptée de LeCluyse *et al.,* 2012).

3.2. Fonction métabolique et zonation

Cette organisation structurale présente une zonation au sein du lobule (figure 4) : 3 zones distinctes possèdent des fonctions métaboliques et d'expressions géniques associées spécifiques. La zone 1 est la région péri-portale, la zone 2 est la région médio-lobulaire et la zone 3 est la région péri-veineuse (ou péricentrale). Cette zonation peut être dynamique ou en gradient, c'est à dire qu'elle peut varier et s'adapter à l'état nutritionnel ou hormonal de l'organisme. L'expression d'un gène peut alors être plus ou moins forte et plus ou moins étendue au sein du lobule pour répondre aux besoins métaboliques immédiats. Un exemple des différences dans l'expression zonale de gènes spécifiques dans le foie humain, est le CYP3A4. Comme de nombreuses enzymes de la famille des cytochromes P450, les plus hauts niveaux d'expression du CYP3A4 se situent en zone 3 (péricentrale) et s'étendent à la région médio-lobulaire (zone 2). Cette zonation permet la prise en charge de composés bioactifs lors d'exposition à des xénobiotiques tels que l'acétaminophène, le tétrachlorure de carbone, le chloroforme ou le bromobenzène (Benhamouche *et al.,* 2006 ; LeCluyse *et al.,* 2012).



	Périportale (Zone 1)	Médio-lobulaire (Zone 2)	Pericentrale (Zone 3)
Fonction Primaire	Métabolisme oxydatif, Néoglucogenèse, Uréogenèse	Mélange de la zone 1 et 3	Glycolyse, Lipogenèse, Métabolisme des xénobiotiques

Figure 4 : Zonation structurale et fonctionnelle de lobule du foie (adaptée de LeCluyse *et al.,* 2012)

Les fonctions métaboliques hépatiques ne sont pas toutes zonées. Une grande partie des protéines sériques est synthétisée dans tout le lobule hépatique, c'est le cas de la transthyrétine (ou préalbumine), de la transferrine et de l'albumine. La plupart des autres fonctions sont zonées, c'est le cas du métabolisme lipidique, de la synthèse des acides

biliaires, du métabolisme de plusieurs acides aminés. Les principales fonctions métaboliques zonées étudiées sont le métabolisme glucidique, la détoxification de l'ammonium et le métabolisme des xénobiotiques (Silbernagl and Despopoulos 1992).

3.3. Les types cellulaires hépatiques

Les hépatocytes représentent 80 % du volume du foie et 60 % des cellules hépatiques. Les autres cellules qui le composent sont : les cellules endothéliales sinusoïdales, les cholangiocytes (cellules des canaux biliaires), les cellules de Kupffer (macrophages résidents), et les cellules stellaires ou cellules de Ito.

Les hépatocytes sont impliqués dans la majorité des fonctions métaboliques et de synthèse hépatique (Blouin *et al.,* 1977 ; Pastor and Suter 1999). Ils permettent le transport d'une grande gamme de substances endogènes ou exogènes du sang vers les canalicules biliaires via la bile. La bile sécrétée par les hépatocytes, correspond à un flux osmotique d'eau en réponse à un transport actif de solutés, ce flux dépend essentiellement de la sécrétion des acides biliaires. Au pôle sinusoïdal de l'hépatocyte, les acides biliaires sont captés par un symport couplé au sodium (transport actif), et sont transportés vers le pôle canaliculaire par diffusion ou transport vésiculaire et leur sécrétion dans les canalicules se fait par diffusion simple ou transport actif. Les hépatocytes possèdent de nombreuses enzymes impliquées dans les phases I et II de biotransformation des xénobiotiques. La spécificité des hépatocytes est liée à leur capacité à activer de manière sélective et à exprimer un ensemble distinct de gènes codant pour des catégories spécifiques de protéines. L'expression de gènes spécifiques des hépatocytes est principalement régulée au niveau transcriptionnel et dépend de signaux interne ou externe à la cellule (De Simone and Cortese, 1992).

Les cellules endothéliales sinusoïdales tapissent les parois des sinusoïdes hépatiques, et représentent 20 % de la population cellulaire du foie. Elles permettent la libre diffusion de nombreuses molécules de petite taille (50 à 200 nm), et améliorent le transport passif de nombreux substrats endogènes et xénobiotiques entre le sang et la surface basolatérale des hépatocytes. Les cellules endothéliales sinusoïdales augmentent l'accès au sang pour permettre une meilleure oxygénation des hépatocytes et une élimination plus efficace des xénobiotiques. Ces cellules présentent des enzymes de phase I et II qui leur sont spécifiques,

contribuant ainsi au métabolisme et à l'élimination de substrats endogènes et exogènes. Leur capacité métabolique représente 1/10ème de celles des hépatocytes. Elles jouent également un rôle dans l'immunité hépatique puisqu'elles ont une fonction de cellules présentatrices d'antigènes (LeCluyse *et al.,* 2012).

Les cholangiocytes : cellules des canaux biliaires, sont des cellules épithéliales qui tapissent les conduits biliaires. Elles représentent environ 5 % de la population des cellules du foie. Les cholangiocytes montrent une certaine hétérogénéité en ce qui concerne la morphologie, la sécrétion, l'expression de gènes, et la réponse aux hormones, peptides, facteurs de croissance, cytokines, acides biliaires, blessures ou toxines. Fonctionnellement, les cellules des canaux biliaires jouent un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires hépatiques localisées grâce à la sécrétion de cytokines et d'autres médiateurs (Glaser *et al.,* 2009). Elles peuvent également interagir avec des cellules immunitaires directement à travers l'expression de molécules d'adhésion à leur surface. Elles sont activement impliquées dans l'absorption et la sécrétion de l'eau, d'anions organiques, de cations organiques, de lipides, d'électrolytes, et dans la régulation de la sécrétion de la bile. Les cholangiocytes contribuent à la création de la bile par l'intermédiaire de la sécrétion de bicarbonate dans les canalicules et dans les voies biliaires. Ces cellules sont également impliquées dans la réabsorption des constituants biliaires comme le glucose ou le glutathion (Celli *et al.,* 1998 ; Strazzabosco and Fabris 2008 ; Glaser *et al.,* 2009).

Les cellules de Kuppfer sont des macrophages résidents. Elles sont localisées à l'intérieur de la micro-vascularisation sinusoïdale sur la face luminale des cellules endothéliales ; elles possèdent également de longues extensions cytoplasmiques qui facilitent le contact direct avec des hépatocytes. Elles remplissent leur rôle de macrophages en captant dans le sang arrivant au foie les différents débris à éliminer tels que les débris tissulaires ou cellulaires ou encore les endotoxines bactériennes. Les cellules de Kuppfer jouent un rôle très important dans la surveillance immunitaire et sont impliquées dans la modulation des réponses systémiques à des infections sévères, ainsi que dans le contrôle des réponses immunitaires par la présentation d'antigènes et la suppression de la prolifération des cellules T. Les cellules de Kuppfer sont également impliquées dans la modulation du « turn-over » des hépatocytes et dans l'apoptose des autres types de cellules constituant le foie. Elles interviennent enfin dans la modulation d'activités métaboliques des

hépatocytes via la production de cytokines qui induisent l'expression des protéines qui provoquent la régulation négative de gènes impliqués dans le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques. Par exemple, la production par les cellules de Kuppfer de cytokines pro-inflammatoires va entrainer la suppression complète des Cytochromes P450 et des (UDP)-glucuronosyl transférases (Sunman *et al.,* 2004 ; Wu *et al.,* 2006 ; Higuchi *et al.,* 2007 ; Morgan 2009).

Les cellules stellaires aussi appelées cellules de Ito, se situent dans l'espace péri-sinusoïdal entre la surface basolatérale des hépatocytes et le côté anti-luminal des cellules endothéliales sinusoïdales. Elles stockent la vitamine A, produisent et contrôlent la matrice extracellulaire. Elles synthétisent de la desmine : protéine filamenteuse responsable du caractère contractile des cellules. Les cellules stellaires fournissent tout un réseau de collagènes (collagène de type I en grande quantité et à des niveaux inférieurs, de types III, IV et V). Elles produisent également de grandes quantités d'élastines, de protéoglycanes à sulfate d'héparane et à sulfate de chondroïtine. Les cellules de Ito produisent également des cytokines et des facteurs de croissance pour la communication intercellulaire dans le foie qui sont diffèrents lorsque celui-ci est sain ou malade (Friedman, 2006 ; LeCluyse *et al.,* 2012).

4. L'évolution des méthodes en toxicologie hépatique

Toutes les connaissances acquises sur les paramètres ADME des xénobiotiques résultent de nombreux travaux expérimentaux. Ces travaux ont nécessité l'emploi de méthodes qui ont évolué au cours du temps, principalement grâce aux avancées technologiques.

4.1. Les différents modèles et outils développés

L'évaluation de la toxicité d'un xénobiotique peut être réalisée sur différents modèles : sur l'homme, lors des étapes de la recherche clinique d'un médicament, mais avant cela, sur des animaux (majoritairement les rongeurs), lors de la phase de recherche préclinique du médicament ou pour la recherche de toxicité de substances chimiques. D'autres modèles sont également utilisés : l'organe isolé, ou les cultures cellulaires (animales ou humaines). Tous ces modèles ont été classés en 3 groupes : les modèles *in vivo*, les modèles *in vitro* et les *in silico.*

4.1.1. Les modèles *in vivo*

Les animaux ont longtemps été le modèle de référence indispensable à tout test de toxicité. Ils permettent la détermination de la toxicité aiguë, chronique, de la clairance, ainsi que du potentiel mutagène et carcinogène (voir paragraphe 1). Les animaux employés peuvent être sains, présenter une pathologie préexistante spontanée ou provoquée, ou être des animaux modifiés génétiquement pour permettre une étude ciblée. Ces études sont longues et très couteuses en particulier lors des études chroniques. Par ailleurs, l'utilisation massive de ces animaux pose un problème financier, de variabilité inter-espèces mais surtout un problème éthique qui doit être résolu. En effet, en 2006, près d'un million d'animaux ont été utilisés pour des tests toxicologiques au niveau mondial (Dernière enquête publiée par la Commission Européenne relative à l'utilisation d'animaux à des scientifiques, COM (2007) 675, paru au Journal Officiel C9 du 15/01/2008). Ainsi depuis ces vingt dernières années des méthodes alternatives à l'expérimentation animale (également sollicités par la directive REACH) ont été recherchées. Ces méthodes doivent être capables de répondre à la règle des 3R de Russel and Burch (1959) : « Refine – Reduce – Replace » (raffiner, réduire, remplacer). Le concept de raffiner, d'optimiser l'expérimentation concerne la méthodologie appliquée sur les animaux lors des tests toxicologiques. L'objectif est tout d'abord optimiser le protocole afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, le stress subis par les animaux que ce soit dans l'intérêt de l'animal comme dans celui de l'obtention de résultats pertinents. Le deuxième R : réduire, implique une réduction du nombre d'animaux utilisés lors des expérimentations mais également une réduction du nombre des expériences qui sont parfois superflues. Lors de cette étape, l'utilisation de statistiques est fortement conseillée, afin de concevoir un protocole expérimental destiné à estimer le nombre d'animaux réellement nécessaire. Enfin la troisième règle : remplacer, préconise le remplacement des animaux chaque fois que cela est possible par des modèles *in vitro* ou *in silico*. Cependant dans l'état actuel des connaissances, ces méthodes sont la plupart du temps des méthodes complémentaires d'un projet global utilisant des animaux. C'est pourquoi, les autorités encouragent le développement des méthodes alternatives (*in*

vitro et *in silico*) qui constituent de réelles voies de substitution à l'utilisation des animaux comme modèles d'études toxicologiques.

4.1.2. Les modèles *in vitro*

Les modèles *in vitro*, comprennent toutes les techniques de culture de cellules, de tissus ou d'organes en dehors de tout organisme, sur un milieu nutritif et dans des conditions contrôlées. Ces cellules ou tissus peuvent être cultivées dans des supports de culture classiques (type : flasques), on parle alors de modèle 2D statique, ou en conditions 3D, complétées parfois par des bioréacteurs qui permettent de recréer, par la perfusion, un environnement proche des conditions *in vivo*. On parle alors plutôt d'ingénierie tissulaire. Les différents types cellulaires et types de supports pour la culture hépatique sont présentés ci-après.

4.1.2.1. Les cellules utilisées pour la culture hépatique

4.1.2.1.1. Les cellules primaires humaines

Les hépatocytes primaires humains fraichement isolés sont le modèle cellulaire le plus à même de donner des réponses fonctionnelles du foie spécialement lors d'études du métabolisme des médicaments et de l'évaluation de la clairance (Gomez-Lechon *et al.,* 2007). Les cellules primaires, lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions adéquates, expriment toutes les principales enzymes du métabolisme et les protéines transporteuses responsables de l'excrétion des xénobiotiques transformés (ex : MRP). Les hépatocytes primaires sont généralement isolés du tissu hépatique intacte par digestion à la collagénase, et purifiés par une série de centrifugations. Bien que les hépatocytes primaires contiennent initialement des enzymes métaboliques à leurs niveaux physiologiques, immédiatement après l'isolement, l'expression des gènes plus spécifiques du foie et des fonctions CYP diminue dès les premiers stades de la culture. Cette perte de l'expression génique et la diminution concomitante de la fonction au cours du temps peuvent être atténuées par la culture des cellules avec une formulation de milieu appropriée, en utilisant des matrices extracellulaires complexes et/ou cultivées avec d'autres types cellulaires (co-culture). Bien que les hépatocytes primaires offrent d'importants avantages fonctionnels, leur utilisation en routine dans les systèmes de culture cellulaire présente plusieurs défis. Le plus important est la difficulté d'obtenir des cellules humaines primaires et les tissus dont elles sont issues.

En conséquence, les fournisseurs commerciaux sont devenus une source importante pour l'obtention de cellules primaires humaines. Les progrès récents dans la cryo-préservation des hépatocytes humains ont amélioré la facilité et les capacités associées à l'utilisation de ces cellules, ils permettent la répétition d'expérimentation avec des cellules provenant d'un même donneur, ce qui limite les variations interspécifiques (LeCluyse *et al.,* 2012).

4.1.2.1.2. Les lignées cellulaires immortalisées

Une lignée cellulaire est une lignée clonale transformée, où les cellules filles vont proliférer indéfiniment lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu et des conditions appropriées. Contrairement aux cultures de cellules primaires, des lignées cellulaires ne sont pas limitées à un nombre de divisions cellulaires dues à des mutations dans une ou plusieurs voies de contrôle de la croissance, il n'y a pas de mort programmée. Ces lignées sont issues, en général, de cellules cancéreuses prélevées chez un patient (ex : HepG2) mais peuvent avoir été transformées artificiellement par transfection d'un gène « immortalisant » tel que l'antigène T du virus SV40, ou peuvent encore avoir été créées par mutation de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (ex : la protéine P53). L'ATCC (American Type Culture Collection) : la banque de cellules reconnue au niveau international, référence plus de 26 lignées immortalisées issues du foie. Les lignées de cellules hépatiques sont un modèle *in vitro* très populaire pour étudier les fonctions du foie et les mécanismes généraux de toxicité de part leur facilité d'entretien et d'utilisation. Cependant, elles sont généralement inadaptées lors de l'étude du métabolisme des médicaments et la prédiction de la toxicité, car certaines ne contiennent pas toutes les familles d'enzymes métaboliques, ou des enzymes qui ne sont pas présentes à leurs niveaux physiologiques. Autres inconvénients, bien que ces lignées soient « immortelles » : l'expression des gènes est dépendant du nombre de passages, ainsi petit à petit ces cellules perdent leurs caractéristiques génétiques et finissent par se dédifférencier.

Plusieurs lignées de cellules hépatiques : HepG2/C3A (un sous-clone dérivée de la lignée HepG2), HepaRG et la lignée cellulaire Fa2N-4 ont été évaluées en tant que candidats pour remplacer les hépatocytes humains primaires dans l'induction de CYP et l'étude du métabolisme (Kanebratt and Andersson 2008 ; Jennen *et al,* 2010 ; Wilkening and Bader 2003). Ces lignées de cellules hépatiques sont une bonne alternative aux cellules primaires pour le développement de dispositifs organo-typiques avec écoulement dynamique, en

particulier lors de l'étude de conception du dispositif (Filippi *et al.,* 2004). Les HepG2/C3A sont les cellules immortalisées les plus couramment utilisées. Issues d'un hépato-carcinome humain, elles sont facilement disponibles, peuvent se cultiver sur du long terme, et présentent la plupart des fonctions des hépatocytes *in vitro* (Knasmuller *et al.,* 1998). Les HepG2/C3A sécrètent des protéines plasmatiques, comme l'albumine, la transferrine, le fibrinogène, l'α-2-macroglobuline, et le plasminogène. Elles ne comportent pas de mutations du gène P53. Ce qui leur permettent, en réponse aux dommages de l'ADN, d'induire un arrêt de croissance pour réparer l'ADN ou initier l'apoptose lors de dommages trop importants (Knasmuller *et al.,* 1998 ; Wilkening *et al.,* 2003). Les HepG2/C3A montrent une surexpression des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, du métabolisme des nucléotides, de la régulation de transcription et des transporteurs. L'inconvénient majeur de cette lignée est l'expression basale de certains gènes codant pour des enzymes de phase I et II du métabolisme, par rapport aux hépatocytes primaires, ce qui peut entrainer une sous-estimation de la toxicité du composant testé (Wilkening and Bader 2003).

La lignée cellulaire HepaRG récemment introduite pour des tests de toxicité, semble être un modèle plus pertinent que les HepG2/C3A (Kanebratt and Andersson 2008 ; Jennen *et al.,* 2010 ; Doktorova *et al.,* 2013). Les HepaRG sont des cellules dérivées d'un hépato-carcinome qui, une fois à confluence, nécessitent une étape de différenciation par traitement au DMSO pour présenter des caractéristiques morphologiques similaires aux hépatocytes primaires humains (Guillouzo *et al.,* 2007). Contrairement aux HepG2, les cellules HepaRG différenciées expriment diverses enzymes du cytochrome P450, comme les CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2E1 et CYP3A4 à un niveau supérieur et présentent d'autres fonctions métaboliques, tel que les enzymes de phase II et des transporteurs membranaires présents chez les hépatocytes primaires (Kanebratt and Andersson 2008 ; Jennen *et al.,* 2010 ; Doktorova *et al.,* 2013). Les HepaRG s'avèrent être la lignée immortalisée la plus proche des hépatocytes primaires humains, et présentent l'avantage d'être plus faciles d'emploi que ces derniers (LeCluyse *et al.,* 2012 ; Masson *et al.,* 2008). Cependant l'utilisation de DMSO à concentration élevée (2 %), essentielle pour la différenciation cellulaire et l'expression optimale des enzymes métaboliques peut porter à controverse puisqu'il a été prouvé que l'utilisation de DMSO à 0,5 % s'avérait toxique pour les cellules (Hanslick *et al.,* 2009 ; Qi *et al.,* 2008).

Les cellules Fa2N-4 sont obtenues à partir d'hépatocytes humains primaires immortalisées par transfection avec l'antigène T de SV40 (Mills *et al.,* 2004 ; Vermeir *et al.,* 2005 ; Ripp *et al.,* 2006). La lignée cellulaire Fa2N-4 maintient les caractéristiques morphologiques des hépatocytes primaires humains non tumorigènes. Les premières études ont montré que diverses enzymes du cytochrome P450 (CYP3A4, CYP1A2, et CYP2C9) sont inductibles après une exposition à plusieurs inducteurs (Mills *et al.,* 2004). De plus, certains facteurs de transcription importants : PXR et AhR, impliqués dans la régulation du métabolisme des médicaments, ont été détectés chez les cellules Fa2N-4 et au même niveau que chez les hépatocytes primaires humains (Mills *et al.,* 2004). Ces résultats tendent à penser que cette lignée est un modèle d'étude acceptable pour étudier l'activité des CYP3A4 et CYP1A2. Toutefois, les Fa2N-4 s'avèrent être déficients en certains récepteurs comme les CAR (constitutive androstane receptor) et en plusieurs transporteurs hépatiques comme les OATPs (organic anion-transporting polypeptids), comparés aux hépatocytes primaires (Hariparsad *et al.,* 2008).

4.1.2.2. Les méthodes basées sur l'ingénierie tissulaire

Il semblerait que la culture statique en 2D d'hépatocytes primaires après quelques jours engendrerait une perte de polarité et de certaines fonctions de ces cellules (Godoy *et al.,* 2009 ; Tostoes *et al.*, 2010 ; Schyschka *et al.,* 2013). Pour palier à ce problème, la culture d'hépatocytes en 3D ou sous flux dynamique s'est développée ces dernières années. La culture d'hépatocytes en 3D comprend principalement : les suspensions cellulaires, les sphéroïdes, les cellules cultivées en pluri-couches, les cellules encapsulés ou cultivées sur matrice 3D. Lors de l'élaboration de dispositifs de culture en 3D et/ou en dynamique, l'utilisation de cellules immortalisées s'avère importante. Ces cellules permettent de donner une première idée du comportement de la culture cellulaire au sein de ces systèmes. Puis des cellules primaires iront remplacer les lignées lorsque cela s'avèrera nécessaire. Il existe différents types de ces bioréacteurs nouvelle génération, parmi lesquels : les bioréacteurs à fibres creuses (figure 5A et B), les sphéroïdes (figure 5C et D), et les microsystèmes aussi appelés biopuces microfluidiques (figure 5E). Ces derniers seront présentés plus en détails dans le paragraphe 5.2.1.

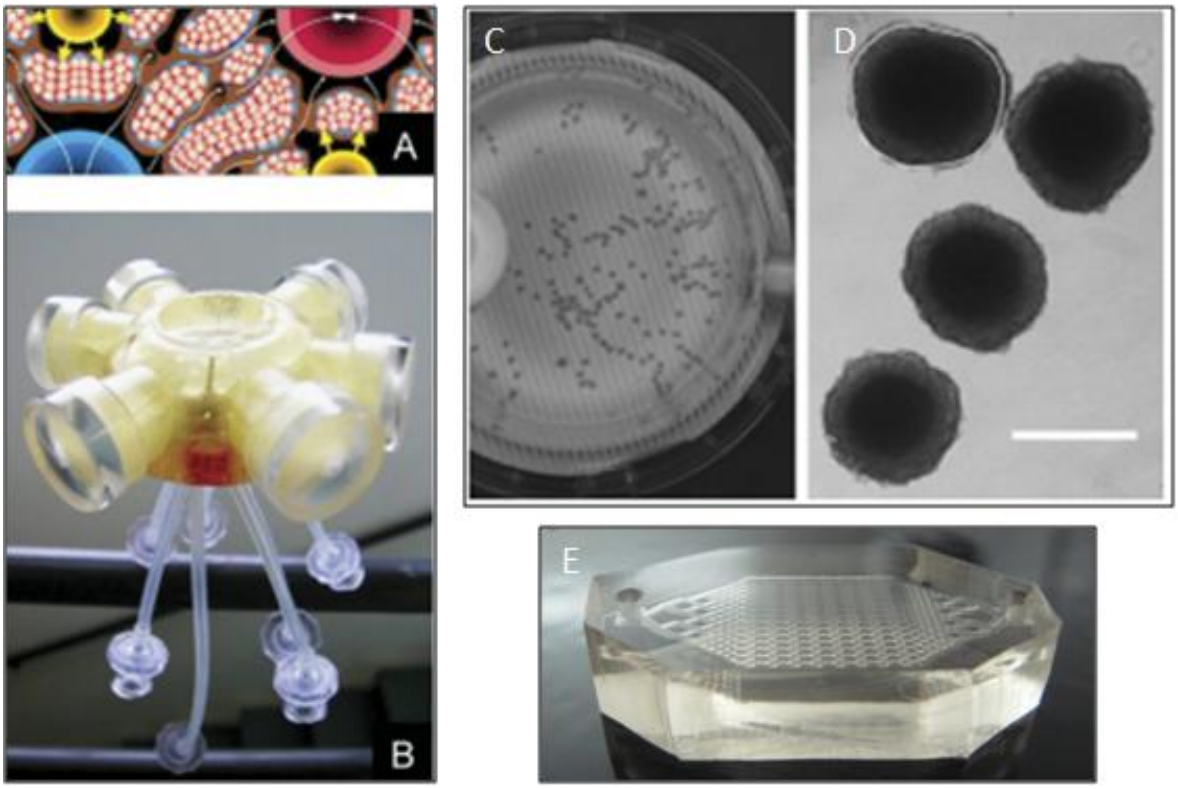


Figure 5 : Exemples de bioréacteurs hépatiques. (A et B) Bioréacteurs à fibres (Darnell *et al.,* 2011) ; (C et D) bioréacteurs à sphéroïdes (Fey and Wrzesinski 2012) et (E) Biopuce microfluidique (Legendre *et al.,* 2013)

Les bioréacteurs à fibres, permettent d'obtenir une culture hépatique de bonne qualité en maintenant le niveau d'expression des CYPs, mais ils nécessitent un nombre de cellules très élevé (Darnell *et al.,* 2011; Gunness *et al.,* 2013 ; Ulvestad *et al.,* 2012). Les sphéroïdes : agrégats cellulaires, nécessitent moins de cellules, sont techniquement plus facile à fabriquer et ont prouvé leur efficacité lors de tests de toxicité (Kelm *et al.,* 2003 ; Fey and Wrzesinski 2012 ; Tostoes *et al.*, 2010, LeCluyse *et al.,* 2012). Quel que soit le système employé, les biomatériaux ainsi que la matrice extracellulaire utilisés, sont des paramètres cruciaux à prendre en compte pour permettre le bon fonctionnement des bioréacteurs (Ng *et al.,* 2004 ; Eschbach *et al.,* 2005 ; Fukuda *et al.,* 2005 ; Feng *et al.,* 2010).

4.1.3. Les modèles *in silico*

Bien qu'initialement conçus pour évaluer la toxicité des agents environnementaux, ces modèles se sont avérés pertinents dans d'autres domaines, comme pour l'évaluation de la sécurité des médicaments. Les systèmes *in silico* de prédiction des propriétés ADME sont fondés sur une modélisation mathématique et bioinformatique, les plus connus sont les

modèles QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) et les modèles pharmacocinétiques PBPK (Physiologically based pharmacokinetics). Ils utilisent des bases de données de toxicité afin d'aider à prédire les effets indésirables des médicaments et d'autres xénobiotiques. Une grande quantité d'informations sur la toxicité des produits chimiques, provenant de recherches publiées sont accessibles au public via une base de données. En conséquence, les sources publiques de données de toxicité sont les premières à être exploitées pour la modélisation informatique et par les logiciels de toxicologie *in silico*. Cependant ces bases de données sont très faibles par rapport aux bibliothèques des composés, médicaments découverts dans l'industrie pharmaceutique, qui évidemment ne sont pas en libre accès (Luis and Valerio 2009). Celle-ci fait actuellement un usage intensif de ces modèles *in silico* afin d'identifier efficacement les médicaments qui peuvent présenter des risques graves pour la santé (Andersen and Krewski 2009).

Les procédés QSAR sont devenus incontournables dans le développement et le design de nouveaux médicaments (Hansch *et al.,* 2004). Ils visent à établir si une relation existe entre la structure et les propriétés physico-chimiques d'une molécule, avec un effet biologique déterminé comme la toxicité. Les QSAR sont des équations mathématiques déterminées à partir d'un ensemble de données sur des molécules dont on connait l'activité et les paramètres de toxicité. Il est donc nécessaire que les modèles QSAR soient construits à partir de données de haute qualité (Enoch *et al.,* 2008). Le critère de QSAR le plus couramment modélisé en toxicologie est la cancérogénicité. En 2008, Benigni et Bossa ont recensé environ 78 modèles de QSAR non commerciaux dédiés à la cancérogénicité et la toxicité génétique dans la littérature (Luis and Valerio 2009). Il existe de nombreux modèles de QSAR dédiés aux CYP (Ekins *et al.,* 2001).

Les modèles pharmacocinétiques PBPK ont pour objectif de décrire la dynamique des substances chimiques dans l'organisme, de l'absorption à l'élimination. Les modèles PBPK peuvent être réalisés à différences échelles : un tissu, un organe, ou tout l'organisme. Ils intègrent les données spécifiques à la molécule, comme la clairance intrinsèque du tissu et les coefficients de partage tissu/plasma, afin de générer un modèle structural indépendant composé d'organes et de tissus combinés, via le système vasculaire (voir figure 6).

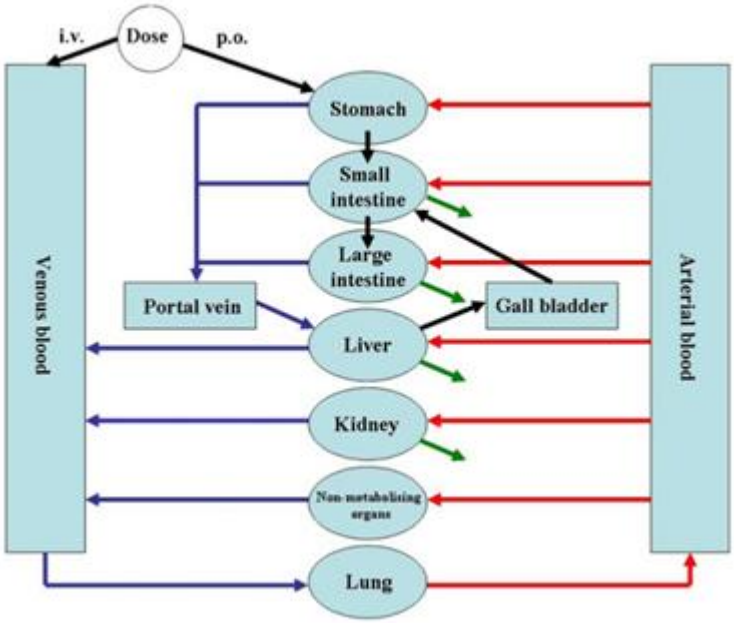


Figure 6 : Exemple d'un modèle PBPK de l'ensemble du corps humain. Les différents organes et tissus sont organisés dans un ordre anatomique et physiologique réaliste et sont reliés entre eux via la circulation (d'après Thygesen *et al.,* 2009)

Parce que le modèle structural est relativement commun à la plupart des mammifères, le modèle pharmacocinétique peut être utilisé pour l'extrapolation inter-espèces. Les modèles PBPK prévoient également des variations dans la concentration du médicament dans certains organes ou tissus d'intérêts, en fonction de la pharmacocinétique du corps entier. Les modèles PBPK peuvent s'avérer très complexes. L'avantage de cette approche de modélisation est qu'il n'y a pas de limite à l'ajustement du modèle aux données expérimentales. Si un modèle n'est pas en mesure de décrire le comportement d'un ensemble de données, des compartiments supplémentaires peuvent être ajoutés jusqu'à ce que le modèle soit plus pertinent (Campbell *et al.,* 2012). Lors de l'utilisation des modèles PBPK, il est très important de faire la distinction entre les modèles d'analyse de données et les modèles de simulation. Dans l'analyse des données, l'élément crucial est l'estimation des paramètres, tandis que les modèles de simulation sont généralement utilisés pour évaluer différents régimes posologiques et les scénarios, y compris les situations extrêmes avec surdosage et exposition aux produits toxiques. Les modèles PBPK permettent la prévision des concentrations dans diverses parties du corps et peuvent indiquer où des réactions indésirables sont susceptibles d'apparaitre. Il est également possible de simuler l'impact de changements dans les conditions pathologiques (par exemple, les fonctions des reins et du

foie) sur les concentrations de médicaments dans le corps et ainsi identifier des groupes à risque potentiels chez les populations prenant le médicament (Thygesen *et al.,* 2009 ; De Buck and Mackie 2007 ; Zhao *et al.,* 2012 ; Carlile *et al.,* 1998 ; Yoon *et al.,* 2012).

La robustesse et la capacité prédictive des modèles *in silico* ADME sont directement liées à la complexité des propriétés ADME. Pour les paramètres ADME impliquant des phénomènes complexes, telle que la biodisponibilité, les modèles *in silico* peuvent présenter certaines limites (Luis and Valerio 2009). En outre, la qualité des prévisions pour ces modèles dépend essentiellement des données utilisées, obtenues lors de tests de toxicité *in vitro*.

4.2. Les microsystèmes : modèle alternatif issu des nouvelles technologies

Le développement des microsystèmes permettant une culture *in vitro* optimisée s'est fait en grande partie grâce aux micro-technologies. Les microsystèmes sont produits en utilisant les techniques de fabrication submillimétrique issues de la micro-électronique (photolithographie, lithographie douce). Ces techniques offrent la possibilité de concevoir des micro-canaux qui rendent accessibles l'étude des écoulements simples ou complexes à l'échelle micrométrique. Elles permettent également de part l'augmentation du ratio volume-surface, d'accroitre la vitesse de réaction au sein de ces micro-canaux. L'analyse de la réponse biologique dans ces systèmes peut aussi bien se faire à posteriori (par protéomique, génomique etc …) qu'*in situ* par imagerie. L'utilisation des microsystèmes pour la culture cellulaire présente de nombreux avantages mais également des défis qui seront abordés dans les prochains paragraphes.

4.2.1. Fabrication et biomatériaux

Issues de la micro-électronique, les techniques de micro-fabrication se sont développées à partir de la fin des années 1990 grâce à Whitesides et son équipe qui ont eu l'idée d'adapter la photolithographie pour la biologie et biochimie (Young and Beebe, 2010). Née de cette idée, la lithographie douce (Soft lithography) utilise un polymère élastique, le plus souvent du polydiméthylsiloxane (PDMS), pour reproduire la géométrie du moule en silicium. Ce moule est généré par photolithographie qui consiste en un transfert d'une géométrie prédéfinie par ordinateur vers un substrat. La résine (SU-8, SJR-5740) étalée en fine couche sur une plaque de silicium (wafer), est superposée à un photo-masque puis

exposée aux UV afin d'obtenir la géométrie souhaitée. Le photo-masque, généralement une plaque de verre, est recouvert d'une fine couche de chrome non transparente représentant la géométrie définie. Lors de l'exposition aux UV, il protège certaines régions de la résine photo-sensible et expose les autres en fonction de la géométrie présente sur le masque, laissant ainsi le motif microscopique gravé dans la résine photosensible (figure 7a). Ce système permet d'obtenir une résolution de l'ordre de 10 µm (Young and Beebe 2010 ; Lee *et al.,* 2007). La lithographie douce permet de fabriquer des tampons en élastomère en utilisant une réplique de moule. Cette réplique recouverte d'une solution protéique va, par microcontact avec un support, venir déposer les protéines selon la géométrie présente sur le moule. Cette technique est dite d'impression par micro-contact (microcontact printing) (figure 7b). Elle permet de créer des zones de culture prédéfinies en fixant sur un support, un motif de protéines adhésives comme du collagène (Bhadriraju and Chen, 2002 ; Khetani and Bhatia, 2008). La lithographie douce permet également de créer des dispositifs microfluidiques par collage d'une réplique en PDMS micro-structuré sur un support en verre ou sur une autre réplique en PDMS. La création d'entrées et de sorties permet de faire passer le flux à l'intérieur de la géométrie générée, le plus souvent des micro-canaux (figure 7c) (Falconnet *et al.,* 2006 ; Goubko and Cao 2009 ; Huh *et al.,* 2011).

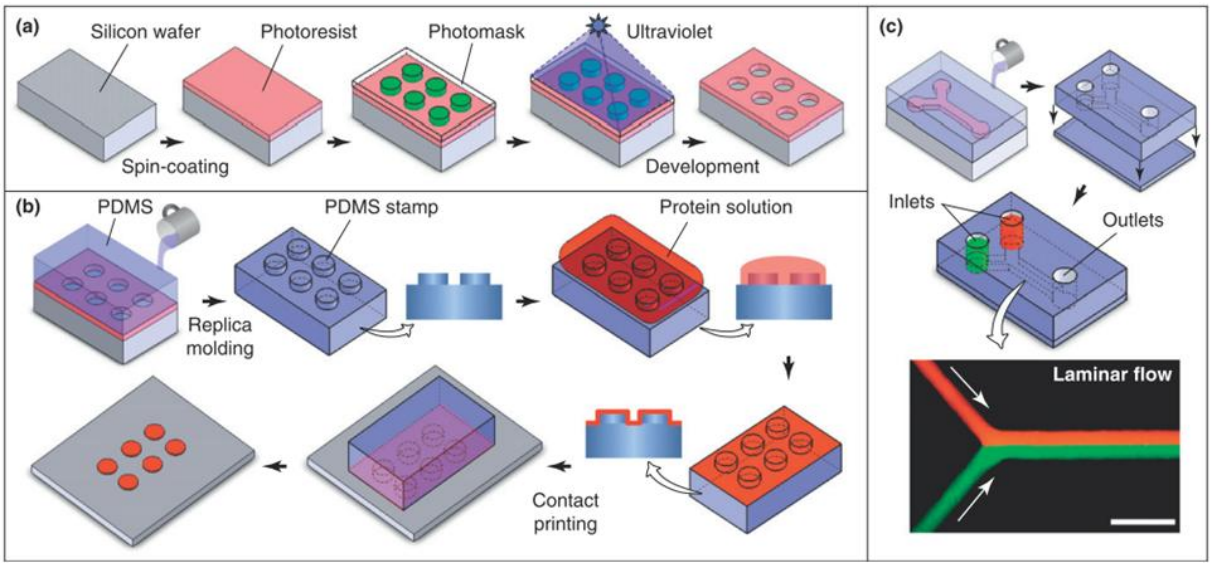


Figure7 : Représentation de la technique de photolithographie : (a) création d'un moule par photolithographie. (b) impression par micro-contact, et (c) création d'un système microfluidique. (d'après Huh et *al.,* 2011)

Le PDMS de formule $(C_2H_6OSi)_n$ est le matériau le plus employé pour la fabrication de microsystème, car il présente de nombreux avantages. Pour la fabrication de dispositifs microfluidiques, le PDMS (liquide) mélangé à un agent réticulant est versé sur un moule microstructuré et est chauffé afin d'obtenir une réplique du moule en élastomère (PDMS réticulé). Peu couteux et simple d'utilisation, il permet de recréer facilement la géométrie recherchée. Le PDMS présente une perméabilité aux gaz élevée ce qui assure un apport en oxygène suffisant pour les cellules au sein des micro-canaux, éliminant le besoin d'oxygénateurs distincts qui sont généralement requis dans les systèmes en silicium, verre ou tout autre dispositif en matière plastique. Il est biocompatible, cependant son hydrophobicité empêche l'adhésion cellulaire, ce qui pour la culture cellulaire requiert un traitement de surface (coating) avec des protéines adhésives. Le PDMS est transparent, cette propriété permet une observation facile de la culture au sein de ces systèmes mais permet également des mesures de la fluorescence (Chao *et al.,* 2009). Le PDMS se colle de manière étanche sur du verre ou sur une autre couche de PDMS avec un simple traitement au plasma à oxygène. Ceci rend possible la fabrication de dispositifs en PDMS multicouche et permet de profiter des possibilités technologiques du substrat verre, telle l'utilisation de dépôt métallique, de dépôt d'oxyde ou de fonctionnalisation de surface. Il présente aussi l'avantage d'être viscoélastique, capable de se déformer sous l'effet d'une pression imposée par passage d'un fluide traversant les micro-canaux. Cette propriété a été utilisée notamment pour mimer les mouvements respiratoires des poumons (Huh *et al.,* 2010) mais peut également servir à la création de vannes microfluidiques (Huang *et al.,* 2007). Le PDMS est stérilisable par autoclave. Il présente une faible auto-fluorescence qui émet dans le vert.

Mais ce matériau possède également quelques défauts ; il est quasiment impossible d'effectuer des dépôts métalliques sur le PDMS, ce qui limite fortement l'intégration d'électrode et de résistance. Néanmoins ce problème est minimisé par le fait que le PDMS se colle facilement sur une lamelle de verre à l'aide d'un traitement au plasma à oxygène. Ainsi les différents dépôts de couches minces métalliques ou diélectriques peuvent être effectués sur la lamelle de verre. Le PDMS est un matériau qui vieillit : au bout de quelques années ou de nombreux passage à l'autoclave, les propriétés mécaniques de ce matériau peuvent être altérées. Le PDMS adsorbe des molécules hydrophobes et peut relarguer dans le liquide ambiant des monomères issus d'une mauvaise réticulation (ce qui peut être gênant pour

certaines études biologiques). Ce matériau est perméable à la vapeur d'eau ce qui rend difficile le contrôle de l'évaporation. Il est sensible à l'exposition à certains produits chimiques tel que les acides (acide sulfurique, fluorhydrique et nitrique), l'hydroxyde de potassium ainsi qu'au tampon d'acide fluorhydrique (BHF) (Mata *et al.,* 2005 ; Lin *et al.,* 2010 ; Huh *et al.,* 2011).

4.2.2. Intérêts des systèmes microfluidiques pour les cultures cellulaires

Pour bien comprendre comment les tissus fonctionnent, il est crucial de déterminer comment les cellules de ces tissus se comportent, à quel environnement ils sont exposés : structure 3D, connexion entre les cellules, débit sanguin, microenvironnement biochimique etc... Malheureusement, la plupart des études effectuées sur des cellules ou tissus ne s'appuient que sur l'analyse avec des modèles de culture cellulaire 2D qui ne parviennent pas à reconstituer le microenvironnement cellulaire présent *in vivo* et par conséquent, ces cultures ne maintiennent souvent pas toutes leurs fonctions différenciées. Les systèmes microfluidiques visent à remédier à ces limitations, en renforçant l'expression des fonctions différenciées, en favorisant la croissance, le développement 3D et en améliorant l'organisation des tissus (Huh *et al.,* 2011).

Ces microsystèmes sont des microenvironnements *in vitro* qui offrent la possibilité d'être régulés, mais qui nécessitent surtout un contrôle permanent. Ainsi les paramètres qui doivent être considérés sont : l'ensemencement des cellules, la gestion des propriétés physico-chimiques, le transport de masse, la contrainte de cisaillement, et la formation de bulles (Sung and Shuler 2010). Ces microsystèmes sont capables d'intégrer des micro-capteurs ou sondes qui peuvent contrôler différents paramètres physico-chimiques comme le pH, la consommation d'O_2 ou de glucose (Pereira Rodrigues *et al.,* 2008 ; Lin *et al.,* 2009, Dertinger *et al.,* 2001). La culture dans ces microsystèmes peut nécessiter l'emploi d'une matrice extracellulaire pour permettre l'adhésion cellulaire. Cette matrice est essentielle à l'adhésion cellulaire, elle favorise la croissance cellulaire en 3D, et aide au maintien de l'intégrité du tissu. Les microsystèmes cherchent à mimer le comportement *in vivo* des cellules grâce, entre autre, à la géométrie choisie et au passage d'un flux en continu. Ce flux, toujours utilisé à faible débit afin d'éviter de stresser ou d'éluer les cellules, de part la taille du système, est en régime laminaire, aucun mélange n'est donc réalisé dans ces systèmes

(Leclerc *et al.,* 2006). Il permet de renouveler le milieu riche en nutriment en continu, contrairement à la culture statique. L'utilisation d'un flux à faible débit permet également augmenter la diffusion des substances ou nutriments présents dans le milieu. Ces systèmes offrent l'opportunité de reconstituer et d'intégrer des signaux mécaniques dynamiques ainsi que des signaux chimiques (Young and Beebe 2010 ; Huang *et al.,* 2010 ; Huh *et al.,* 2011).

Cependant la présence de tuyaux, pompes etc…, rend la manipulation de ces systèmes plus complexe que les systèmes de culture statique classiques.

4.2.3. Les biopuces microfluidiques hépatiques pour les tests de toxicité

Depuis ces dix dernières années, les biopuces microfluidiques dédiés aux tests de toxicité se sont largement développées (figure 8). Initialement créées pour observer un phénomène précis, elles cherchent de plus en plus à se rapprocher des conditions *in vivo*, en utilisant des matériaux biocompatibles, en réalisant un coating de protéines adhésives et en employant des types cellulaires adaptés. Quelques médicaments ou produits chimiques ont été testés. Les tests réalisés sur ces biopuces se font de plus en plus conséquents ; d'un marquage de viabilité, l'analyse de la toxicité s'est étendue à la mesure de l'IC_{50}, à la recherche et le dosage des métabolites issus de la transformation du xénobiotique (par HPLC, spectrométrie de masse), mais également à la recherche des gènes induits par la présence de ce xénobiotique (tableau 3).

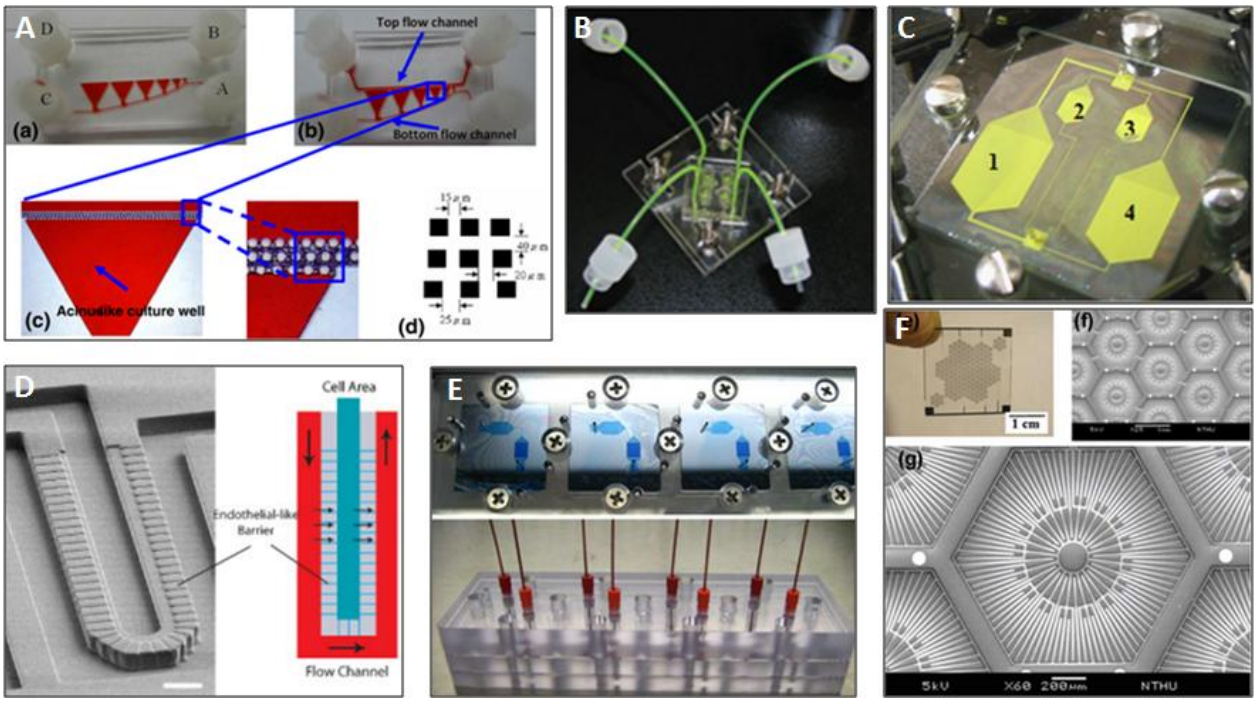


Figure 8 : Représentation de quelques biopuces microfluidiques. A : biopuce mimant un gradient acinus (Shih *et al.,* 2013) ; B : système PCTS (Van Midwoud *et al.,* 2009) ; C : système µCCA (Tatosian and Shuler 2009) ; D : système PµSs (Lee *et al.,* 2007) ; E : système HµREL® (Chao *et al.,* 2009) et F : biosystème en forme de lobule hépatique (Ho *et al.,* 2013).

Bioréacteur	Matériau	Coating	Type Cellulaire	Format de culture	Mesures réalisées	Molécules testées	Réf
HμREL	Silicium, Plexiglas (PMMA)	Collagène type I	hépatocyte primaire humain	monocouche, perfusion sans recirculation du milieu	suivi de synthèse des métabolites, clairance, viabilité (live/dead fluorescence)	Buspirone, Carbamazepine, Timolol, Imipramine, Sildenafil, Caffeine	Chao *et al.*, 2009
DataChip	Verre avec revétement APTMS	PS-MA (anti-adhésif), Collagène type I	MCF7-Hep3B	cellules incluses dans une matrice de collagène	viabilité (live/dead fluorescence), IC_{50}, expression de certains CYP	Doxorubicin, 5-Fluorouracil, Tamoxifen, Acide Acetylsalycilique, Digoxin, Nicotine, Acide Dichlorophenoxyacetique, Atropine, Theophylline, Paraquat	Lee *et al.*, 2008
RoboTox	Polycarbonate, PET, Si3N4	collagène, galactose	hépatocyte primaire de rat	en sandwich, perfusion avec recirculation	viabilité (MTS), activité de certains CYP, production d'urée, présence filament d'actine, transfert de masse	APAP, diclofenac, ketoconazole, chlorpromazine, flutamide, quinidine	Zhang *et al.*, 2011
Micropatterning sur plaque micropuits	PDMS	Collagène type I	hépatocyte primaire de rat et fibroblaste 3T3-J2 en co-culture	co-culture avec un micro-patterning	production d'urée, production d'albumine, expressions de certains CYP, viabilité (MTT), présence canalicule biliaire	Proglitazone, Rosiglitazone, Ciaglitatione, Troglitazone, Omeprazole, β-naphthoflavone, DMSO, Rifampin, Phenobarbital, Dexamethasone	Khetani and Bhatia 2008
Plateforme 3D de culture en microsystème	Verre avec revétement PSMA	$BaCl_2$/PLL, Alginate	HepG2	cellules incluses dans une matrice d'alginate	viabilité (MTT, live/dead fluorescence), présence CYP3A4, CYP2C9, VEGF, EGFR, intégrine, tubuline etc...	Doxorubicin, 5-Fluorouracil, Tamoxifen, Amitriptyline	Meli *et al.*, 2012
Puit en nid d'abeille, Bioréacteur	PDMS, PLLA	MPC	hépatocyte primaire de rat, HUVEC	aggrégats d'hépatocytes, enrobés d'HUVEC	production d'albumine, présence cadhérines, comptage cellulaire (DAPI)	-	Pang *et al.*, 2012
Bioréateur à système pneumatique intégré	Polystyrène, polycarbonate, ST-625FS (polyether aromatic polyurethane)	Collagène	hépatocyte primaire de rat	culture 3D dans micro-puits	production d'albumine, viabilité (live/dead fluoresence), oxygène consommé	-	Domansky *et al.*, 2010
Foie 3D à micro-échelle	Micro puits en silicium, filtre microporeux		hépatocyte primaire de rat	aggrégats , sphéroïdes	analyse ADN, viabilité (live/dead fluorescence), production d'urée, production d'albumine, MET	-	Powers *et al.*, 2002
Sinusoïde de foie artificiel	verre, PDMS, acrylique	collagène type I	hépatocyte primaire rat et humain	monocouche	viabilité (live/dead fluorescence, bleu trypan, LDH)	Diclofenac	Lee *et al.*, 2007
Bioréacteur hépatique à zonation	verre, PDMS, polycarbonate	collagène type I	hépatocyte primaire de rat	monocouche	viabilité (live/dead fluorescence, MTT), expression CYP2B, CYP3A, western blot	dexamethasone, phenobarbital	Allen and Bhatia 2005
Foie artificiel microstructuré	PMMA	-	hépatocyte primaire de rat	aggrégats 3D	viabilité (bleu trypan), production d'albumine, expression de certains CYP, northern blot, HPLC	Scoparone	Eschbach *et al.*, 2005
3D-μFCCS	Verre, PDMS	NaIO4	HepG2/C3A	aggrégats 3D	viabilité (live/dead fluorescence), présence filament d'actine, SEM	-	Ong *et al.* , 2008
μCCA	Silinium, PDMS, Plexiglass	poly-D-lysine, fibronectine	HepG2/C3A	monocouche	viabilité (live/dead fluorescence, MTS), HPLC, suivi de synthèse de métabolite	doxorubicin	Tatosian and Shuler 2009
PCTS	PDMS, membrane polycarbonate	-	tranche de foie de rat	culture du tissu pris entre 2 membranes	mesure pH et oxygène dissous, viabilité (LDH), analyse par HPLC de différents métabolites	7-ethoxycoumarin	van Midwoud *et al.*, 2010
Biopuce mimant la morphologie de lobule du foie	verre, titanium/platinum	collagène type I	HepG2/C3A, HUVEC	monocouche suivant la géométrie 3D	viabilité (live/dead fluorescence), activité CYP1A1	-	Ho *et al.*, 2013
Dispositif microfluidique mimant un gradient de concentration acinus	PDMS	collagène type I	HA22T	monocouche	viabilité (live/dead fluorescence), simulation et évaluation écoulement et gradient de concentration	-	Shih *et al.*, 2013
PμSs	PDMS	-	A549, HepG2, MCF-7	amas cellulaire	viabilité (live/dead fluorescence), mesure pression, débit du flux	-	Liu *et al.*, 2012
Biopuce microfluidique	PDMS	fibronectine	HepG2/C3A	culture 2D/3D	production albumine, consommation glucose, cycle cellulaire et apoptose, expression CYP1A1/2, HPLC, MS/MS	Paracetamol	Prot *et al.*, 2011
IDCCM	PDMS, polycarbonate	collagène type I	hepatocyte primaire de rat	culture 2D/3D	viabilité (bleu trypan, live/dead fluorescence), activité CYP1A2, expression d'enzymes du métabolisme	Paracetamol, Phenacetin, Caffeine, Midazolam	Legendre *et al.*, 2013

Tableau 3 : Descriptif des caractéristiques de biopuces microfluidiques dédiées aux tests toxicologiques.

Les biopuces microfluidiques développées au sein du laboratoire Biomécanique - Bio-ingénierie (UMR CNRS 7338) par l'équipe du Dr Leclerc ont fait l'objet de nombreuses études (figure 9). Les premières études ont permis de mettre au point les protocoles de cultures des cellules rénales (MDCK) et hépatiques (HepG2/C3) (Baudoin 2008). Il a également été mis en place un système de co-culture correspondant à une biopuce contenant des cellules rénales (MDCK) reliée directement à une autre biopuce contenant des cellules hépatiques (HepaRG) (Choucha-Snouber *et al.,* 2012b).

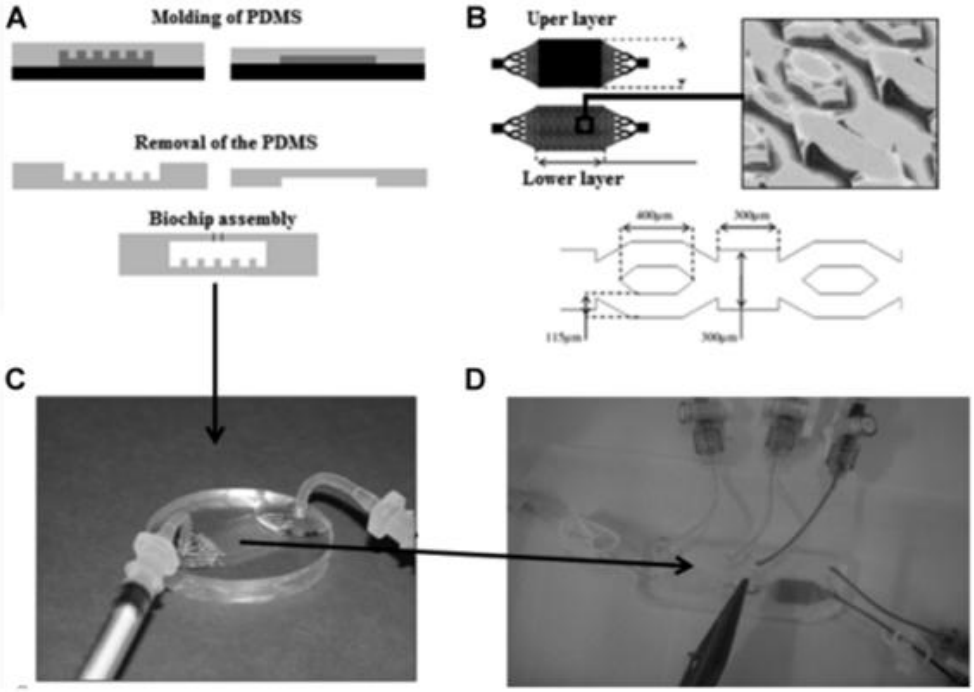


Figure 9 : Biopuce microfluidique développée par le Dr Leclerc. (A) technique de fabrication de la biopuce, (B) géométrie 3D composant la biopuce microfluidique, (C) représentation d'une biopuce utilisée pour la culture cellulaire, (D) deux biopuces interconnectées pour permettre une co-culture (d'après Choucha-Snouber *et al.,* 2012b).

Ces protocoles ont été utilisés pour tester la toxicité de molécules : le chlorure d'ammonium (Baudoin *et al.,* 2007), le paracétamol (Prot *et al.,* 2011b) et l'ifosfamide (Choucha-Snouber *et al.,* 2013). Lors de leurs études de nombreuses analyses sont réalisées afin de caractériser les cultures en évaluant des paramètres tels que la prolifération cellulaire, la répartition des cellules dans le cycle cellulaire, la viabilité, l'apoptose, la consommation de glucose, de glutamine, la production d'albumine pour les hépatocytes ainsi que les activités enzymatiques des CYP et l'expression de gènes induits par la présence du produit toxique. Ces études ont mis en évidence que les cellules cultivées en biopuce

étaient beaucoup plus sensibles aux produits toxiques que celles cultivées en système conventionnel (boite de Pétri). Ces résultats démontrent le potentiel de ce modèle alternatif pour la toxicologie prédictive. Dernièrement, ces biopuces ont été intégrées à un boitier de culture appelé CCDIM (Cultures Cellulaires Dynamiques Intégrées en Microsystèmes), il permet de cultiver en parallèle 12 biopuces. Ce boitier utilisé pour caractériser le métabolisme d'hépatocytes primaires de rats assure le maintien de la différenciation des hépatocytes primaires, exigence majeure pour atteindre le métabolisme et la toxicité physiologique (Legendre *et al.,* 2013).

Une des orientations possibles à l'utilisation des biopuces microfluidiques semble être le criblage à haut débit (Xu *et al.,* 2008 ; Zhang et *al.,* 2011 ; Lee *et al.,* 2008 ; Prot *et al.,* 2011b). Ces systèmes multicanaux permettent de tester simultanément des dizaines de xénobiotiques. Mais les données issues de ces expériences sont nombreuses et peuvent s'avérer lourdes à recueillir. Une alternative à ces analyses, est l'utilisation de la microscopie combinée à la fluorescence qui permet d'obtenir des données, parfois même en temps réel. Les biopuces étant dans la plupart des cas transparentes, cette technique s'avère à priori relativement aisée à mettre en œuvre.

5. L'imagerie appliquée à l'analyse *in vitro*

Les images issues de la culture cellulaire prises grâce aux microscopes, sont depuis longtemps utilisées pour avoir une vision générale de l'aspect des cellules. L'imagerie permet à partir de techniques de traitement de ces images d'obtenir des données quantitatives : nombre de cellules, division cellulaire, activités enzymatiques, etc. Automatisable, l'imagerie présente l'avantage de pouvoir traiter un grand nombre de données rapidement, ce qui fait de cette technique, une alternative ou un complément de choix aux analyses couramment utilisées pour les cultures biologiques. Différents paramètres sont à prendre impérativement en compte lorsque l'on souhaite utiliser l'imagerie : la qualité de l'image, le type de l'image, les informations que l'on souhaite obtenir et les logiciels employés.

5.1. La qualité de l'image

La qualité de l'image conditionne toute analyse ultérieure : sans qualité suffisante aucune information cohérente ne pourra être obtenue. Elle est dépendante de nombreux éléments liés à l'expérimentation en elle-même: le montage optique, la caméra, les filtres, la source de lumière, le matériau et échantillon en lui-même, qui peuvent être autant de source de bruit et donc de perte de qualité. Le montage optique correspond au type de microscope employé, dans notre cas les microscopes optiques. C'est lui qui va déterminer le type d'image obtenu (voir paragraphe 5.2). Tous les constituants du microscope : la source lumineuse et le condenseur qui permet l'obtention d'une lumière homogène et régulière sur l'ensemble du champ observé, les objectifs et les lentilles qui les composent, ainsi que la platine porte échantillon doivent tous être correctement réglés et nettoyés pour obtenir des images de la meilleure qualité possible.

La source de lumière peut être de différents types : halogène, à mercure ou xénon pour les lampes fluorescentes ou laser. Ces lampes ne présentent pas les mêmes spécificités. Les lampes dédiées à la fluorescence sont relativement chères et présentent une durée de vie assez limitée (≈ 2000 heures).

Sur les microscopes dédiés à l'imagerie, la caméra remplace l'œil humain. Dans la grande majorité des cas, cette caméra possède un capteur CCD (Charge-Coupled Device) qui présente une grande sensibilité et des caractéristiques de bruit de fond faible.

Les filtres majoritairement employés pour la fluorescence permettent de filtrer la lumière allant de la source de lumière vers le capteur, ici la caméra. Pour chaque analyse deux filtres sont utilisés : un au niveau de la source de lumière appelé filtre d'excitation, il ne laisse passer que la longueur d'onde d'excitation propre au fluorochrome choisi, et un au niveau du capteur appelé filtre barrière qui est chargé de ne laisser passer que la longueur d'onde d'émission du fluorochrome. Ces filtres ont pour but de ne faire ressortir que l'information demandée comme la fluorescence émise par un fluorochrome choisi. Cependant ces filtres peuvent être une source d'erreur lorsqu'ils sont mal choisis : non spécifique du fluorochrome ou pas assez filtrant, ils vont laisser apparaitre d'autres informations que celles attendues, générant ainsi du bruit de fond ou des aberrations.

Une autre source non négligeable de bruit de fond est le matériau utilisé sur ou dans lequel l'échantillon est contenu. Ces matériaux plus ou moins opaques peuvent baisser

la qualité de l'image, certains comme le PDMS s'avèrent également auto-fluorescent. Si le fluorochrome choisi pour visualiser des éléments dans l'échantillon est de même couleur que l'auto-fluorescence du matériau, l'information recherchée pourrait se retrouver noyée dans le bruit de fond généré par le matériau.

Enfin, l'échantillon en lui-même peut faire baisser la qualité de l'image obtenue principalement à cause de l'épaisseur du tissu à observer ou de la matrice extracellulaire employée qui représente un piège à fluorochrome (Verdaasdonk *et al.,* 2013 ; Ahmed *et al.,* 2008 ; Terryn *et al.,* 2008 ; Ellenberger and Young, 2000).

Il faut finalement ajouter que la qualité est conditionnée par le stockage des images et notamment par la résolution spatiale (capacité à distinguer 2 objets proches) et la quantification (capacité à distinguer 2 objets d'intensité proche). Ces 2 paramètres sont liés respectivement à la taille de l'image (nombre de pixels) et au nombre de bits de codage de la couleur (ou du niveau de gris). Ils déterminent donc la taille du fichier de sauvegarde de l'image.

5.2. Les types d'images

Les images issues de cultures cellulaires observées au microscope, marquées ou non, peuvent être de différents types : en contraste de phase, en contraste interférentiel différentiel, en fond clair, en fond noir (figure 10), en confocal ou en fluorescence.

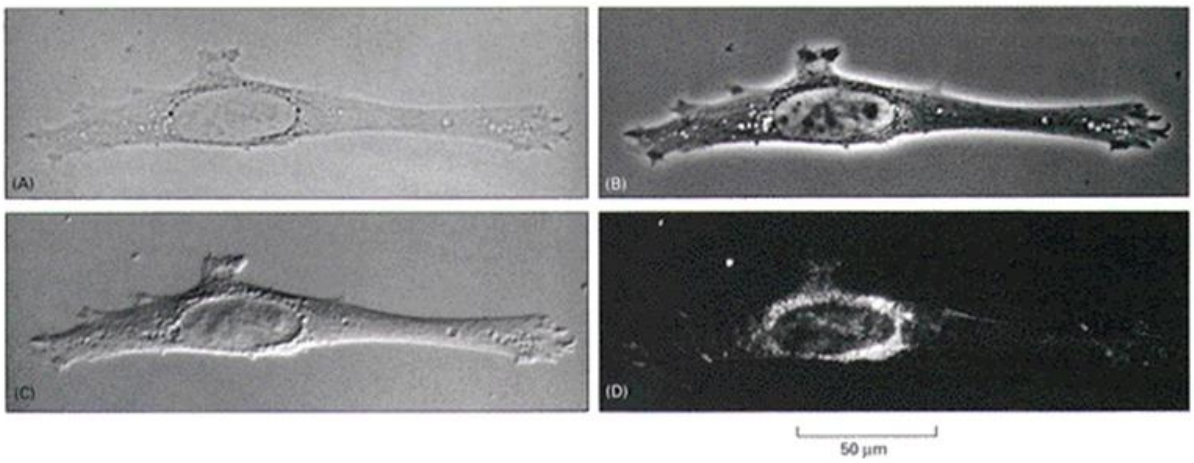


Figure 10 : Exemple d'une cellule observée par différentes techniques : (a) en fond clair, (b) en contraste de phase, (c) en contraste interférentiel différentiel et (d) en fond noir (d'après Alberts 1996).

Les images en contraste de phase et fluorescentes sont les plus utilisées à l'heure actuelle et seront détaillées ultérieurement. Quelques mots sur les autres types d'images : tout comme le contraste de phase, le contraste interférentiel différentiel est une technique qui permet de visualiser des objets transparents par une augmentation de leur contraste. Cette technique donne aux cellules un pseudo relief, ce qui permet parfois à l'œil nu de délimiter les cellules entre elles. Le contraste interférentiel différentiel supprime le phénomène de halo propre au contraste de phase, ce qui améliore légèrement la qualité de l'image mais rend l'observation des différents constituants cellulaires moins aisée.

Les images obtenues par fond clair ou noir sont les techniques les plus simples et les plus anciennes. Limitées par leur faible contraste, elles ont très vite été délaissées au profit des autres techniques.

Apparu à la fin des années 80, le microscope confocal est un microscope optique qui a la propriété de réaliser des images de très faible profondeur de champ (≈ 400 nm). En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon (cellules, tissus etc…), il est possible de réaliser des séries d'images à partir desquelles on peut obtenir une représentation 3D de la cellule ou du tissu. Il est le plus souvent combiné avec l'utilisation de la fluorescence et utilise un laser comme source de lumière. De par toutes ces caractéristiques, les images confocales obtenues sont de très bonne qualité. Cependant c'est un appareil relativement onéreux qui n'est pas présent dans tous les laboratoires. Il présente également ces limites puisqu'il n'est capable d'analyser que des échantillons fins, ce qui exclut toute analyse de tissu en bioréacteurs. C'est pourquoi le contraste de phase reste le type d'image le plus présente dans la littérature (Sterrenburg 2002 ; Ellenberger and Young 2000 ; Ahmed *et al.,* 2008).

5.2.1. Contraste de phase

Le contraste de phase est une technique qui permet de convertir une différence de phase en contraste observable. Cette différence de phase résulte d'une différence dans la longueur du chemin optique due à l'épaisseur de l'objet. Cette technique est réalisée au moyen d'un anneau circulaire placé dans le condenseur qui produit un cône de lumière. Ce cône superposé à l'anneau de même taille va produire une différence de phase d'un quart de longueur d'onde. Le résultat de cette technique est qu'il est possible d'observer les contours des cellules lorsque celles-ci sont en monocouche stricte et à une faible densité

(Sterrenburg 2002). Grâce aux contours, le dénombrement des cellules, ainsi que le suivi de leur étalement et déplacement (tracking) est réalisable au cours du temps (Abraham *et al.,* 2004 ; Francis *et al.,* 2010). Il est également possible de suivre l'évolution d'une population en retraçant les divisions cellulaires successives et donc en identifiant les cellules mères et les cellules filles (Zheng *et al.,* 2011). Mais les données issues des images en contraste de phase sont limitées (contraste faible, rapport signal sur bruit peu élevé, valable que pour une faible densité cellulaire). Pour obtenir beaucoup plus de caractéristiques, il faut passer par la fluorescence qui permet de visualiser des cellules à plus forte densité, des compartiments cellulaires, des mécanismes, des activités ou encore des protéines de manière sélective.

5.2.2. La fluorescence

Différentes méthodes de marquages fluorescents existent, elles sont dépendantes de la cible à marquer. Les principales méthodes sont : les sondes fluorescentes, les protéines auto-fluorescentes (GFP), l'immunofluorescence et les quantums dots (QDots).

5.2.2.1. Les sondes fluorescentes

Les sondes fluorescentes sont des molécules organiques, qui présentent une spécificité de marquage pour un compartiment cellulaire ou une molécule donnée (Abraham *et al.,* 2004). Les sondes qui marquent le noyau sont des agents qui interagissent avec l'ADN, avec une sélectivité pour certains nucléotides (A-T, C-G). Il existe une grande palette de sondes fluorescentes qui marquent l'ADN, certaines sont membranes perméantes et d'autres pas. Cette propriété est utilisée pour différencier les cellules mortes des cellules vivantes. En effet, une cellule morte ou endommagée ne présente plus d'intégrité membranaire, les marqueurs non membranes perméants vont alors pouvoir passer et aller se fixer sur l'ADN. Pour certains marqueurs (Bromure d'Ethidium, Orange acridine, etc…), la fixation sur le sillon majeur de l'ADN provoque des mutations, ce qui conduit la cellule vers une mort cellulaire, plus ou moins rapide selon les dommages provoqués (Johnson *et al.,* 2003 ; Ohta *et al.,* 2001). Les sondes qui marquent les mitochondries détectent les variations du potentiel de membrane des mitochondries ($\Delta\Psi m$). Le potentiel de membrane est le résultat de mouvements ioniques transmembranaires où la distribution des ions et macromolécules chargées est inégale de part et d'autre de la membrane. Chez les mitochondries, le potentiel de membrane est maintenu constant grâce aux transporteurs

actifs de type ATPase Na^+/K^+. Les variations de ce potentiel de membrane sont majoritairement provoquées par la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ce stress oxydatif, en faisant varier le potentiel de membrane mitochondrial va activer une voie de signalisation qui conduit à l'apoptose de la cellule. Les nombreux marqueurs du ΔΨm, marquent à un niveau basal les mitochondries, cette fluorescence augmente en cas de variation du ΔΨm. L'absence de marquage témoigne d'une absence d'activité des transporteurs Na^+/K^+, et donc d'une mort cellulaire, puisque ces transporteurs sont constamment actifs lorsque la cellule est vivante. Certains marqueurs des mitochondries, lorsqu'ils sont utilisés à plus forte concentration (que celle nécessaire au marquage des mitochondries) peuvent également marquer le Réticulum Endoplasmique ainsi que l'appareil de Golgi (Waters 2007 ; Horobin *et al.,* 2013). Pour ces compartiments cellulaires, des marqueurs spécifiques existent. Enfin d'autres marqueurs sont rendus fluorescents lors de la rencontre avec des ions, cations ou pH approprié (Schmolze *et al.,* 2011).

Tous ces marqueurs renseignent sur l'état de la cellule. Les sondes fluorescentes sont utilisables sur tout type de cellules (primaire, lignée). Elles peuvent être introduites directement dans le milieu de culture et être employées pour du marquage en « time lapse », avec comme limitation : le « bleaching » (perte de marquage au cours du temps), le « quenching » (perte brutale du marquage due à une forte exposition), l'apparition de photo-toxicité (toxicité induite par le marqueur après excitation de celui-ci) ou de toxicité du marqueur selon la concentration choisie (Waters 2007).

5.2.2.2. Les protéines auto-fluorescentes

Les protéines auto-fluorescentes (PF) sont exprimées par la cellule (lignée) une fois que le gène codant pour cette protéine a été introduit dans le génome par mutagenèse dirigée. Placée dans le génome avec le gène codant pour la protéine que l'on cherche à observer, la PF permet de suivre la production de celle-ci (Iverson *et al.,* 2011). La PF peut également être utilisée comme simple marqueur de viabilité lorsqu'elle est transfectée dans le génome. Si elle est présente dans la cellule, c'est que celle-ci possède toujours son ADN intact, en tout cas la partie codant pour la PF. Il existe toute une famille de protéines auto-fluorescentes (figure 11), toutes issues de la GFP (green fluorescent protein) : observable dans le vert, la BFP émet dans le bleu, la CFP émet dans le cyan, et l'YFP émet dans le jaune.

L'EGFP est très proche de la GFP, elle émet aussi dans le vert mais elle présente l'avantage d'être plus stable et moins photosensible (évite le « bleaching »).

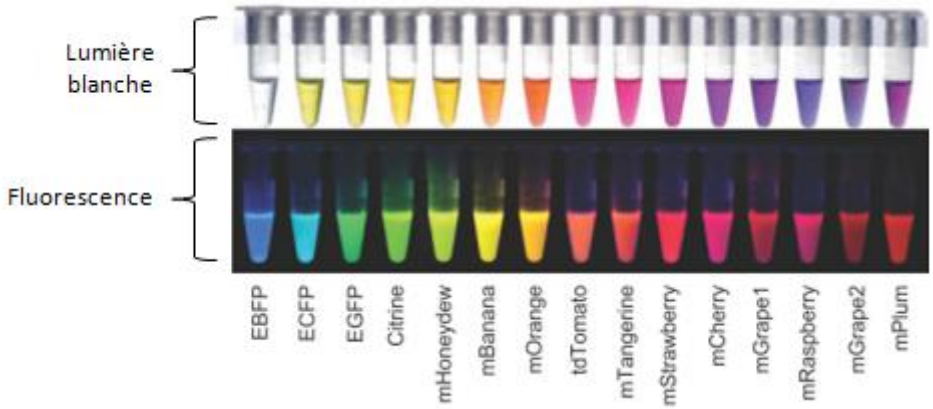


Figure 11 : Protéines auto-fluorescentes observées dans le visible et avec une lampe fluorescente (adapté de Wang *et al.,* 2008).

Cependant leur taille limite leur utilisation puisqu'elles font environ 3,5nm. Les autres limites à leur utilisation sont le fait que la GFP est photosensible, si l'intensité fluorescente envoyée est trop importante, la GFP va s'éteindre (bleaching, quenching). De plus, la PF est introduite dans le génome d'une cellule de manière artificielle, cette manipulation n'est pas stable dans le temps : en effet le gène codant pour la PF va être reconnu par la cellule comme ne lui appartenant pas, tout un système de réparation de génome de la cellule et d'exclusion de ce gène va être mis en place (Hazama *et al.,* 2012 ; Khan *et al.,* 2013 ; Wang *et al*., 2008).

5.2.2.3. L'immunofluorescence

L'immunofluorescence consiste à utiliser des anticorps dirigés contre la molécule ou protéine d'intérêt. L'anticorps primaire se fixe à la molécule puis un second anticorps sur lequel a été greffée une molécule fluorescente (la plupart du temps de la Rhodamine) va se fixer sur le premier anticorps. Les molécules fluorescentes employées peuvent aussi bien être des protéines auto-fluorescentes (voir paragraphe 5.2.2.2) ou des sondes fluorescentes (voir paragraphes 5.2.2.1). Cette technique utilisée pour du marquage intracellulaire nécessite plusieurs étapes de fixation et de nettoyage pour que la fluorescence observée soit vraiment spécifique de l'élément recherché (Bhadriraju *et al.,* 2007). Il est fortement conseillé d'utiliser une culture cellulaire fixée afin de garantir une qualité d'image

importante mais surtout de réaliser un certain nombre de contrôles (positifs, négatifs) pour s'assurer de la spécificité de marquage. L'échantillon obtenu peut être observé au microscope confocal. Cette méthode présente une grande spécificité de marquage, mais n'est pas adaptée à l'étude de culture en temps réel (Ahmed *et al.,* 2008).

5.2.2.4. Les Quantoms Dots

Les Quantums Dots sont des nano-cristaux de Sélénium de Cadmium (CdSe) et de Sélénium de Zinc (ZnSe). Ils ont des dimensions plus petites que le rayon de Bohr, soit inférieur à 10nm. Ce confinement quantique conduit à des propriétés optiques et électroniques particulières : plus la particule est petite, plus la lumière sera absorbée à une longueur d'onde petite (de plus forte énergie) (figure 12). Il y aura émission de lumière à des longueurs d'onde plus courtes. Des couches supplémentaires par le biais de coating au PEG (polyéthylène glycol) par exemple peuvent être ajoutées pour améliorer la solubilité des QD. Il est également possible d'y greffer des ligands, ou des anticorps qui vont se fixer sur la molécule recherchée. Cette capacité offre de nombreuses stratégies de marquage en utilisant la spécificité de reconnaissance anticorps/antigène ou enzymes/substrat. Dans ce cas, les QDots fonctionnent de la même manière que l'immunofluorescence sauf qu'au lieu d'utiliser une sonde chimique, les QDots sont la source le fluorescence (Howarth *et al.,* 2005 ; Rieger *et al.,* 2005 ; Nechyporuk-Zloy *et al.,* 2008).

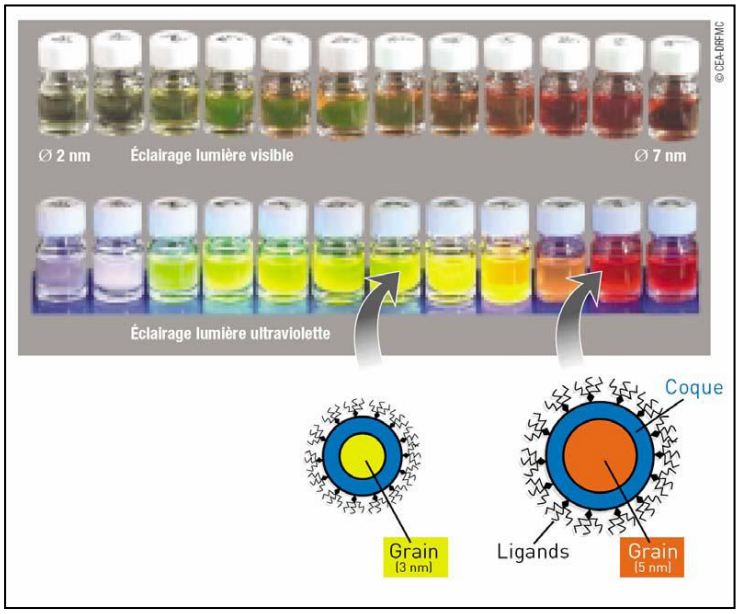


Figure 12 : Les Quantums Dots (source : Charpentier 2009).

Les Qdots présentent l'avantage d'être photo-stables contrairement à de nombreuses sondes fluorescentes et ne présentent aucune photo-toxicité. Cependant, de par leur très faible taille, ils peuvent se retrouver à l'intérieur de la cellule par endocytose et l'accumulation de ces molécules dans la cellule peut à termes lui être néfaste (Rees *et al.,* 2012). Il a également été prouvé que les QDots et en particulier le cadmium qui les compose sont toxiques pour les cellules. Le cadmium provoque la production de ROS et engage les cellules vers une mort programmée (Cho *et al.,* 2007 ; Gagné *et al.,* 2008 ; Liu *et al.,* 2011). Afin de pallier ce problème, l'encapsulation ou recouvrement de ces QDots dans un matériau biocompatible et n'altérant pas ses propriétés optiques a été mis au point récemment (Galloway *et al.,* 2011 ; Ju *et al.,* 2013).

Un bilan des avantages et inconvénients propres aux différents systèmes fluorescents est présenté dans le tableau 4.

Système fluorescent	Fonctionnement	Avantages	Inconvénients
Sondes fluorescentes	marque un compartiment cellulaire ou une activité	très grande gamme de marqueurs	instable dans le temps (quenching, bleaching, saturation)
		simple d'utilisation	
		peu couteux	possible toxicité et interaction avec des protéines
		utilisable sur cellules vivantes en time-lapse	modification de la réponse cellulaire
Protéines Auto-fluorescentes (GFP)	transfection qui permet l'expression par la cellule , elle permet de cibler une protéine définie	très spécifique (couplé à la molécule d'intérêt)	nécessite des cellules transfectées (loin des conditions physiologiques)
		facilement quantifiable	pas facile d'accès
		non toxique	sensible à l'exposition (quenching)
		utilisable en time-lapse	modification possible de la protéine d'intérêt
Immunofluorescence (intracellulaire)	utilisation d'anticorps qui vont reconnaitre spécifiquement l'antigène	très spécifique (utilisation d'anticorps)	nécessite une fixation donc non utilisable en time-lapse
		multiple marquage possible	risque de signal non spécifique
		recul méthodologique	couteux
Quantums Dots	seul permet de détecter les cellules capables d'endocytose, couplé permet de détecter des sites spécifiques	photostable (pas de bleaching ni quenching)	toxique
		mutiplicité des stratégies de détection lorsque couplé	couteux
		large palette de couleurs	si utilisé couplé même problèmes que pour l'immunofluorescence

Tableau 4 : Représentation des différentes méthodes de marquage fluorescent, leur fonctionnement, avantages et inconvénients.

5.3. Les logiciels de traitement d'images

Afin d'obtenir, à partir des images, des données quantitatives, différents logiciels d'imagerie peuvent être employés. Parmi les logiciels, une distinction peut être faite entre les logiciels génériques de type Matlab, ImageJ et les logiciels dédiés au traitement des images cellulaires comme CellProfiler, TimeLapseAnalyser (Giedt *et al.,* 2012 ; Carmona *et al.,* 2007 ; Pool *et al.,* 2007 ; Huth *et al.,* 2011). Certains, entièrement dédiés à l'analyse d'image sont « open-source » et sont facilement manipulables par des biologistes, c'est le cas de CellProfiler et d'ImageJ. Les autres logiciels comme Matlab sont des grosses plateformes de programmation, calcul et visualisation ; beaucoup plus poussés que les autres, ils nécessitent une formation ou tout du moins de connaitre et maitriser le langage employé (Norton *et al.,* 2009). Il existe également des logiciels payant directement intégrés au microscope (type Leica, Zeiss), mais qui offrent des possibilités relativement limités. Les résultats obtenus avec ces logiciels sont directement dépendants de la qualité de l'image et de la fluorescence. Il est indispensable en raison de la quantité de données à traiter, d'automatiser les étapes de traitement nécessaires à l'obtention d'informations. Ces étapes sont représentées dans la figure 13.

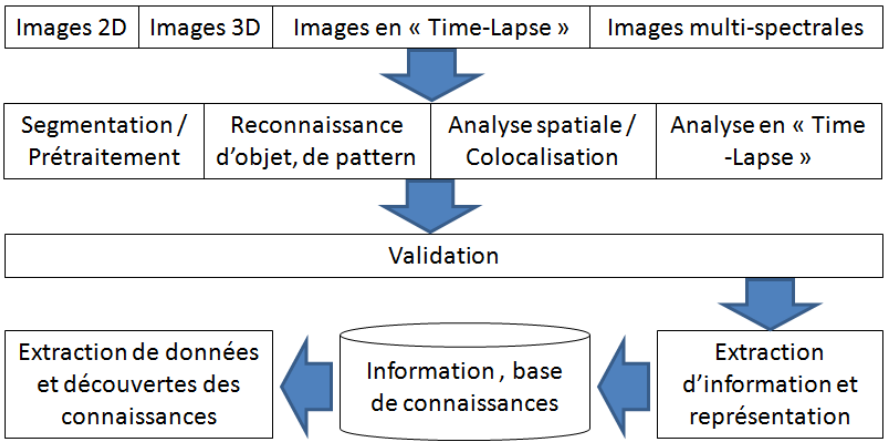


Figure 13 : Etapes de traitement nécessaires à l'extraction d'informations (adaptée de Ahmed *et al.,* 2008)

Les images en « time-lapse » correspondent à une séquence d'images majoritairement 2D qui sont réalisées à des intervalles de temps définis par l'expérimentateur, ce qui permet de suivre l'évolution d'une population cellulaire au cours du temps. Les images multi-spectrales correspondent à des images d'une culture cellulaire

sur laquelle des marquages de différentes couleurs et donc de différents spectres ont été réalisés. Les étapes de traitement de ces images par le logiciel permettent, via l'utilisation d'algorithmes, de segmenter, de prétraiter les pixels de l'image afin de reconnaitre des éléments, objet, pattern ou de mesurer une intensité de fluorescence. Des analyses spatiales ou en « time-lapse » peuvent également être réalisées selon le type d'images et de données attendues. Après validation, les informations extraites sont comparées aux bases de connaissances (ou bases de données) afin d'en extraire des données pertinentes.

5.4. Caractéristiques recherchées

Selon l'étude réalisée, différentes caractéristiques peuvent être recherchées. Comme vu précédemment, il est possible de suivre l'évolution des cellules, leur déplacement et division au cours du temps (tracking) que ce soit en contraste de phase ou à l'aide de la fluorescence. Mais d'autres informations peuvent également être récupérées comme la morphologie de la cellule : sa taille, sa forme, sa texture (Terryn *et al.,* 2008 ; Huth *et al.,* 2011 ; Meijering *et al.,* 2012 ; Neumann *et al.,* 2006). La fluorescence permet de mesurer une intensité de marquage qui peut témoigner d'une quantité d'éléments recherchés ou de l'activité de ces éléments. La fluorescence est largement utilisée en HCS (High Content Screening) pour des études (entre autres) de toxicité, où les caractéristiques recherchées sont : le dénombrement afin d'observer la toxicité en cas de diminution du nombre de cellules vivantes, l'apoptose témoin d'une mort cellulaire, d'induction de gènes ou d'activités enzymatiques induite par le produit toxique (Perlman *et al.,* 2006 ; Kim *et al.,* 2012 ; Xu *et al.,* 2008 ; Donato *et al.,* 2012).

6. Imagerie en « time-lapse » et biopuces microfluidiques

Combiner la culture en biopuces microfluidiques avec la technique d'imagerie en « time-lapse » est une avancée technologique intéressante, qui permet l'obtention d'informations au cours du temps sans dégradation de l'échantillon.

Le HCS emploie déjà l'imagerie en « time lapse » pour la culture cellulaire en plaques 96 puits. Cette méthode a permis de tester la toxicité de nombreuses molécules (Kim *et al.,* 2012 ; Xu *et al.,* 2008 ; Donato *et al.,* 2012). L'utilisation de certaines sondes fluorescentes en HCS permet déjà d'appréhender les possibilités de marquage sur une étude au cours du temps (time lapse) en biopuce microfluidique. Ainsi certaines équipes utilisent le Hoechst

33342 durant 8 h et 12 h, afin de marquer les noyaux des cellules observées. D'autres sondes marquant les ΔΨm ont également été employées comme le TMRE (Tetramethylrhodamine Ethyl Ester) et le $DiOC_6(3)$ (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide) (Burguillos *et al.,* 2011 ; Lukandu *et al.,* 2009). L'Oregon green 488 BAPTA-1 dextran révéle des variations de concentration de Ca^{2+} intracellulaire. Le RedFlica™ marque les caspases 3 et 7 impliqué dans l'apoptose. Ces sondes fluorescentes ont également été utilisés en analyse en « time-lapse » (Harada *et al.,* 2007 ; Burguillos *et al.,* 2011).

L'apparition récente (moins de 10 ans) de microscopes incluant un incubateur spécifique à la culture cellulaire (figure 14), a rendu l'analyse en « time-lapse » accessible aux autres systèmes et en particulier aux biopuces microfluidiques. Mais les publications dans ce domaine restent encore très limitées.

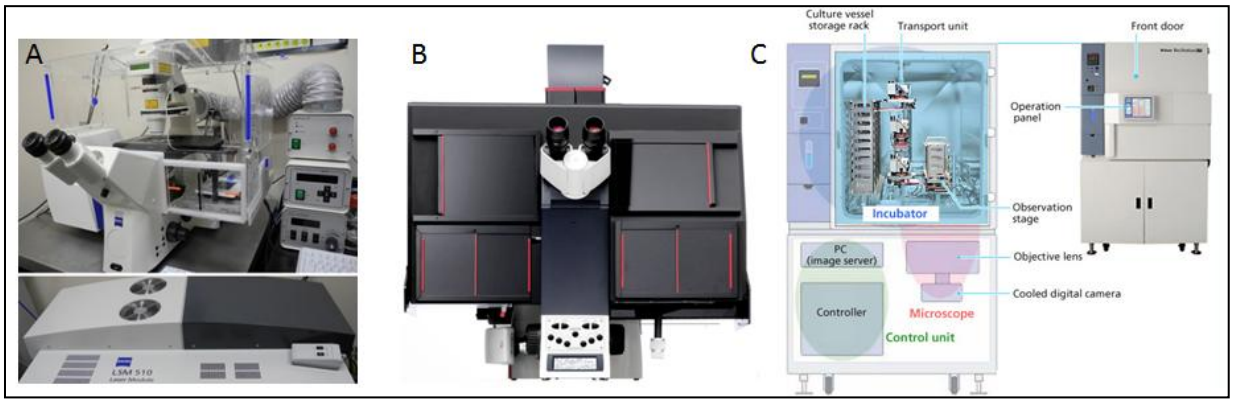


Figure 14 : Exemple de microscope inversé à incubateur intégré : (A) Zeiss, (B) Leica, et (C) incubateur contenant un microscope inversé de chez Nikon.

L'équipe de Burgess a utilisé l'imagerie en temps réel pour visualiser la réplication cellulaire. Ils ont réalisé un GFP-tag sur la PCNA (Proliferating Cell Number Antigen) : élément essentiel nécessaire à la formation des usines de réplication dans le noyau. Ce marquage permet de visualiser les zones de réplication de l'ADN, mais surtout d'identifier le taux de réplication et donc de suivre les différentes phases du cycle cellulaire (figure 15). Les chercheurs ont utilisé pour la prise d'image au cours du temps un microscope confocal Zeiss LSM780 avec lequel, ils ont pris des images en 4D (x, y, z et t). Des images ont été prises toutes les 5 min pendant 16 h. Le traitement de ces données a été effectué par le logiciel Imaris (v7.32, Bitplane). Les points présents sur une image correspondent à la molécule PCNA marquée par la GFP. Ainsi pour chaque cellule, ils ont recherché le nombre de

molécules PCNA présentes ; ce nombre est directement corrélable avec une phase du cycle cellulaire (Burgess *et al.,* 2012).

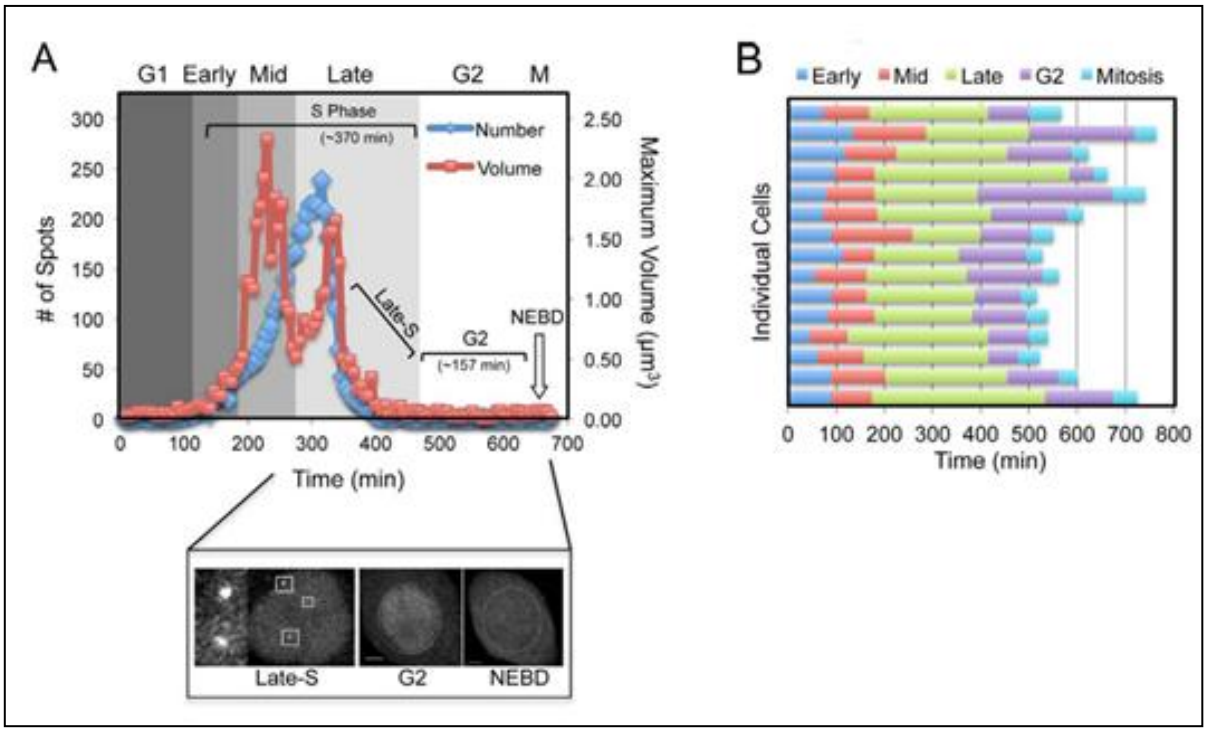


Figure 15 : Quantification de données d'imagerie en temps réel. (A) Compilation des points observés pour une cellule au court du temps. Les variations du nombre de point permettent de déterminer dans quelle phase du cycle cellulaire se trouve la cellule. (B) Le graphique représente pour 15 cellules la durée des différentes phases du cycle cellulaire (Burgess *et al.,* 2012).

Le système microfluidique µCCA (déjà évoqué en 4.2.3), mis au point par Oh et son équipe, présente différents compartiments, dont un hépatique (figure 16A). Pour leur étude par imagerie, ils disposent d'un système de détection qui leur est propre (figure 16B), et du logiciel de traitement d'images : CellProfiler. Comme source de fluorescence lors de cette étude, ils ont employé l'H2B-EGFP. Le gène codant pour l'EGFP : protéine auto-fluorescente, est introduit dans le génome des HepG2/C3A en amont du gène codant pour l'histone H2B. Cette molécule : la H2B, est impliquée dans la condensation de l'ADN, elle se trouve donc dans le noyau de la cellule. L'absence de fluorescence et donc d'H2B témoigne d'une forte dégradation de l'ADN : la cellule est morte. Dans leur étude, ils ont testé l'impact de l'éthanol à différentes concentrations sur la culture cellulaire d'HepG2/C3A sur 90 min (figure 16C) (Oh *et al.,* 2011). Les cellules traitées avec 5 % d'éthanol semblent moins

fluorescentes et moins nombreuses après 90 min de traitement. Les cellules traitées avec 10 et 20 % d'éthanol sont beaucoup moins nombreuses dès 60 min de traitement.

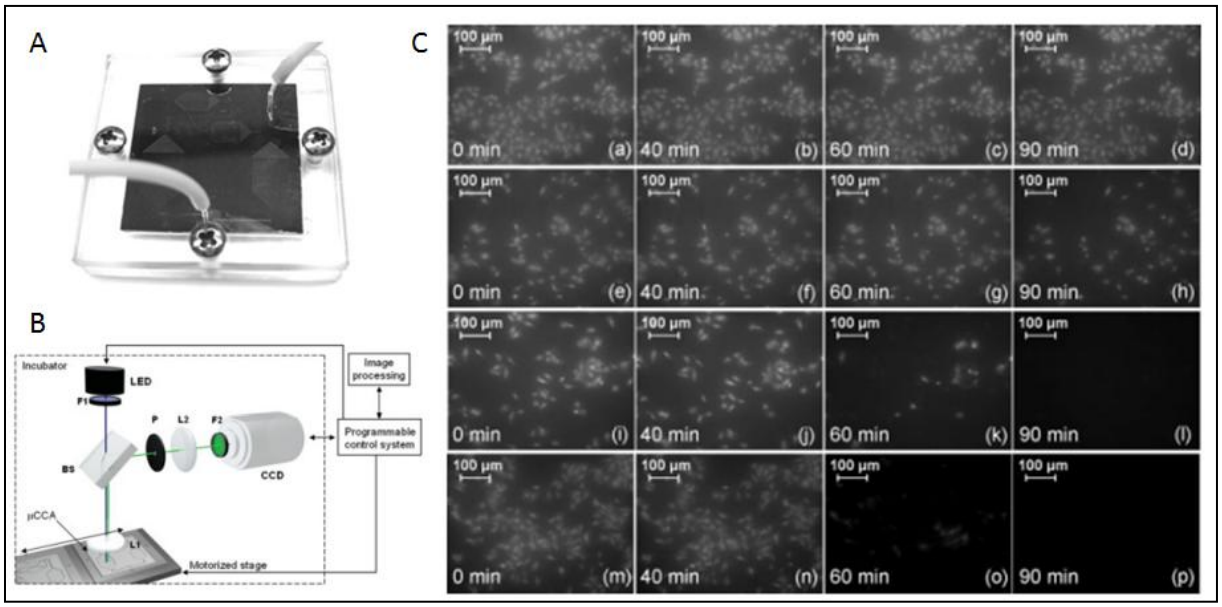


Figure 16 : Présentation du système μCCA. (A) Système μCCA comprenant 4 compartiments dédiés à la culture cellulaire et les tubes d'entrée et sortie du système. (B) Vue d'ensemble du système de détection (F1: filtre d'excitation, F2: filtre d'émission, L1, lentille d'imagerie, L2: lentille de relais, P: trou d'épingle, et BS: diviseur de faisceau). Les lignes continues bleues et vertes représentent un faisceau d'excitation et d'émission, respectivement. (C) Images de fluorescence des cellules HepG2/C3A exposées à EtOH à une concentration de 0 % (de a à d), 5 % (de e à h), 10 % (de i à l) et 20 % (de m à p) (Oh *et al.,* 2011).

Albrecht et son équipe, ont mis au point un système en PDMS de culture en dynamique de cellules avec une analyse en « time-lapse » par imagerie (figure 17). Les cellules utilisées expriment l'H2B-EYFP ainsi que l'EYFP-tubuline, avec pour but d'identifier le noyau cellulaire ainsi que les tubulines : protéines structurelles des microtubules indispensable à la mitose. Les événements mitotiques sont visualisés grâce à des objectifs appropriés. Les cellules sont ensuite mises en contact avec du Nocodazole : agent antimitotique, afin d'observer les perturbations provoquées. Le dispositif employé pour cette étude est un Nikon Ti Eclipse avec incubateur intégré (Albrecht *et al.,* 2010).

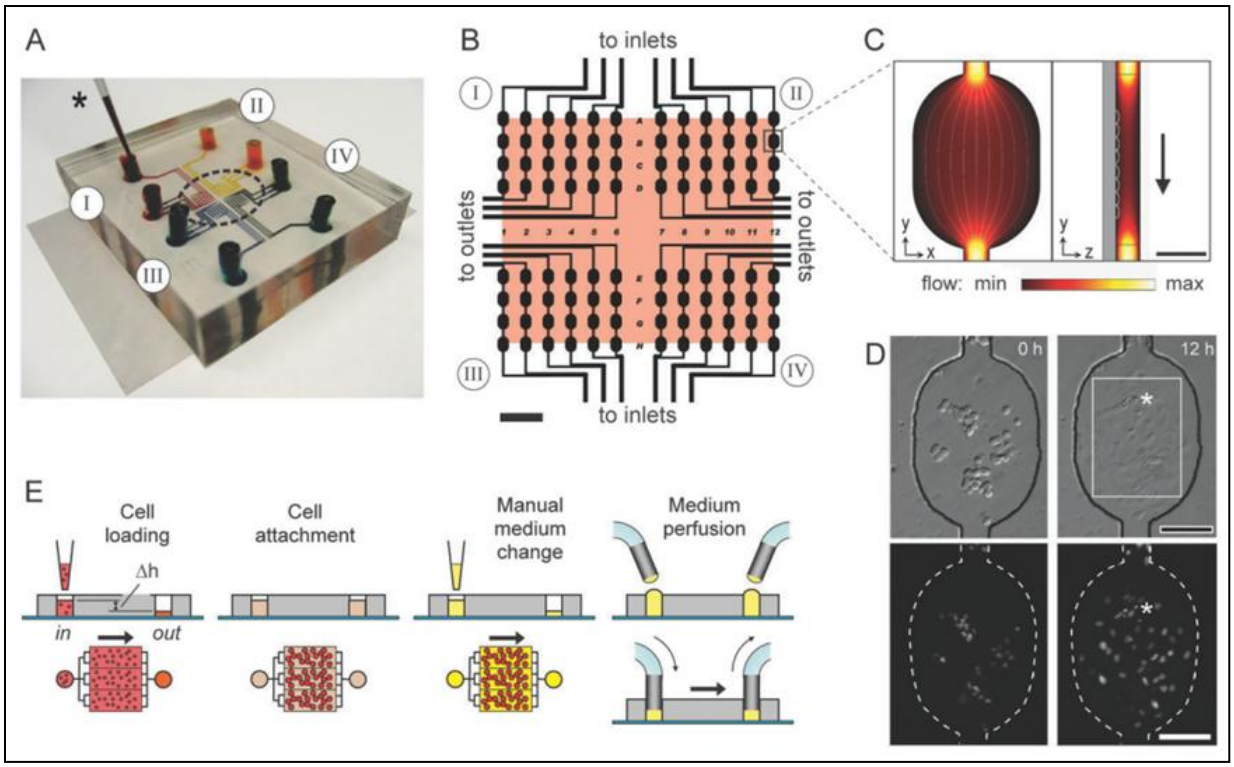


Figure 17 : Système microfluidique adapté à l'analyse par imagerie. (A) Présentation du système comprenant 4 zones de culture séparées. (B, C) Le microsystème est composé de canaux et de chambre où sont observées les cellules par microscopie (D). (E) Protocole d'ensemencement et de culture en dynamique des cellules (Albrecht *et al.*, 2010).

Ces travaux sont tous fondés sur l'utilisation de protéines auto-fluorescentes, ils n'utilisent qu'une source spectrale alors que deux autres (utilisation du système RGB : Red Green Blue) sont encore accessibles. L'absence d'utilisation des autres systèmes fluorescents tels que les sondes fluorescentes ou les QDots peut poser questions. La photo-toxicité des sondes fluorescentes et la toxicité des QDots pourraient ne pas être négligeables ?

Malgré le potentiel évoqué précédemment, l'analyse par imagerie de culture en système microfluidique semble se développer lentement du fait des nombreux verrous scientifiques et techniques encore présents, que ce soit pour la partie imagerie ou pour la culture microfluidique. Il faut surtout prendre en compte le fait que ces deux technologies sont récentes et évoluent continuellement. De plus, le développement de ces outils requiert la collaboration de chercheurs présentant des compétences différentes : programmation, traitement d'images, représentation des connaissances, base de données, et biologie. Le développement de ces approches multidisciplinaires permettra une meilleure

compréhension du comportement cellulaire et des améliorations dans la découverte de médicaments, et dans l'élaboration de diagnostics thérapeutiques.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

1. Microfabrication du microsystème

1.1. Le Polydiméthylsiloxane

Les microsystèmes utilisés au laboratoire sont fabriqués avec un polymère : le polydiméthylsiloxane aussi appelé PDMS. Ce silicone, très utilisé en micro-fabrication, permet de construire rapidement des pièces micro-structurées à l'échelle du micron (Anderson *et al.,* 2000 ; Linder *et al.,* 2003). La faible énergie de surface et l'élasticité de ce silicone permettent un démoulage facile sans détérioration du moule ou de la pièce moulée. Les atomes de silicium et groupements méthyles qui constituent sa formulation chimique lui permettent un collage (bonding) réversible ou irréversible sur le verre, le silicium ou sur lui-même (Li and Chen 2003). Le collage irréversible nécessite au préalable une activation de surface par plasma à oxygène (Duffy *et al.,* 1998). Stable entre –115°C et 350°C, le PDMS est stérilisable par autoclave. Transparent et perméable à l'oxygène il s'avère idéal pour produire des outils et microsystèmes appliqués à la biologie et en particulier à la culture cellulaire. La flexibilité, la mobilité de la chaîne siloxane et les très faibles interactions moléculaires font du PDMS un matériau souple diminuant ainsi le stress tissulaire. Cependant, la faible tension de surface (24 mN/m) diminue l'adhésion moléculaire et cellulaire (Briquet *et al.,* 1996). Celle-ci est généralement contourné avec un traitement de surface par dépôt de matrice extracellulaire. La première étape de fabrication du microsystème consiste en la fabrication d'un moule réutilisable plusieurs fois (Ziaie *et al.,* 2004).

1.2. Procédé de fabrication du moule

La géométrie de la biopuce est préalablement conçue par ordinateur et transcrite sur un papier transparent utilisé comme photo-masque dans l'étape de photolithographie. Cette géométrie, développée au laboratoire par Eric Leclerc a été breveté sous le N°0954288-2009-Demande Française. Elle est conçue de manière à assurer un écoulement uniforme du milieu de culture à l'intérieur de la biopuce permettant ainsi aux cellules de s'étaler, se propager et proliférer jusqu'à confluence.

Les moules utilisés pour fabriquer les biopuces ont été fabriqués par Vincent Senez et Thomas Dargent de l'UMR CNRS 8520 : Institut d'électronique, de microélectronique et de nanotechnologie (IEMN). Le protocole de base s'appuie sur de la photolithographie classique (voir figure 18). La résine de type SU-8 série 2100 photosensible est étalée en fine couche sur une plaque de Silicium (wafer) par tournette (spin coater) à vitesse et durée contrôlées afin d'obtenir une épaisseur choisie. La résine est ensuite chauffée à 65°C pendant 10 minutes afin de relâcher les contraintes mécaniques (étape de Softbake). Puis les solvants contenus dans la résine sont éliminés par évaporation en exposant la plaque à une température de 95°C pendant 30 minutes (①). Le photo-masque est ensuite disposé au dessus de la résine, et une insolation par rayonnement ultra-violets (de l'ordre 10,1 mJ/cm^2 à 365 nm) est imposée pendant une durée de 60 secondes (②). Les zones illuminées (non protégées par le photo-masque) vont permettre la réticulation de la résine. Les étapes précédentes sont répétées une seconde fois afin de réaliser une seconde photolithographie avec un second photo-masque (③, ④). Cette seconde lithographie permet de dégager les microstructures au fond de la biopuce (⑤). Ensuite, la résine est de nouveau chauffée à 65°C pendant 5 minutes puis à 95°C pendant 15 minutes pour catalyser la réticulation (étape de Post-exposure bake). Un bain de 15-20 minutes de développeur (PM acétate) sous agitation est utilisé pour dissoudre la partie de la résine non polymérisée. Une solution d'isopropanol est utilisée pour inhiber le développeur et rincer le moule (⑥). Celui-ci est ensuite séché à l'azote et recouvert d'une fine couche de PDMS pour le protéger des agressions extérieures.

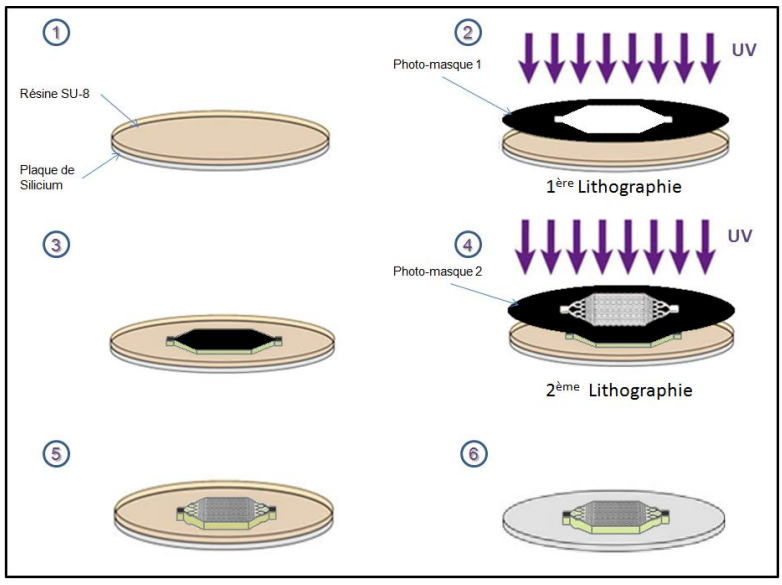


Figure 18 : Protocole de fabrication du moule de la réplique inférieure microstructurée.

1.3. Description et assemblage du microsystème

Le microsystème est fabriqué au laboratoire. Il est constitué de deux éléments en PDMS : une réplique supérieure non microstructurée et une inférieure microstructurée (figure 19,①et②). Pour mouler les répliques, le PDMS (Sylgard 184 Kit, Dow Corning, France) sous forme liquide est mélangé avec de l'agent réticulant dans un rapport 10/1 en masse. Le mélange est ensuite dégazé, puis 3 g de PDMS est coulé dans le moule correspondant à la réplique inférieure et 4 g dans le moule correspondant à la réplique supérieure (③et④). Les deux moules sont de nouveau dégazés. Lorsque plus aucune bulle d'air n'est visible, ils sont placés dans un four à 75°C pendant 2 heures. Les répliques sont ensuite démoulées (⑤,⑥). Des trous de 2 mm de diamètre sont percés sur la réplique supérieure en entrée et en sortie du microsystème pour permettre l'introduction des connectiques qui permettront l'entrée et la sortie des fluides dans la biopuce (⑦). L'assemblage de la biopuce est réalisé par superposition de la réplique supérieure et inférieure préalablement activées par oxydation grâce à un plasma à oxygène (Expanded Plasma Cleaner, Harrick USA) pendant 30 secondes. La zone activée devient hydrophile, elle présente des groupements hydroxyles à sa surface qui permet un collage irréversible par liaison covalente (Si-O-Si) des deux répliques (⑧). La biopuce est ensuite placée dans un four à 75°C pendant 1 h. Deux tuyaux en silicone (Silclear Tubing, taille 0.040˝x 0.085˝, Degania Silicone, France) sont introduits dans les trous d'entrée et de sortie de la face supérieure (⑨). Une goutte de PDMS est déposée autour des tuyaux afin de permettre le scellage hermétique et permanent. La biopuce est replacée au four à 75°C pendant 2 h. Des connecteurs en polypropylène (Luer femelle Ø 1,6mm, Cole Farmer, France) sont introduits dans les tuyaux d'entrée et de sortie de la biopuce. Ils serviront d'interface avec une seringue ou un circuit de perfusion. Pour une meilleure qualité d'image, les biopuces ont été adaptées à une observation sous microscope. Elles sont collées à des lamelles de verre par traitement au plasma à oxygène pendant 1 min, puis placé au four à 75°C pendant 1 h.

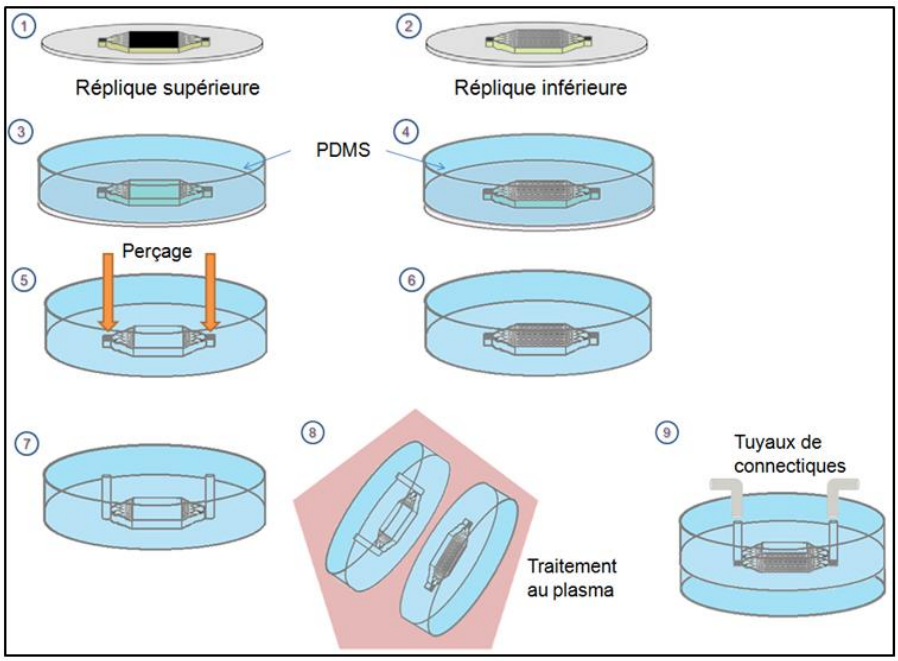


Figure 19 : Procédé de fabrication d'un microsystème en PDMS.

La biopuce permet la culture de cellules sur une surface d'environ 1,95 cm^2. Elle est constituée de canaux de distribution du milieu de culture en entrée et en sortie, mais la partie la plus importante est composée de micro-canaux de 1050 µm de long et de micro-chambres de 520 sur 510 µm (figure 20). Ces microchambres sont des zones d'observations privilégiées. L'ensemble de la surface de culture de la biopuce contient 9 chambres sur chacune des 15 lignes, la biopuce est donc composée de 135 chambres. Les chambres sont séparées les unes des autres par des micro-canaux : 8 par ligne. Le volume de culture au sein de la biopuce est de 45 µL.

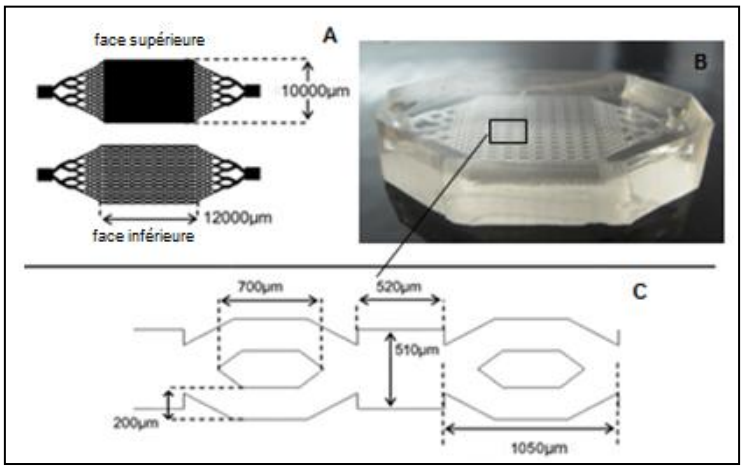


Figure 20 : Caractéristiques géométriques de la biopuce. Géométrie de la face supérieure et inférieure (A). Vue globale d'une biopuce en PDMS sans tuyaux (B). Dimensions des micro-structures (chambres et canaux) constituants la biopuce (C).

1.4. Nettoyage de la biopuce

Avant chaque utilisation la biopuce est nettoyée et stérilisée. Du SDS 2 % est introduit par le biais de seringue à l'intérieur de la biopuce pendant 1 heure. Puis 3 rinçages consécutifs sont réalisés avec de l'eau permuté. Après 1 heure d'attente avec la biopuce remplie d'eau, 3 autres rinçages consécutifs ont lieu. La biopuce est laissée vide puis 15 min plus tard, 3 derniers rinçages ont lieu avec de l'eau permutée. La biopuce est placée au four à 37°C pour sécher, puis elle est stérilisée par autoclave.

2. Fabrication du circuit de perfusion

Le circuit de perfusion permet l'acheminement du milieu de culture à la biopuce. Il est constitué d'une trappe à bulle fabriquée sur mesure (Medicolab, France) qui sert également de réservoir à milieu de culture d'une contenance de 2 mL, de tuyaux de silicone (tuyaux silicone peroxyde 1 x 3 mm, VWR, France) de part et d'autre de la trappe à bulle, d'un tuyau de silicone (tuyau silicone 2 arrets 0,64 mm, Cole Farmer, France), adapté à la fixation sur une pompe péristaltique (Minipuls, Gilson, France) ainsi que de deux connecteurs en polypropylène pour permettre le raccord avec la biopuce (Luer lock mâle Ø 1,6 mm, Cole Farmer, France) (figure 21). Le volume global est de 3,5 mL.

Après chaque utilisation, le circuit est nettoyé et stérilisé. Les connecteurs sont retirés et placés dans de l'eau de javel diluée pendant 2 h puis rincés plusieurs fois à l'eau permuté. Pendant ce temps, le circuit est rincé avec 250 mL d'eau de javel diluée à 1 %, puis avec 1 L d'eau permutée. Le circuit est placé au four à 37°C pour sécher, puis il est stérilisé par autoclave.

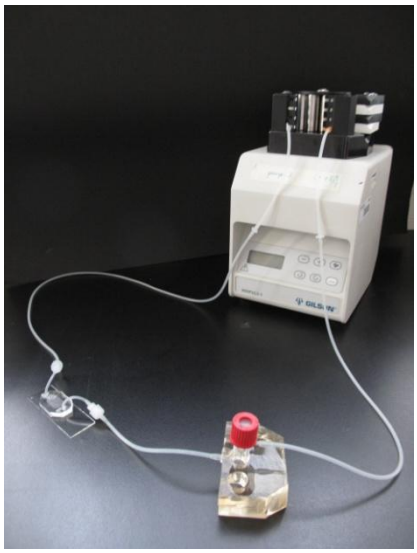


Figure 21 : Circuit de perfusion. Montage constitué d'une biopuce connectée à un circuit de perfusion et d'une trappe à bulle. Le circuit de perfusion est fixé sur une pompe péristaltique délivrant un débit constant.

3. Matériels biologiques et réactifs

3.1. Lignée HepG2/C3A

La lignée HepG2/C3A est un clone de la lignée HepG2 issu d'un hépatocarcinome humain (ATCC-CRL-10741, France). Elle présente une morphologie de type épithélial. Ces cellules sont adhérentes et ont été sélectionnées pour leurs capacités à produire de l'albumine, de l'alpha fétoprotéine (AFP) et leur capacité à se développer avec un milieu déficient en glucose. Elles ont également une proximité phénotypique avec les cellules hépatiques et un métabolisme azoté comparable au foie de rat perfusé.

Les cellules sont cultivées en milieu Minimal Essential Medium (MEM) Eagle sans rouge phènol (Pan Biotech GMbH, France) complémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (lot 41Q8302K, Gibco, France), 1 % HEPES (Gibco, France), 2 mM de L-glutamine (Gibco, France), 0,1 mM d'acides aminés non essentiels (Gibco, France), 1 mM de pyruvate de sodium (Gibco, France), 100 U/mL - 100µg/mL de pénicilline/streptomycine (Gibco, France) dans des flasques de 25 cm^2. Les cellules en flasques sont maintenues en incubateur à une température de 37°C et 5 % CO_2. Le milieu est renouvelé tous les deux jours. Elles sont utilisées pour les expériences lorsqu'elles sont à environ 80 % de confluence. Leur utilisation pour des expériences s'effectue entre les passages 10 et 30. Leur détachement est réalisé à

l'aide de trypsine-EDTA (0,25 %, 7 mM, Gibco, France) afin d'effectuer les passages ou l'ensemencement des microsystèmes et boites de Pétri.

Une banque de cryotubes de HepG2/C3A est constituée et conservée dans de l'azote liquide dans un milieu de culture complémenté et enrichi en sérum de veau fœtal à 30 % et en DMSO à 20%.

3.2. Marquages fluorescents des cellules

3.2.1. Marqueurs testés

Les marqueurs ont été testés en chambre LabTek® (Nunc, france) afin de visualiser différentes conditions en même temps. Avant observation sous microscope, les cellules sont incubées 30 min à l'obscurité avec du milieu de culture contenant le marqueur testé.

3.2.1.1. Marquage de viabilité cellulaire

Le Hoechst 33342 qui marque l'ADN et donc les noyaux, a pour spécificité spectrale : Ex 343 nm, Em 483 nm. Durant notre étude, le Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, France) a été testé à 1 ; 2 ; 5 et 10 µg/mL.

Pour déterminer le nombre de cellules vivantes : un marquage à la Calcein-AM a été réalisé à une concentration de 4 µM. La Calcein-AM (Invitrogen, France) présente un pic d'excitation à 495 nm et un pic d'émission 520 nm.

Pour déterminer le nombre de cellules mortes présentes, un marquage à l'éthidium homodimère (EthD-1) est réalisé. L'EthD-1 (Sigma-Aldrich, France) émet dans le rouge (Ex : 528, Em : 617nm) et est utilisé durant notre étude aux concentration suivantes : 400 nM ; 1 et 4 µM .

3.2.1.2. Marquage des mitochondries

Différentes sondes fluorescentes ont été testées pour marquer les mitochondries : Le $DiOC_6(3)$, le TMRE, et le Mitotracker® Green FM. Le $DiOC_6(3)$ (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide) est une sonde qui émet dans le vert (Ex : 478, Em : 495). Dans notre étude le $DiOC_6(3)$ (Sigma-Aldrich, France) a été testé à 40 ; 50 ; 60 et 100 nM. Le TMRE (Tetramethylrhodamine Ethyl Ester) émet dans l'orange/rouge (Ex : 549, Em : 574). Il est utilisé dans notre étude à 50

nM (Sigma-Aldrich, France). Le marqueur Mitotracker® Green FM (Invitrogen, France) émet dans le vert (Ex : 490, Em : 516) et est testé à 1 et 2 µM.

3.2.1.3. Marqueur du calcium intracellulaire

Le Fluo4-AM™ (Ex : 494 nm, Em : 506 nm) est une molécule qui augmente sa fluorescence lors d'une liaison avec un ion Ca^{2+}. Elle est membrane perméable est permet donc de visualiser la variation de calcium intracellulaire. Lors de l'étude, le Fluo4-AM (Invitrogen, France) a été employé aux concentrations de 2 ; 4 ; 6 et 8 µM.

3.2.1.4. Marquage d'apoptose

Pour mettre en évidence l'apoptose des cellules, un kit Red-FLICA™ (Immunochemistry, France) est testé. Il est basé sur l'utilisation d'un peptide couplé avec de la Sulforhodamine. Ce peptide est spécifiquement reconnu par les caspases 3 et 7 qui le clivent, libérant ainsi la rhodamine qui émet de la fluorescence dans le rouge (Ex : 560, Em : 586). De la staurosporine à 2 µM a été utilisée pour induire l'apoptose pendant 3h (comme préconisé par le fournisseur).

3.2.1.5. Marquage de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Le 6-Carboxy-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate, Di(Acetoxymethyl Ester) (Carboxy-DCFDA-2AM) a été employé à 10 µM (Invitrogen, France) afin de visualiser la production de ROS. Cette molécule abrégée CarboxyDCFDA-2AM, non fluorescente est convertie en une forme fluorescente verte (Ex : 495, Em : 527) lorsque les groupements acétates sont oxydés par l'activité des ROS.

3.2.2. Marqueurs utilisés pour les tests de caractérisation et de toxicité

Les Marqueurs utilisés lors de l'étude en biopuce et en boite de Pétri sont :

- le Hoechst 33342 (voir paragraphe 3.2.1.1), employé à une concentration de 2 µg/mL (3,56 µM). Sous microscope la sonde est détectée avec une exposition de 400 ms, une intensité de 5 et un gain fixé à 1.
- le DiOC6(3) (voir paragraphe 3.2.1.2) utilisé à 100 nM, permet de visualiser spécifiquement les mitochondries et non le réticulum endoplasmique ou

l'appareil de Golgi. Sous microscope, la sonde est détectée avec une exposition de 380 ms, une intensité de 5 et un gain fixé à 1,5.

- l'EthD-1 (voir paragraphe 3.2.1.1) a été employé à une concentration de 4 µM. Sous microscope la sonde est détectée avec une exposition de 320 ms, une intensité de 4 et un gain fixé à 1.

Ces trois marqueurs sont placés ensemble aux concentrations appropriées dans du milieu de culture complet afin d'être placé dans la biopuce ou la boite de Pétri au contact des cellules.

3.3. Molécule chimique testée : la Staurosporine

La staurosporine (STS) est un alcaloïde isolé d'une culture de *Streptomyces sp.* . C'est un inhibiteur de kinases (PKA, PKC, PKG, CAMKII et MLCK) à faible concentration (quelques nM). A plus forte concentration (0,2-2 µM), la STS induit l'apoptose ou la nécrose des cellules (Antonsson and Persson, 2009). C'est à cet effet qu'il est employé dans notre étude afin d'avoir un contrôle positif de la mortalité. La STS (Sigma-Aldrich, France) est solubilisée dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à une concentration de 1 mM puis filtrée et diluée lors de notre étude aux concentrations de 1 et 5 µM. Elle a été testée en biopuce microfluidique ainsi qu'en boite de Pétri suivant les protocoles expérimentaux développés dans les paragraphes 4.2 et 4.3.

4. Culture cellulaire

4.1. Plan expérimental

La culture cellulaire s'opère dans deux modèles : en microsystème (ou biopuce) et en boite de Pétri qui sert de contrôle. La différence entre ces deux systèmes réside dans la culture qui pour la biopuce se fait en dynamique, par le biais d'une pompe et d'un système de perfusion. Les cellules sont alimentées continuellement en milieu de culture. L'organisation expérimentale est schématisée sur la figure 22.

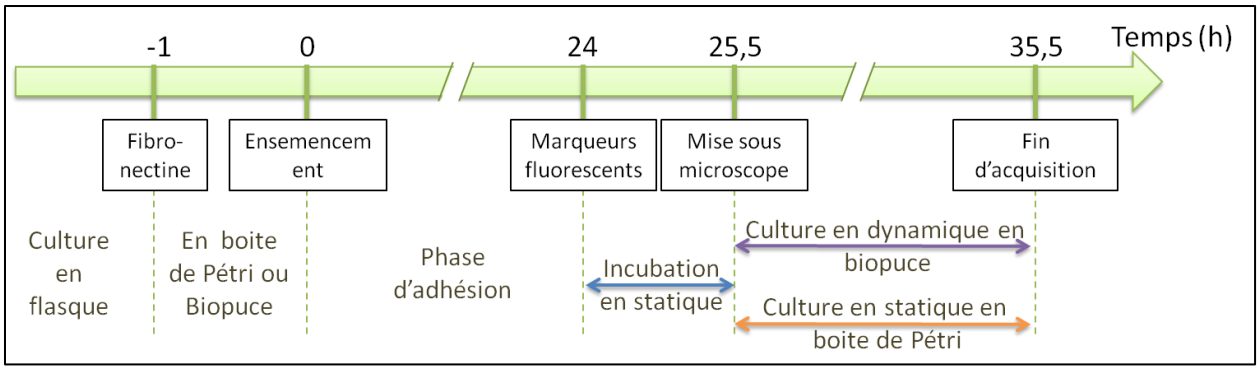


Figure 22 : Plan expérimental. Lors de la mise sous microscope les cellules en boites de Pétri sont cultivées en statique et celles en biopuces selon les expériences peuvent être cultivées en statiques ou en dynamique.

4.2. Mise en culture en microsystème

La mise en culture de cellules dans des microsystèmes en PDMS nécessite le dépôt d'une matrice extracellulaire pour pallier à l'hydrophobicité de ceux-ci. Une solution de fibronectine (Roche, France) à 10 µg/mL est donc introduite à l'aide de deux seringues 1 mL (Terumo, France) dans les microsystèmes qui sont ensuite incubés à 37°C et 5 % CO_2 pendant 1 h. Les microsystèmes sont ensuite rincés avec du milieu de culture. Les cellules cultivées en flasques T25 sont détachées par trypsinisation (voir paragraphe 3.1.) puis comptées sous lamelle de Malassez. L'ensemencement des systèmes se fait à une densité de 200 000 cellules par cm^2. Les biopuces sont ensuite placées à 37°C et 5 % CO_2 pendant 24 h pour permettre aux cellules d'adhérer aux microstructures. Après la phase d'adhésion, le microsystème est rincé deux fois avec du milieu de culture afin d'éliminer les cellules non adhérées. Le microsystème est ensuite rempli avec du milieu de culture contenant des sondes fluorescentes (voir paragraphe 3.2.) puis est placé à 37°C et 5 % CO_2 pendant 1 h 30. A l'issue de ce temps d'incubation, le circuit de perfusion branché à la pompe est rempli du même mélange (milieu de culture/sondes fluorescentes) que celui mis en contact avec les cellules. Le microsystème est connecté au circuit de perfusion, puis l'ensemble du montage est placé sous microscope. Le débit imposé par la pompe est fixé à 10 µL/min.

4.3. Mise en culture en boite de Pétri

Des analyses identiques à celles réalisées en biopuces sont menées en boites de Pétri de 6 cm de diamètre. Les boites sont recouvertes d'une solution de fibronectine à 10 µg/mL puis incubées à 37°C et 5 % CO_2 pendant 1 h. Elles sont rincées avec du milieu de culture,

puis encemencées à 130 000 et 200 000 cellules par cm^2. Les boites sont ensuite placées en incubateur à 37°C et 5 % CO_2 pendant 24 h (phase d'adhésion). Après deux rinçages de la boite de Pétri pour éliminer les cellules non adhérées, le milieu de culture est remplacé par un nouveau contenant les sondes fluorescentes (voir paragraphe 3.2), puis les boites sont incubées à 37°C et 5 % CO_2 pendant 1 h 30. Les boites de Pétri sont ensuite placées sous microscope pour analyse.

5. Analyses des cultures cellulaires sous microscope

Durant notre étude, l'analyse des cultures cellulaires se fait par imagerie. Pour ce faire, les biopuces ou boites de Pétri sont placées sous microscope avec incubateur intégré (DMI6000B, Leica) réglé à 37°C et 5 % CO_2 (figure 23).

Figure 23 : Microscope Leica DMI6000B avec incubateur intrégré permettant la culture d'hépatocytes en biopuces microfluidiques.

Ce microscope possède une caméra (DFC300FX, Leica), ainsi qu'un socle qui se déplace sur les trois axes (X, Y et Z) ce qui permet de prendre des images au cours du temps à différents endroits dans l'échantillon. Ainsi, durant notre étude, 6 positions différentes ont été prises en photo toutes les heures pendant 10 h. Les positions où les images sont prises dans les biopuces et les boites de Pétri sont représentées dans la figure 24. Les positions sélectionnées permettent de balayer l'ensemble de la biopuce. Les positions 1 et 6

correspondent à l'entrée de la biopuce. Les positions 2 et 5 représentent le milieu de la biopuce, et les positions 3 et 4 la sortie de la biopuce. La lampe fluorescente (EL6000, Léica) du microscope nous permet d'observer le marquage réalisé avec les différentes sondes fluorescentes. Ce microscope dispose de 3 filtres pour détecter les différents marqueurs fluorescents, en revanche il ne dispose pas de spectre avec des longueurs d'ondes sélectionnables. Pour le marquage dans le bleu, le filtre A4 a été utilisé, le filtre L5 pour le marqueur vert et le filtre N21 pour le marqueur rouge. Lors de la prise d'image, le focus est le même pour tous les canaux et est ajusté sur le marquage des noyaux (canal bleu) ; en revanche, il est réglé pour chaque position. Les échantillons ne sont exposés à la lumière que le temps de la prise de l'image (quelques millisecondes) une fois par heure. Toutes les images obtenues ont été réalisées avec un objectif X 20.

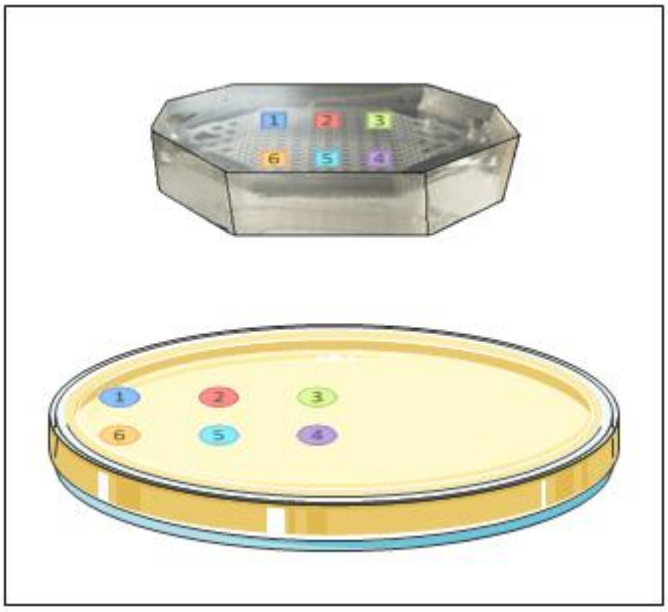


Figure 24 : Positions des images prises dans la biopuce (haut) et dans la boite de Petri (bas).

6. Traitement des images

6.1. Format d'images

Les images obtenues par le microscope Leica sont sauvegardées sous format lif (format propriétaire). Les différents canaux pour chaque image sont ensuite séparés et sauvegardés en format .tiff, puis sont envoyés dans un fichier spécifique pour permettre le traitement par

CellProfiler. C'est un logiciel en libre accès, développé pour des biologistes afin d'analyser des images issues d'un microscope confocal. Ce logiciel comprend un grand nombre de modules capables de réaliser des mesures très variées, tel que l'identification des cellules, la mesure du périmètre cellulaire, la mesure de la granulosité ou l'identification d'éléments à l'intérieur des cellules par exemple. Ce logiciel requiert en contrepartie une qualité d'image très importante. Si la mise au point n'est pas correcte il s'avère plus difficile (voir impossible) pour le logiciel de reconnaitre des éléments et de les délimiter. Un « pipeline » (regroupement de modules) a été développé, plusieurs étapes de traitement ont été nécessaires, chacune comprenant des méthodes dont les paramètres ont été ajustés. Les résultats de cette mise au point seront présentés dans la partie résultat.

6.2. Sélection de la zone d'intérêt

La première étape consiste en une sélection de la zone d'intérêt (ROI : Region Of Interest) réalisée sur l'ensemble des canaux. Cette ROI, un carré de 1000 pixels sur 1000 pixels (460 µm x 460 µm) selectionné au centre d'une micro-chambre, permet de normaliser les résultats obtenus mais surtout de s'affranchir des rebords qui génèrent une autofluorescence dans le vert.

6.3. Méthode de segmentation

La deuxième étape très importante consiste en la segmentation automatique pour délimiter les éléments entre eux. Les différentes méthodes présentes dans le logiciel ont été testées et après comparaison des résultats obtenus, la méthode d'Otsu Global s'est avérée la plus adaptée à nos images.

La méthode d'Otsu (Otsu, 1979) consiste en une séparation des pixels de l'image en deux classes (binarisation) représentant l'une les objets et l'autre le fond. Dans un premier temps le calcul de l'histogramme de l'image est réalisé puis les niveaux de gris (de 1 à L) sont séparés en deux classes, la première ayant un niveau maximal (L) et la seconde un niveau minimal (1). Le nombre de pixels possédant le niveau i est notée n_i et le nombre total de pixels N avec $\mathrm{N} = n_1 + n_2 + \ldots + n_L$. Pour que le procédé soit indépendant du nombre de points dans l'image, l'histogramme est normalisé :

$$p_i = \frac{n_i}{N}, \qquad p_i \geq 0, \qquad \sum_{i=1}^{L} p_i = 1$$

La méthode de seuillage automatique consiste à déterminer une valeur seuil (k), celle pour laquelle l'histogramme cumulé atteint 50 % de sa valeur maximale. La probabilité pour qu'un pixel appartienne au fond peut être écrit :

$$\omega(k) = \sum_{i=1}^{k} p_i$$

La probabilité moyenne pour les pixels d'appartenir au fond :

$$\mu(k) = \sum_{i=1}^{k} i\, p_i$$

Et la probabilité moyenne de tous les pixels :

$$\mu_T = \mu(L) = \sum_{i=1}^{L} i\, p_i$$

Le seuil est déterminé par la formule suivante :

$$\sigma_B^2(k) = \frac{[\mu_T \omega(k) - \mu(k)]^2}{\omega(k)[1 - \omega(k)]}$$

Le seuil optimal correspondant au max de $\sigma_B^2(k)$, pour $k = 1 \ldots L$

Cette méthode de segmentation est employée dans CellProfiler afin d'identifier différents éléments qui peuvent être des noyaux, des cellules, etc…

7. Tests Statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel Graph Pad Prisme 5 (Prism 5, version 5.02, GraphPad Software, San Diego California USA). Les analyses de normalité ont été effectuées par le test de Kolmogorov-Smirnov avec un intervalle de confiance à 95 %. Les conditions comparées sont des triplicatas soumis aux mêmes conditions mais d'expériences différentes. Chaque triplicata représente la moyenne des 6 positions. Les analyses

statistiques Anova 1 et 2 ont fait l'objet d'un post traitement par Bonferroni avec $\alpha = 0,05$. Les différences significatives sont représentées dans les graphiques par : ns = non significatif ; * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$ et *** = $P < 0.001$.

Chapitre 3 : Acquisition sous microscope en « time-lapse »

Ce chapitre est consacré à la mise en place du protocole d'analyse de culture en « time-lapse ». Ce protocole passe par l'adaptation de la biopuce microfluidique à une culture sous microscope. L'analyse des cellules nécessite l'utilisation de sondes fluorescentes pour mettre en évidence le comportement de celles-ci. Une partie de la thèse a été dédiée à la sélection des sondes ainsi qu'à l'optimisation du système d'acquisition sous microscope pour permettre l'obtention d'informations de qualité.

1. Adaptation des biopuces à la culture sous microscope

La technique de fabrication des biopuces microfluidiques mise au point par Régis Baudouin, a dû être modifiée pour permettre l'obtention de biopuces adaptées à l'analyse sous microscope. En effet, les biopuces fabriquées à l'unité n'étaient pas d'épaisseur constante, ce qui génère des problèmes d'inhomogénéités et empêche l'automatisation de la prise d'image. Second problème, une fois les biopuces placées sous microscope, les conditions de culture : 5 % de CO_2, une température de 37°C et un taux d'humidité important, provoquent après quelques heures de culture, une dilatation ou un déplacement (de l'ordre du millimètre) de la biopuce, ce qui en terme d'image provoque une perte de la mise au point (focus) et donc une perte de l'information. Afin de palier au premier problème, avec Patrick Paullier, nous avons cherché à produire des biopuces à épaisseur constante, mais également à faciliter la technique de fabrication. Des dispositifs en aluminium ont été fabriqués, qui permettent après insertion du moule microstructuré au fond, de couler un volume fixe de PDMS. Après cuisson, la réplique est facilement démoulée. Le volume de PDMS pour la réplique supérieure a été fixé à 4 gr, ce qui permet d'obtenir une réplique de 3 mm d'épaisseur et de maintenir les propriétés élastiques du PDMS. Le volume de la réplique inférieure a été fixé à 3 gr équivalent à une épaisseur d'environ 2mm, celle-ci sera ensuite collée sur une lamelle de verre, permettant ainsi de résoudre le problème de perte de focus. Le résultat, après collage (bonding) des deux répliques entre elles est une biopuce microfluidique de 5mm d'épaisseur fixée sur une lamelle de verre. Ces modifications permettent d'améliorer grandement la qualité des images obtenues.

2. Choix des sondes fluorescentes

Comme vu dans la partie introduction bibliographique, il existe différentes méthodes de marquage fluorescent. Pour notre étude, l'analyse devant être réalisée sur cellules vivantes. Nous avons donc choisi de travailler avec des sondes fluorescentes, puisque les techniques comme l'immuno-marquage nécessitent une fixation et ne peuvent être employées. En raison du coût mais surtout de la toxicité connue, nous avons choisi de ne pas travailler avec des Quantums Dots. Enfin, souhaitant adapter cette technique sur différents types cellulaires en particulier sur des cellules primaires, nous avons éliminé l'utilisation des protéines fluorescentes qui requiert une modification du génome (difficilement envisageable sur des cellules primaires).

Différents marqueurs fluorescents ont été testés afin d'obtenir des informations sur les cellules. Le premier objectif de cette partie est de tester la faisabilité d'un marquage d'une culture cellulaire au cours du temps, car les sondes fluorescentes une fois excitées par la lumière ont un temps de demi-vie limité. La plupart des sondes n'est d'ailleurs pas adaptées à un marquage au cours du temps. Le deuxième objectif est de ne conserver que les marqueurs non toxiques. En effet, même si certaines sondes fluorescentes permettent un marquage constant dans le temps, il est possible que se développe une photo-toxicité : une fois excitée la sonde chimique devient fluorescente mais également potentiellement toxique. Les sondes fluorescentes testées ont été choisies pour leur capacité à réaliser un marquage en time-lapse (indépendemment des cultures en systèmes microfluidiques dans un premier temps) (Burguillos *et al.,* 2011 ; Lukandu *et al.,* 2009) et/ou pour leur toxicité non avérée (Aly and Domenech 2009 ; Lemasters *et al.,* 1998).

Les différentes sondes sont dans un premier temps testées en chambre LabTek® afin d'étudier la faisabilité du marquage en temps réel, ainsi que pour sélectionner la concentration adéquate. Lorsque ces tests s'avèrent positifs, les sondes sont alors testées en biopuces afin d'adapter la concentration aux contraintes imposées par les matériaux.

2.1. Marquage de viabilité cellulaire

2.1.1. Hoechst 33342

Pour déterminer le nombre total de cellules présentes dans l'échantillon, un marquage au Hoechst 33342 est réalisé. Cette sonde chimique marque l'ADN, elle est

membrane perméante et marque donc l'ensemble des cellules constituant l'échantillon. Ce marqueur a été employé en « time-lapse » à 0,5 µg/mL (Lukandu *et al.,* 2009) et 0,1 µg/mL (Burguillos *et al.,* 2011). Le marquage réalisé avec le Hoechst 33342 en LabTek® permet un marquage efficace des noyaux des cellules aux 3 premières concentrations choisies : 10, 5 ou 2 µg/mL (figure 25). La morphologie des cellules observables en contraste de phase témoigne d'une absence de stress : les cellules sont étalées et globalement individualisées (absence de gros amas).

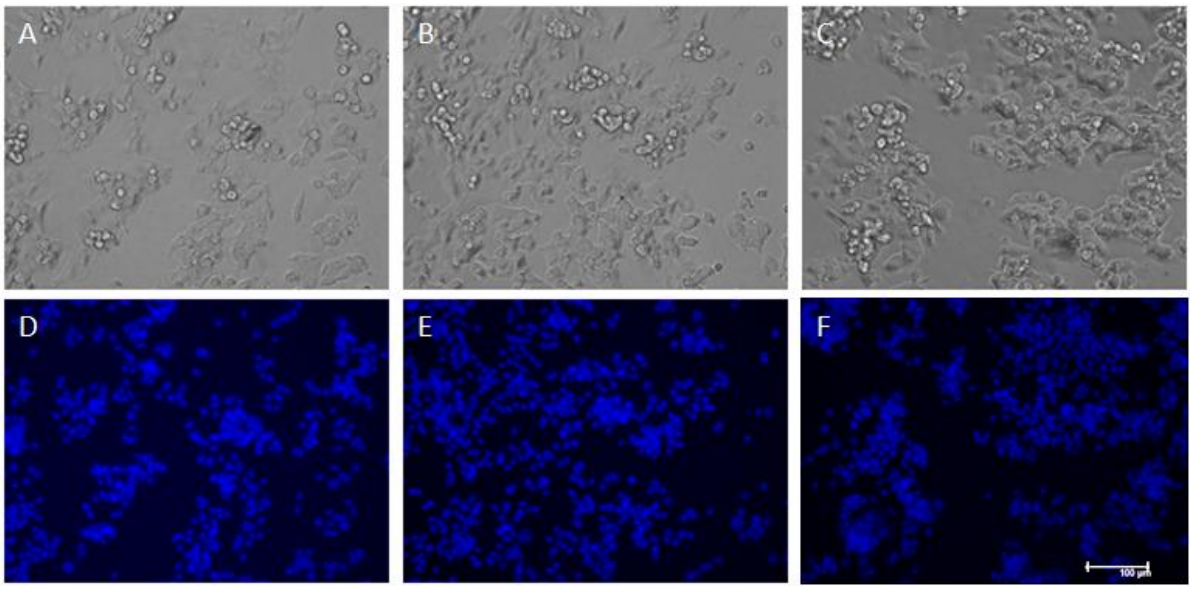


Figure 25 : Marquage des noyaux au Hoechst 33342, réalisé sur des HepG2/C3A cultivées en LabTek®. Les images ont été prises après 22 h de marquage au Hoechst 33342, utilisé à 10 µg/mL (A, D), 5 µg/mL (B, E) et 2 µg/mL (C, F).

Une mesure de l'intensité de fluorescence du Hoechst 33342 réalisée sur 24 h (figure 26) met en évidence un marquage constant au cours du temps, sans perte de l'intensité de fluorescence.

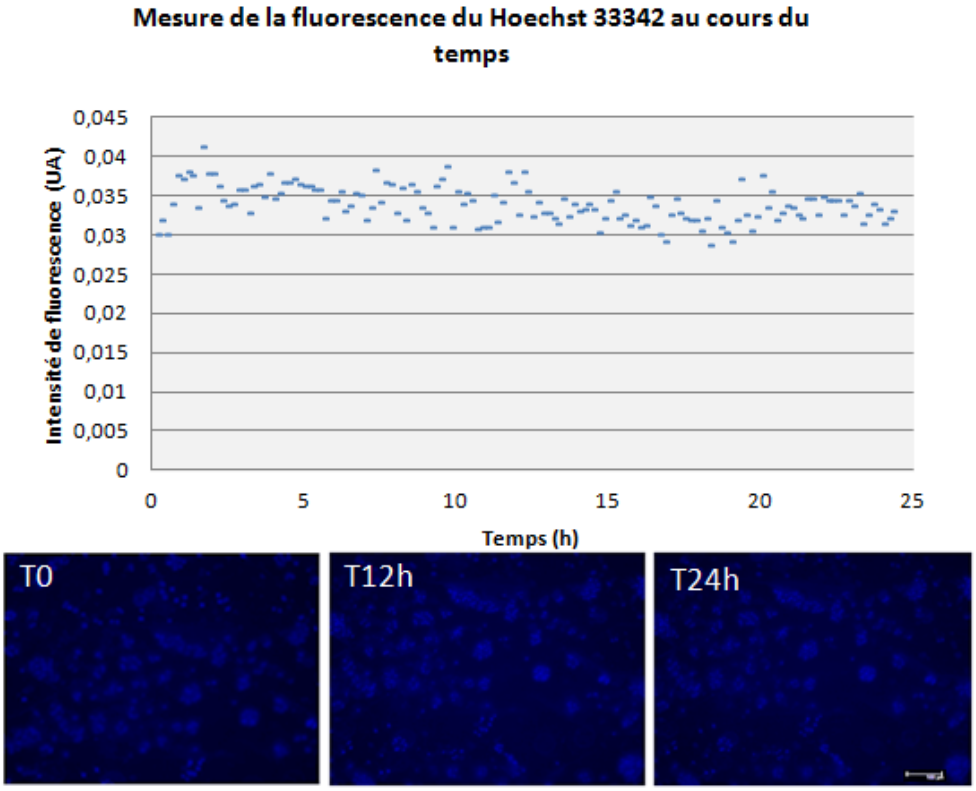


Figure 26 : Evaluation de l'intensité de fluorescence au cours du temps du Hoechst 33342 à 2 µg/mL en LabTek® (image prise toutes les 10 min).

Le Hoechst 33342 à 2µg/mL est ensuite sélectionné pour marquer les cellules au sein de biopuces microfluidiques. Afin d'optimiser le marquage et l'effet du marqueur sur la culture cellulaire en biopuce, le Hoechst 33342 est également testé à 1 µg/mL. Les résultats de ces marquages sont visibles sur la figure 27. Utilisé à 2 comme à 1 µg/mL, le Hoechst 33342 donne un marquage efficace des noyaux à 10 h. Cependant, pour la plus faible concentration (1 µg/mL), le marquage n'est pas clairement visible à T0. Or le canal bleu est celui sur lequel la mise au point est réalisée pour l'ensemble des expériences, le marquage doit donc être optimal dès le début de l'expérience. Le Hoechst 33342 a été sélectionné à 2 µg/mL pour la suite de la thèse, afin de dénombrer les cellules hépatiques (HepG2/C3A) lors des tests de caractérisation et de toxicité au sein des biopuces microfluidiques.

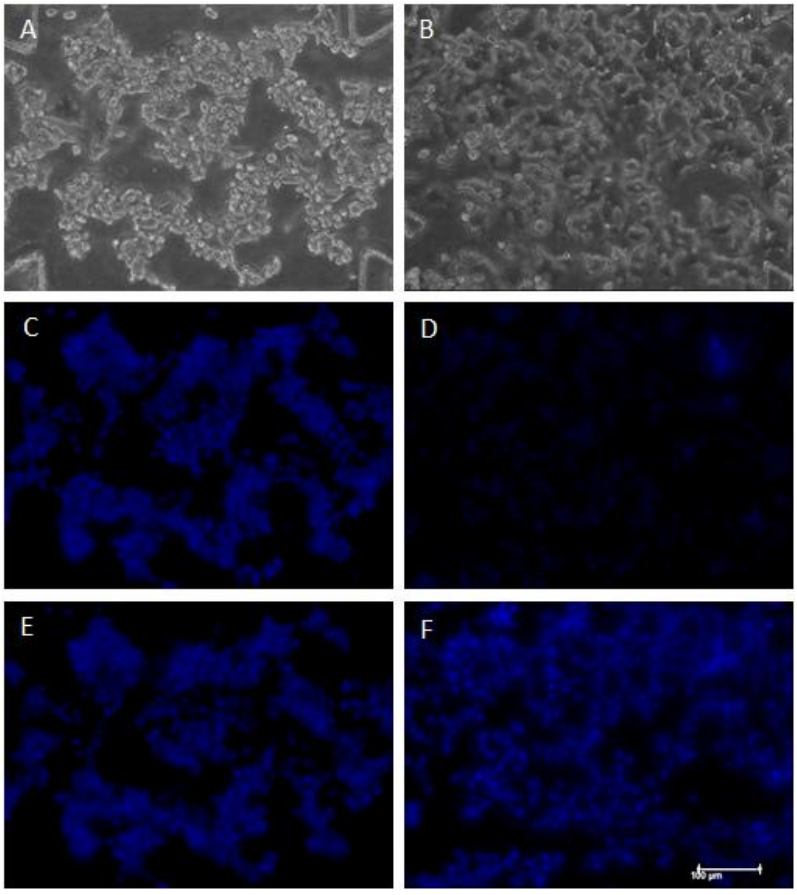


Figure 27 : Marquage d'HepG2/C3A au Hoechst 33342 réalisé en biopuce microfluidique à T0 (après 30 min d'incubation) (A, C, D) et après 10 h de culture (B, E, F). Le Hoechst 33342 utilisé à 2 µg/mL (C, E) et 1 µg/mL (D, F). L'aspect de la culture cellulaire est visible en contraste de phase (A, B).

Le faible marquage du Hoechst 33342 après 30 min d'incubation nous a incité pour la suite de la thèse à passer à un temps d'incubation supérieur pour permettre un marquage correct dès la première prise d'image.

2.1.2. Calcein AM

La Calcein-AM, sonde membrane perméante, est utilisée comme déterminant de la viabilité cellulaire chez la plupart des cellules eucaryotes. Non fluorescente, elle est convertie en marqueur fluorescent dans le vert après hydrolyse de l'ester acétoxyméthyl (AM) par des estérases intracellulaires. Cette sonde a été employée à 2 et 4 µM (Lemasters *et al.,* 1998) et en biopuce microfluidique à 2 µM (Prot *et al.,* 2011). Le marquage de la Calcein AM réalisé à 4 µM sur des cellules cultivées en LabTek® est représenté sur la figure 28.

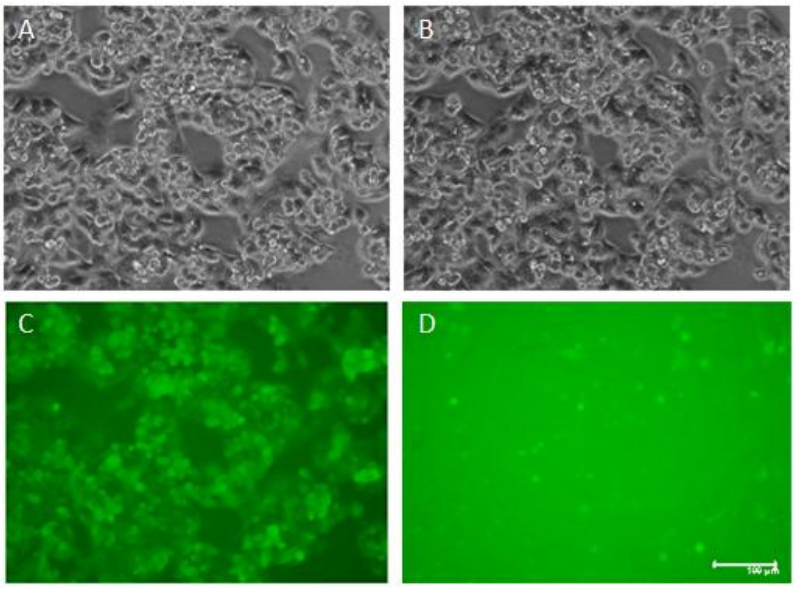


Figure 28 : Marquage à la Calcein AM d'HepG2/C3A cultivées en LabTek®. Morphologie cellulaire obtenue après 20 min (A) et 12 h de culture (B). Images issues du marquage par la Calcein AM à 4 µM après 20 min (C) et 12 h de culture (D).

L'image obtenue après 20 min de mise sous microscope montre un marquage de l'ensemble des cellules (vivantes) avec une variation de l'intensité fluorescente selon les cellules. Cependant après 12 h de culture sous microscope avec une prise d'image toutes les 10 min, les cellules pour la plupart ne sont plus distinguables, l'image obtenue est saturée. Un autre phénomène est observé en direct lors de la mise sous microscope : le quenching (figure 29). Cette perte de fluorescence soudaine et brutale est due à une désactivation du marqueur par une fixation de celui-ci à une autre molécule. Ce phénomène intervient dans un intervalle de temps assez court : de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes selon les marqueurs. Pour son absence de stabilité, ce marqueur n'a pas été sélectionné pour la suite de la thèse.

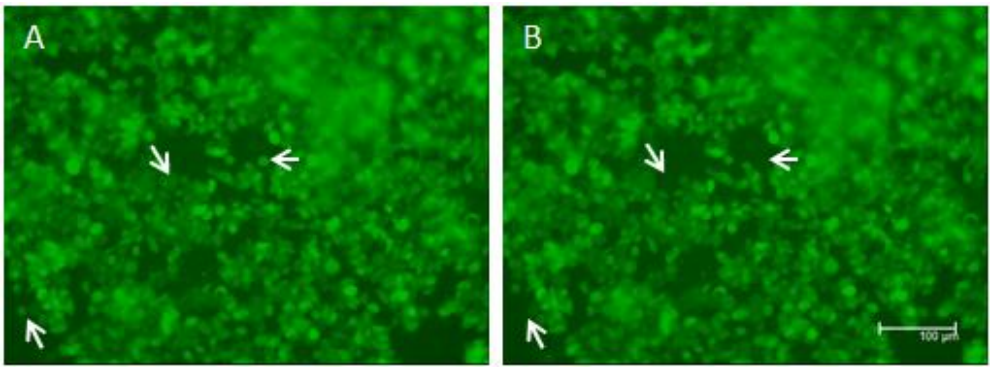


Figure 29 : Exemple de quenching (flèches blanches) observé avec la Calcein AM dans un intervalle de temps de 5 min. Calcein AM utilisée à 4 µM sur des HepG2/C3A cultivées en Labtek®.

2.1.3. L'éthidium homodimère : EthD-1

L'éthidium homodimère (EthD-1) marque l'ADN et donc le noyau, mais n'est pas membrane perméant, il ne marque donc que l'ADN des cellules mortes ou ne présentant plus d'intégrité membranaire. L'EthD-1 a été employé entre 2 µM et 16 µM (Rizvi *et al.,* 2011 ; Aly and Domenech 2009 ; Youn *et al.,* 2011). L'EthD-1 est testé en LabTek® à 1 et 4 µM. La mort cellulaire est induite par l'ajout de staurosporine à 5 µM. Les résultats de ces marquages sont présentés dans la figure 30. Grâce aux images en contraste de phase, on constate dans les deux conditions (4 µM et 1 µM d'EthD-1) une population cellulaire très endommagée : les cellules ne sont plus étalées, de nombreux débris cellulaires sont présents dans le milieu de culture. Les images obtenues avec l'EthD-1 révèlent la présence de nombreuses cellules mortes ou endommagées. Le marquage réalisé avec 4 µM d'EthD-1 permet de mieux visualiser les cellules que celui à 1 µM.

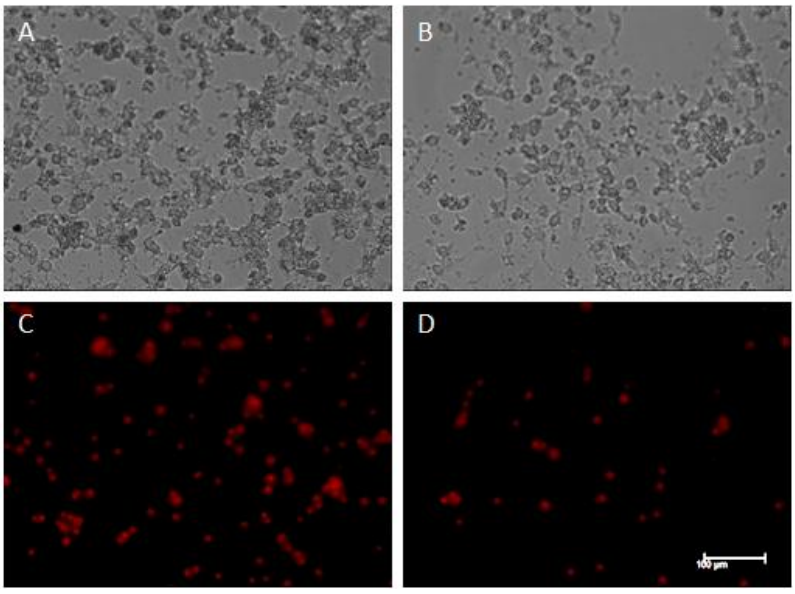


Figure 30 : Marquage d'HepG2/C3A à l'EthD-1 obtenu après 22 h de culture. L'EthD-1 est employé à 4 µM (A, C) et 1 µM (B, D). (A, B) les images en contraste de phase. La mort cellulaire est provoquée par ajout de stautosporine à 5 µM en même temps que l'ajout du marqueur.

L'EthD-1 testé aux trois concentrations suivantes en biopuce : 4 µM, 1 µM et 400 nM, met en évidence une différence de marquage (figure 31). A la plus forte concentration (4 µM) les cellules mortes également visibles en contraste de phase sont bien marquées en rouge. A 1 µM d'EthD-1 le marquage est présent mais de manière beaucoup moins nette. Pour observer correctement toutes les cellules mortes, il faut pousser l'intensité et le temps

d'exposition, ce qu'il faut éviter lors d'analyse en « time lapse ». A la concentration la plus faible (400 nM), la visualisation des cellules mortes s'avère difficile, le marquage est trop faible.

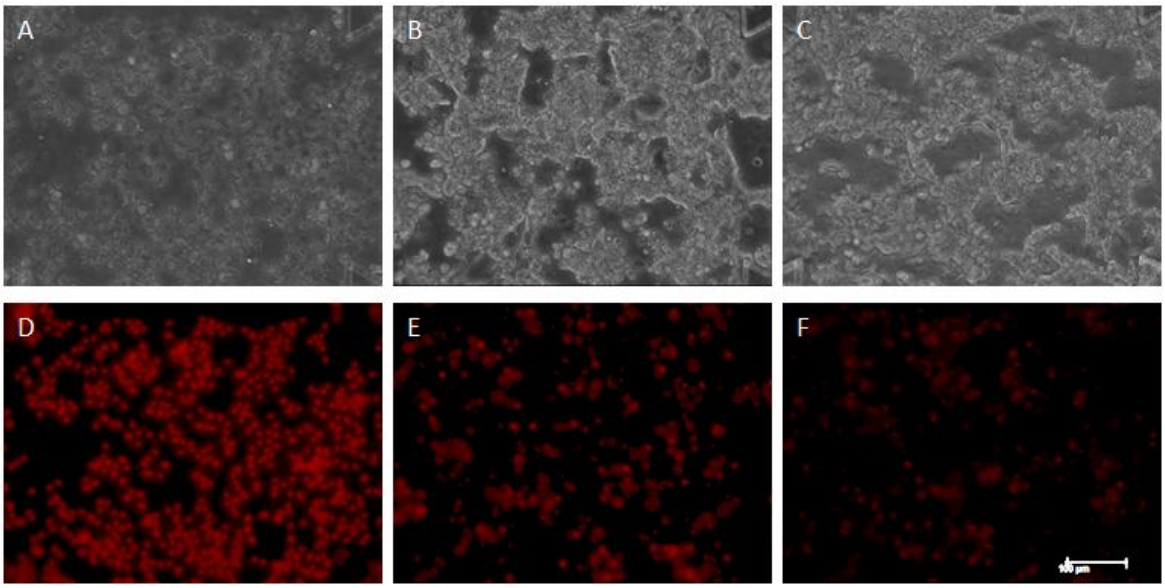


Figure 31 : Marquage à l'EthD-1 d'HepG2/C3A misent en contact avec 5 µM de Staurosporine (induction de mort cellulaire). EthD-1 testé à 4 µM (A, D), 1 µM (B, E) et 400 nM (C, F). Images obtenues après 10 h de culture.

Afin d'identifier les cellules mortes, l'EthD-1 à 4 µM a été sélectionné pour marquer les cellules au sein des biopuces microfluidiques lors des tests de caractérisation et de toxicité.

2.2. Marquage des mitochondries

2.2.1. $DiOC_6(3)$

Le $DiOC_6(3)$ est un marqueur qui permet de mettre en évidence les variations du potentiel de membrane des mitochondries lorsqu'il est utilisé à faible concentration. A plus forte concentration, le marquage s'étend au Réticulum Endoplasmique et à l'appareil de Golgi. Il a été employé en time-lapse à la concentration de 40 nM (Lukandu *et al.,* 2009). Les hépatocytes cultivées en LabTek® marquées au $DiOC_6(3)$ à 60, 50 et 40 nM sont présentées dans la figure 32. Ces marquages observés après 22 h de culture s'avèrent efficaces même à la plus faible concentration testée.

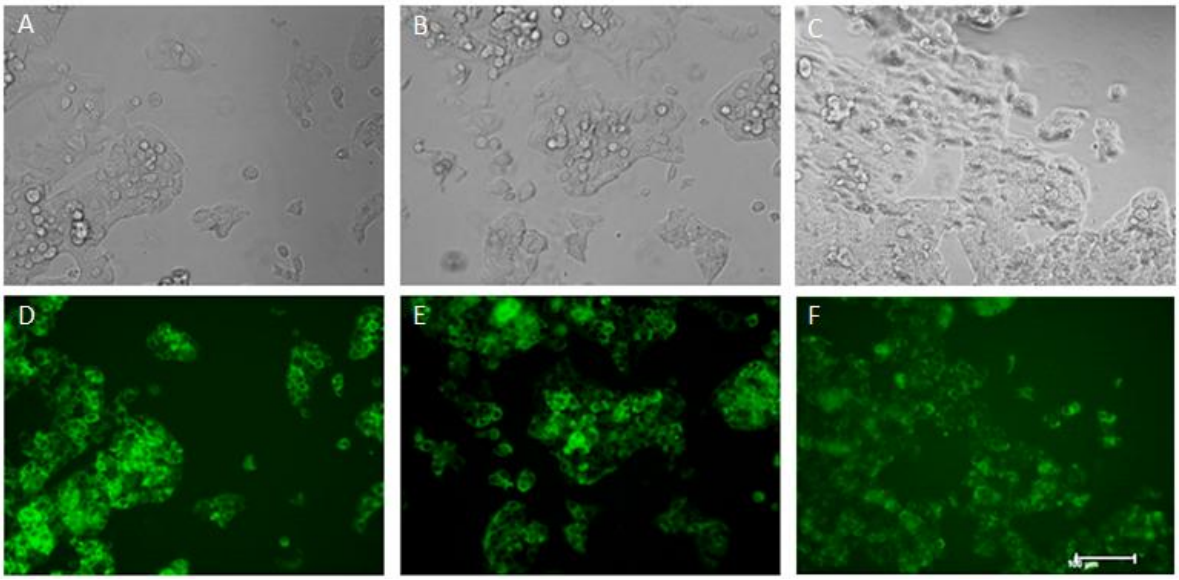


Figure 32 : Marquage d'HepG2/C3A au $DiOC_6(3)$ obtenu après 22 h de culture à 60 nM (A, D), 50 nM (B, E) et 40 nM (C, F). La morphologie des cellules visibles grâce au contraste de phase est observée pour les différentes concentrations (A, B, C).

Une mesure de l'intensité fluorescente au cours du temps du $DiOC_6(3)$ utilisé à 60 nM (figure 33) met en évidence une augmentation du marquage pendant les 6 premières heures, puis une chute progressive de celui-ci pour arriver après 24 h de culture à une mesure de fluorescence inférieure à l'initiale. Cette perte de fluorescence au cours du temps est appelée bleaching. Elle correspond à la destruction irréversible d'un fluorochrome excité par la lumière en présence d'oxygène. Dans le cas du $DiOC_6(3)$, ce « bleaching » est relativement faible. Cette perte de marquage s'accompagne d'une augmentation du bruit de fond au cours du temps, mais qui n'empêche pas l'analyse de l'image.

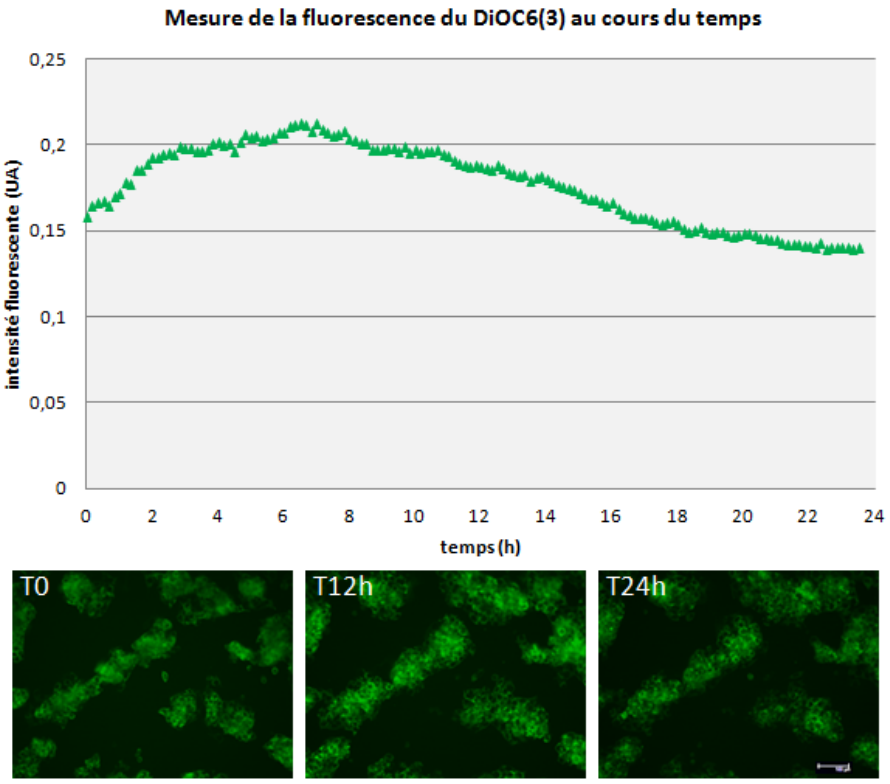


Figure 33 : Evaluation de l'intensité de fluorescence au cours du temps du $DiOC_6(3)$ à 60 nM en LabTek® (image prise toutes les 10 min). Les images utilisées pour mesurer la fluorescence sont représentées pour T0, T12 et T24.

Le résultat du $DiOC_6(3)$ placé en contact pendant 10 h avec des HepG2/C3A au sein d'une biopuce à 100 nM et 50 nM est présenté dans la figure 34. A 100 nM, un marquage des mitochondries est observé ; bien qu'un peu faible, il est tout de même visible. En revanche ce n'est pas le cas pour l'utilisation du $DiOC_6(3)$ à 50 nM qui ne présentent pas de marquage des mitochondries. Pour la caractérisation des HepG2/C3A dans les biopuces dans différentes conditions, le $DiOC_6(3)$ a été retenu pour être employé à 100 nM.

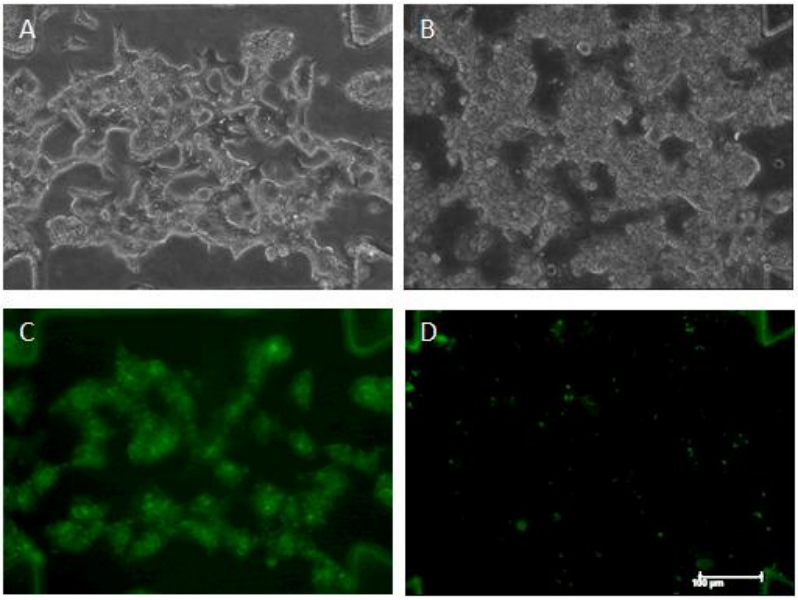


Figure 34 : Marquage d'HepG2/C3A obtenu en biopuce après 10 h au $DiOC_6(3)$ utilisé à 100 nM (A, C) et 50 nM (B, D).

2.2.2. TMRE

Le TMRE (Tetramethylrhodamine Ethyl Ester) est un marqueur qui permet de mettre en évidence les variations du potentiel de membrane des mitochondries lorsqu'il est utilisé à faible concentration. A plus forte concentration, le marquage s'étend au Réticulum Endoplasmique et à l'appareil de Golgi. Il a été employé en "time-lapse" à la concentration de 25 nM (Burguillos et al., 2011). Le marquage des HepG2/C3A par le TRME a lieu en LabTek® à une concentration de 4 µM. Ce marquage a fait l'objet d'une mesure de l'intensité fluorescente au cours du temps pendant 24 h avec une image prise toutes les 10 min (figure 35). Les résultats obtenus révèlent un marquage efficace des mitochondries à T0 ; cependant, au bout de 3 heures l'intensité de fluorescence diminue progressivement. Après 24 h de culture, plus aucun marquage des mitochondries n'est visible. Ce marqueur n'a pas été retenu pour la suite de la thèse en raison de sa perte de fluorescence au cours du temps (bleaching).

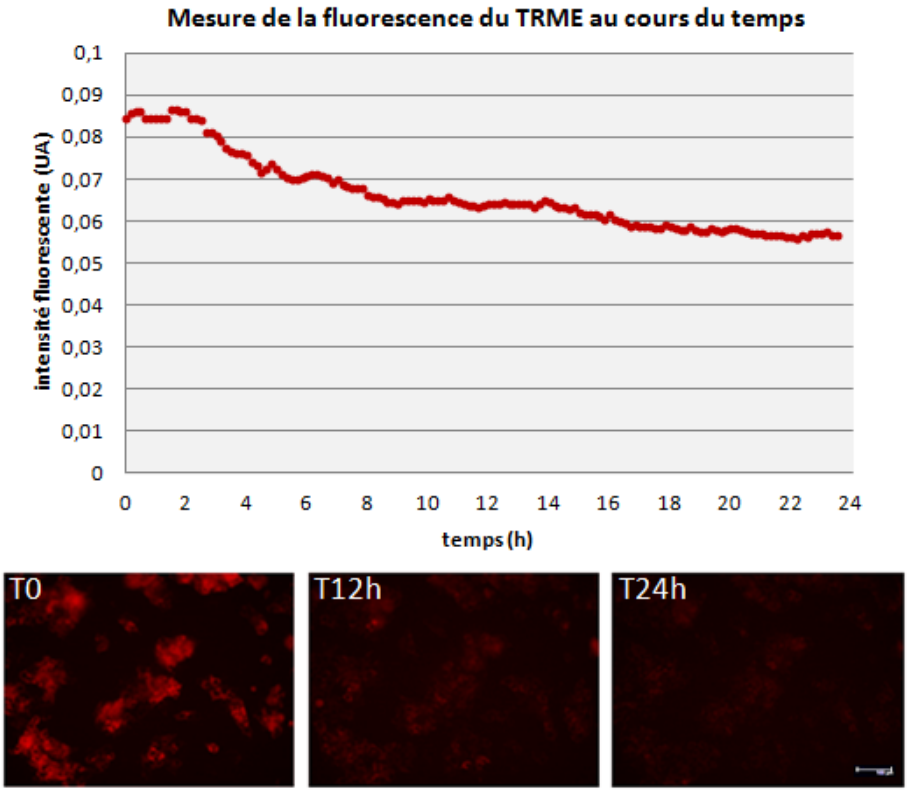


Figure 35 : Evaluation de l'intensité de fluorescence au cours du temps du TMRE à 4 µM en LabTek® (image prise toutes les 10 min). Les images utilisées pour mesurer la fluorescence sont représentées pour T0, T12 et T24.

2.2.3. Mitotracker® Green FM

Le Mitotracker® Green AM est un marqueur qui permet de mettre en évidence les variations du potentiel de membrane des mitochondries. Il a été employé à 1µM (Harada *et al.,* 2007). Les résultats obtenus lors des marquages des HepG2/C3A aux 3 concentrations : 1 µM, 500 nM et 200 nM de Mitotracker® Green FM après 20 min sont présentés dans la figure 36. Le marquage à 1 µM (concentration proposée par le fournisseur) permet de marquer fortement les mitochondries des cellules, mais l'image pour cette concentration met en évidence un bruit de fond important. Mitotracker® Green FM utilisé à 500 nM permet un marquage mais trop faible des cellules, puisqu'elles ne sont pas toutes visibles par fluorescence en comparant avec le contraste de phase. La plus faible concentration : 200 nM ne permet pas d'identifier les mitochondries des cellules.

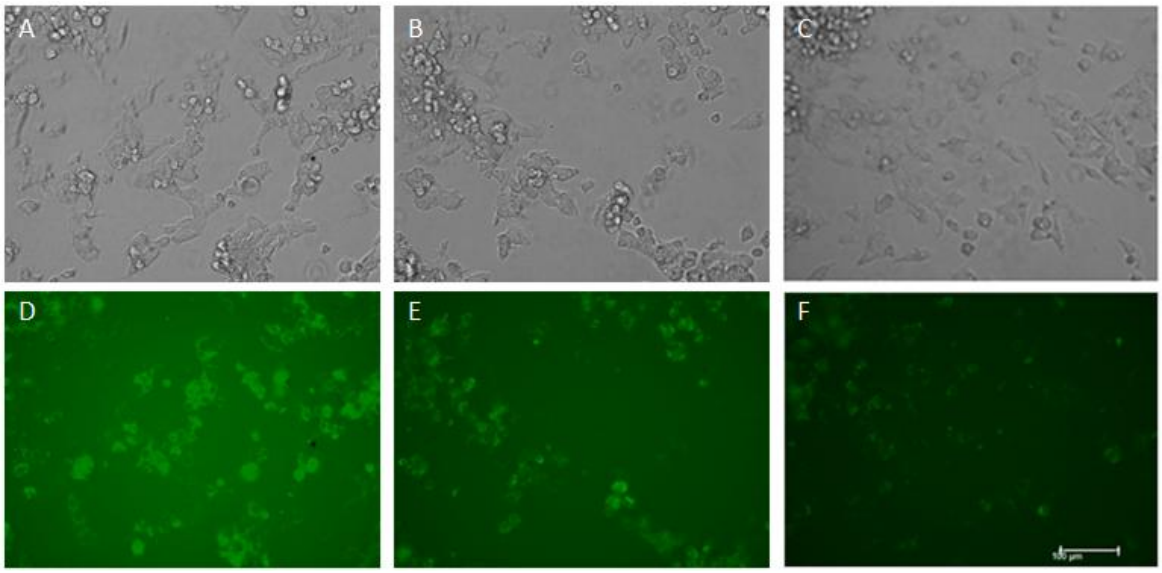


Figure 36 : Marquage d'HepG2/C3A au Mitotracker® Green FM à différentes concentrations. Images obtenues après 20 min de marquage au Mitotracker® Green FM à 1 µM (A, D) ; 500 nM (B, E) et 200 nM (C, F).

Une mesure de l'intensité de fluorescence du Mitotracker® Green FM utilisée à 1 µM réalisée sur 24 h (figure 37) met en évidence une augmentation du marquage jusqu'à 13 h puis l'intensité de fluorescence semble de stabiliser jusqu'à la fin de l'expérience.

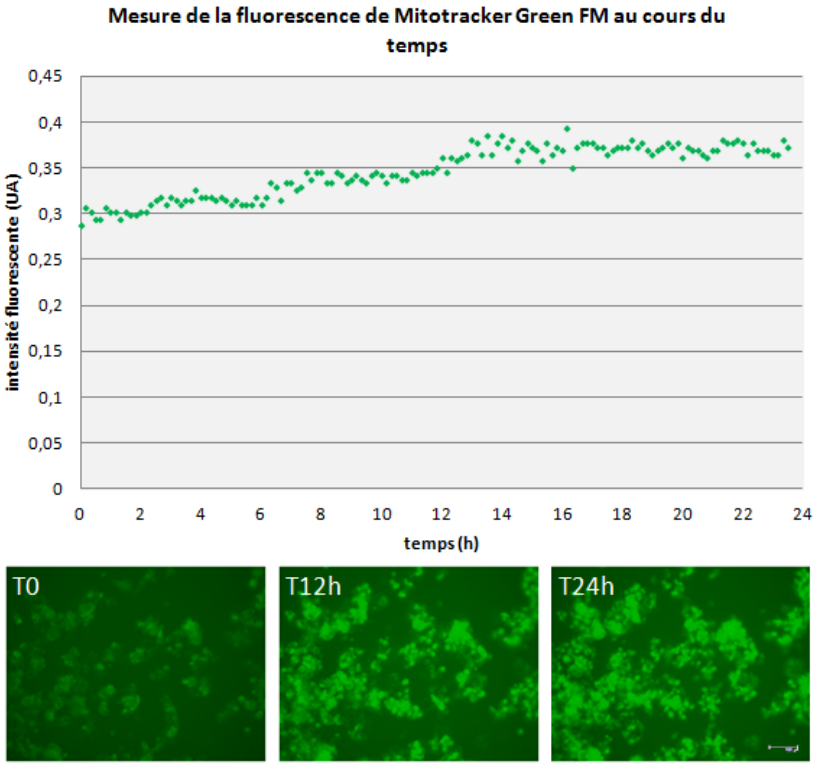


Figure 37 : Evaluation de l'intensité de fluorescence au cours du temps du Mitotracker® Green FM à 1 µM en LabTek® (image prise toutes les 10 min).

La sonde Mitotracker® Green FM utilisé à 1 µM, est placé en biopuce microfluidique (figure 38). En contraste de phase, on observe un changement de morphologie entre T0 et T10. A 10 h de culture les cellules semblent arrondies, stressées et certaines mortes. En ce qui concerne la qualité du marquage fluorescent, on observe pour T0 un faible marquage des mitochondries et un bruit de fond de l'image assez important. A T10 le marquage est plus visible, cependant le bruit de fond est toujours important et ne permet pas de distinguer les mitochondries des cellules aussi bien qu'en LabTek®.

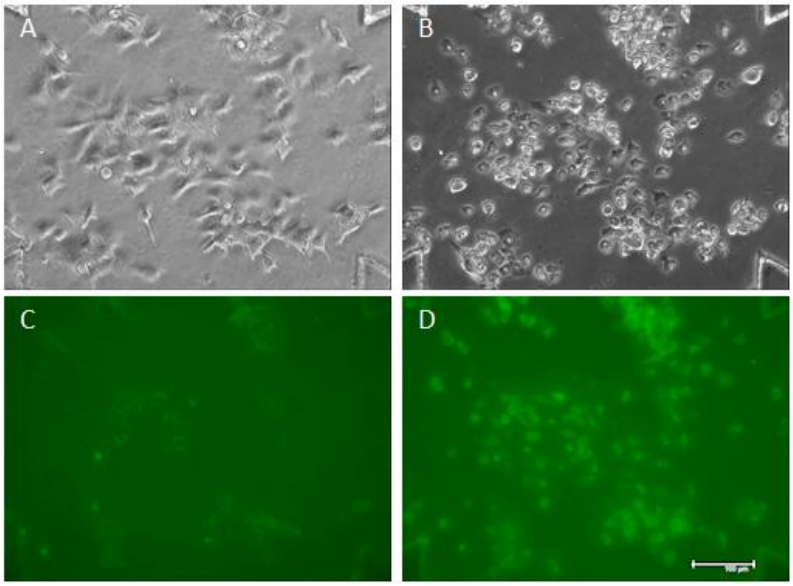


Figure 38 : Marquage d'HepG2/C3A en biopuce réalisé au Mitotracker® Green FM à 1 µM, T0 (A, C), T10 (B, D).

La suspicion de toxicité de Mitotracker® Green FM nous a amenés à effectuer un test de toxicité du marqueur sur des cultures d'HepG2/C3A en boites de Pétri sur 72 h (figure 39). Après 24 h de mise en contact avec Mitotracker® Green FM 1 µM, les cellules semblent avoir moins proliférées que le témoin sans marqueur, cependant au vu de l'écart type cette différence ne semble pas significative. Après 48h de culture, la différence entre la population cellulaire avec ou sans Mitotracker s'est réduite. En revanche, après 72 h de culture, les cellules traitées sont beaucoup moins nombreuses que les cellules témoins. De part sa toxicité, et l'important bruit de fond, le Mitotracker® Green FM n'a pas été sélectionné pour caractériser le comportement des HepG2/C3A au sein des biopuces.

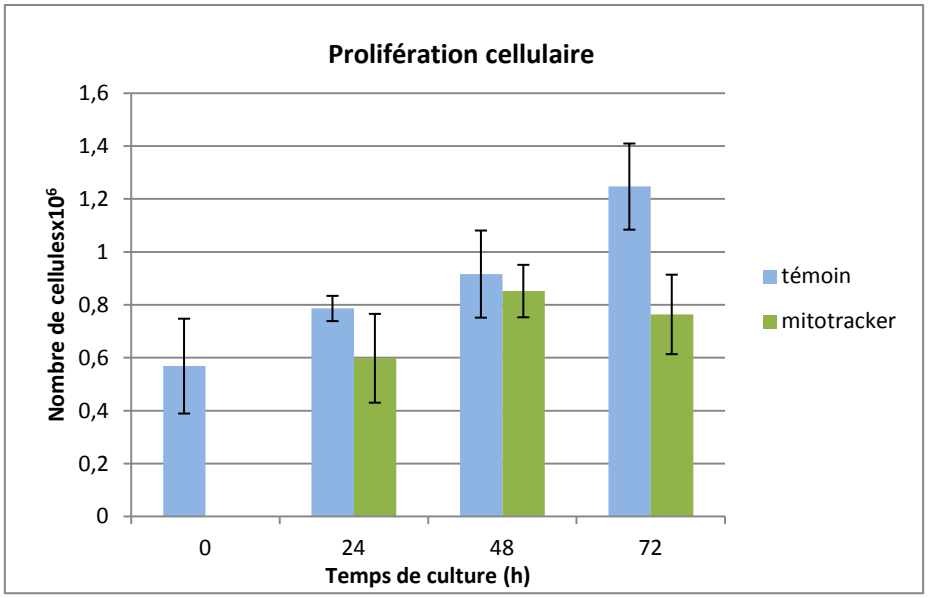


Figure 39 : Evolution du nombre de cellules cultivées avec et sans Mitotracker® Green FM à 1 µM. Comptage réalisé sur lamelle de Malassez, (N=3).

2.3. Marqueur du calcium intracellulaire : Fluo4-AM

Un indicateur de l'état physiologique d'une cellule est sa concentration de Ca^{2+} intracellulaire, et sa capacité à la réguler. Afin de visualiser ce paramètre, le Fluo4-AM™ a été sélectionné. Cette sonde a déjà été employée en biopuce à 5 µM (Choucha-Snouber *et al.,* 2012b). Les images du marquage au Fluo4-AM réalisé à 8, 6 et 4 µM sur des HepG2/C3A en LabTek® sont représentées dans la figure 40. Les cellules ont le même aspect quelle que soit la concentration testée. Le marquage à 8 µM permet à peine de distinguer le calcium intracellulaire dans les cellules. A 6 et 4 µM de Fluo4-AM, les cellules ne sont pas identifiables, le marquage est trop faible.

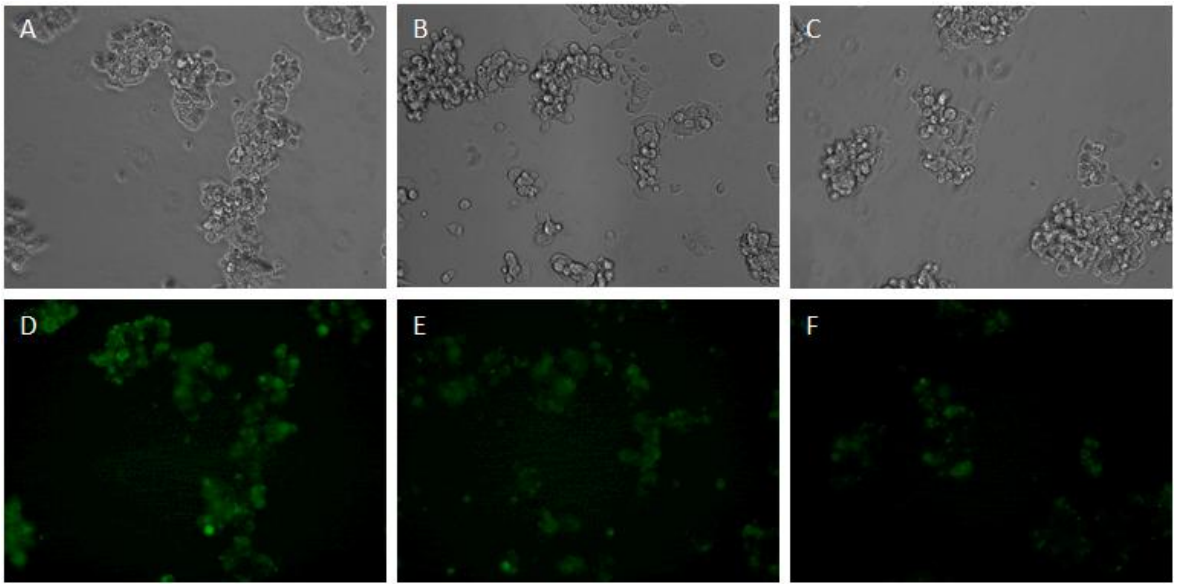


Figure 40 : Marquage d'HepG2/C3A en LabTek® après 2 h de culture avec du Fluo4-AM à 8 µM (A, D), 6 µM (B, E) et 4 µM (C, F).

L'intensité de fluorescence du Fluo-4AM utilisé à 8 µM a été suivie au cours du temps sur 24 h, avec une prise d'image toutes les 10 min (figure 41). Initialement les cellules sont très faiblement marquées. Le marqueur prend du temps avant de pénétrer les cellules via les canaux calciques. Puis, l'intensité de fluorescence de l'échantillon augmente ; à 6 h on peut visualiser certaines cellules, mais majoritairement c'est le bruit de fond qui augmente. Cette augmentation a lieu jusqu'à 13 h, où l'intensité se stabilise à une valeur approximative de 0,5. A cette valeur, le bruit de fond a supplanté tout marquage spécifique, aucune cellule n'est identifiable, l'image est saturée. Ce marqueur n'a donc pas été retenu pour l'analyse continue de la culture en biopuce.

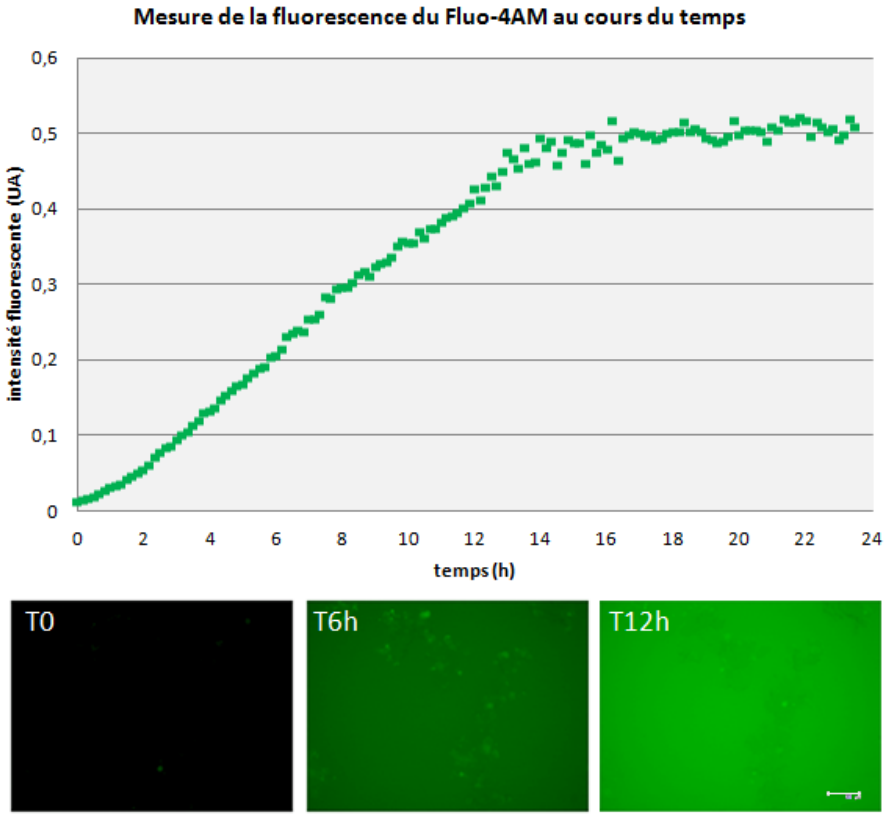


Figure 41 : Evaluation de l'intensité de fluorescence au cours du temps du Fluo-4AM utilisé à 8 µM en LabTek® (image prise toutes les 10 min).

2.4. Marquage d'apoptose : Red FLICA™

Pour mettre en évidence l'apoptose des cellules, le kit Red-FLICA™ est testé. Il est basé sur l'utilisation d'un peptide couplé avec de la Sulforhodamine. Ce peptide est spécifiquement reconnu par les caspases 3 et 7 qui le clivent libérant ainsi la rhodamine. Les caspases 3 et 7 sont des indicateurs de la fin de la voie de signalisation déclenchant l'apoptose. Il a déjà été employé en time-lapse (Burguillos *et al.,* 2011). Le marquage du Red FLICA™, utilisé à 3,33 % comme préconisé par le fournisseur sur des HepG2/C3A ayant subi une induction de l'apoptose par un traitement à la staurosporine à 2 µM pendant 3 h, est représenté sur la figure 42. Que ce soit à T0 ou à T12 , il n'y a qu'un très faible marquage rouge visible, qui n'évolue pas au cours du temps. Sachant que les hépatocytes et dans notre cas les HepG2/C3A, sont auto-fluorescents dans le rouge (Rodrigues *et al.,* 2011), vue la faiblesse de la fluorescence observée, il est possible que le signal ne corresponde qu'à l'auto-fluorescence des cellules. Il ne semble pas qu'un réel marquage du Red FLICA™ soit observé.

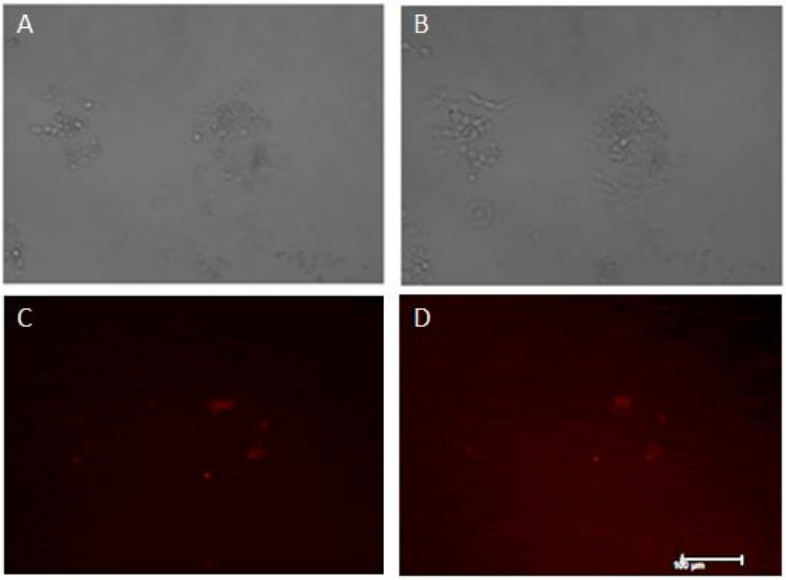


Figure 42 : Marquage d'HepG2/C3A cultivées en LabTek® au Red FLICA™, afin de visualiser un phénomène d'apoptose. Images obtenues à T0 (A, C) et T12 (B, D).

Bien qu'aucun marquage spécifique d'apoptose par le Red FLICA™ ne semble être décelé, il apparait pourtant que ce phénomène soit bien présent dans notre échantillon. Lorsque l'on observe attentivement l'aspect des cellules en contraste de phase ainsi que celui des noyaux par marquage au Hoechst 33342 (2 µg/mL) (figure 43), les noyaux des cellules qui entrent en apoptose se fragmentent (T18 à T20) pour finalement se « dissoudre » complètement. A T21, le noyau de la cellule morte par apoptose n'est plus visible par marquage fluorescent. Le temps ainsi que le type de fragmentation observés correspondent au phénomène d'apoptose décrit dans la littérature (Liu *et al.,* 2010). Le Red FLICA™ en raison de son absence de marquage n'a pas été retenu pour la suite de la thèse.

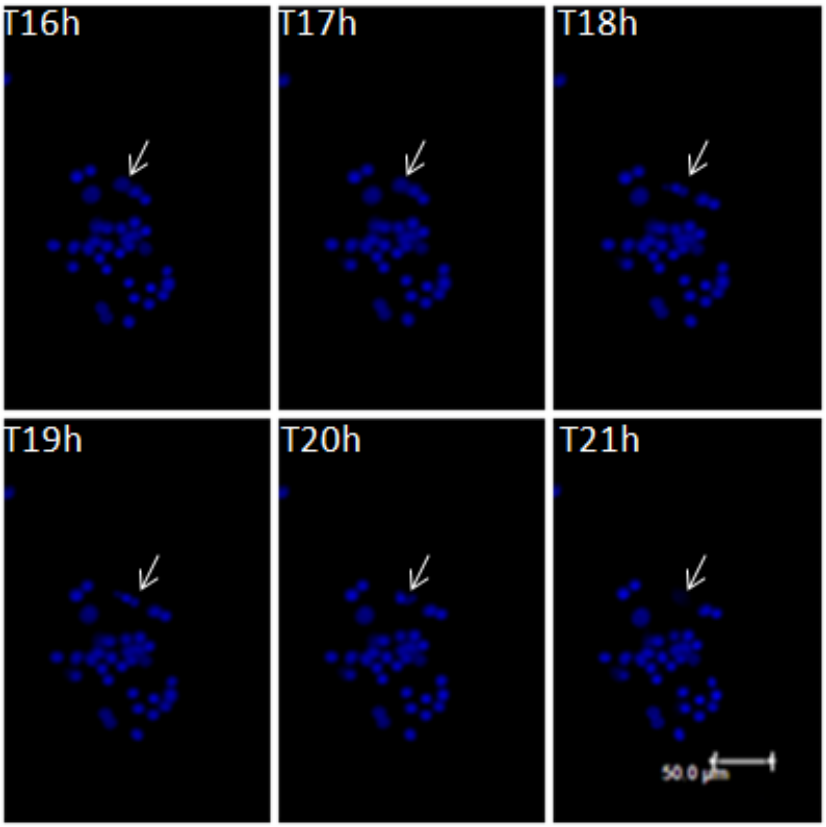


Figure 43 : Suivi d'HepG2/C3A en apoptose par marquage des noyaux au Hoechst33342 (2 µg/mL). La flèche blanche met en évidence une cellule qui entre en apoptose, avec fragmentation de l'ADN puis disparition complète du noyau.

2.5. Marquage de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) : CarboxyDCFDA-2AM

Le CarboxyDCFDA-2AM permet de mettre en évidence la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) : ce sont des espèces chimiques oxygénées telles que des radicaux libres, des ions oxygénés et des peroxydes qui sont produits par la cellule en cas de stress externe. Il peut s'agir par exemple de l'anion superoxyde O_2^-, de l'oxygène singulet O_2^*, du peroxyde d'hydrogène H_2O_2, ou encore de l'ozone O_3. Dans la littérature, il a été employé à 5 µM (Tuschl *et al.,* 2009). Le CaroxyDCFDA-2AM classiquement utilisé en spectrophotométrie, est un marqueur fluorescent très intéressant dans le cadre d'une étude de toxicité. Le CarboxyDCFDA-2AM testé à 10 µM sur des HepG2/C3A (figure 44) est visible par l'apparition de spots verts au-dessus des cellules. L'apparition de ces spots varie au cours du temps ; à T6, de nombreux spots sont présents contrairement à T0. A T12, la plupart des spots ont disparu, en revanche, le cytoplasme des cellules est beaucoup plus marqué.

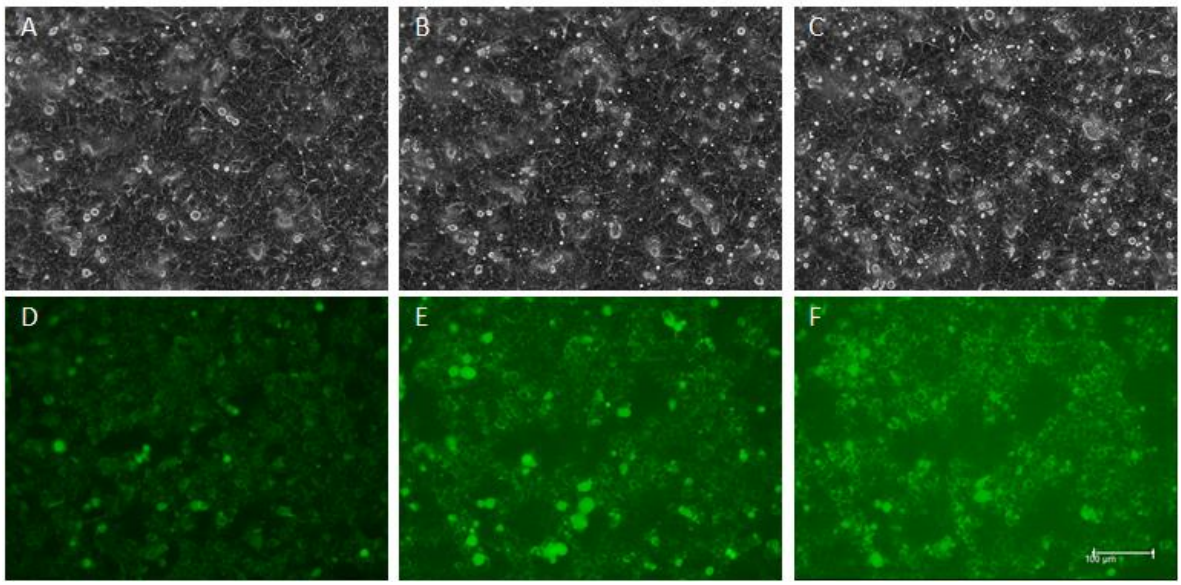


Figure 44 : Marquage d'HepG2/C3A cultivées en LabTek® réalisé avec du CarboxyDCFDA-2AM à 10 µM sur 12 h. Les images représentées ont été obtenues à T0 (A, D), 6 h (B, E) et 12 h (C, F) de marquage.

En observant plus en détail l'apparition de ces spots (figure 45), on constate la présence de « quenching », à 20 min d'intervalle le spot mis en évidence par une flèche disparait. L'intensité de ce marquage est vraiment trop importante puisqu'au moment où les spots sont les plus intenses, on peut observer une fluorescence dans le rouge sans avoir utilisé de marqueur de cette longueur d'onde. Ce résultat est dû à une forte saturation du marqueur vert, qui est également capté dans le rouge.

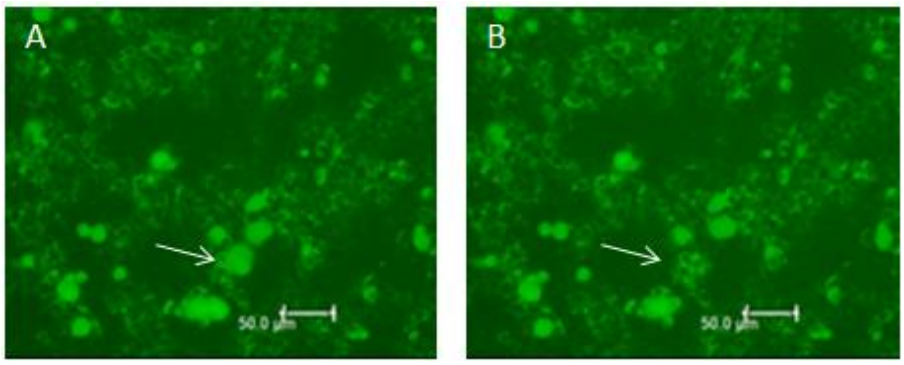


Figure 45 : Phénomène de « bleaching » observé avec le CarboxyDCFDA-2AM, mis en évidence par la flèche blanche. Les Images A et B sont pris à 20 min d'intervalle.

Le CarboxyDCFDA-2AM est ensuite testé à la même concentration en biopuces (figure 46). Ce marquage réalisé pendant 24 h avec une prise d'image toutes les heures, a permis de mettre en évidence des variations d'intensités du marqueur au cours du temps.

Ainsi on peut observer une augmentation de l'intensité de fluorescence jusqu'à 7 h de culture sous microscope puis l'intensité diminue, elle se stabilise de 11 h jusqu'à 18 h puis une seconde augmentation de l'intensité est observée. Celle-ci est due à la saturation du surnageant en marqueur fluorescent. Ce marqueur utilisé en LabTek® ou en biopuce réalise un marquage efficace des ROS, mais les images issues de ces expériences présentent une augmentation du bruit de fond au cours du temps ce qui rend le traitement de ces images difficile. C'est pourquoi, souhaitant d'abord mettre en place un protocole de traitement par imagerie relativement simple, le CarboxyDCFDA-2AM n'a pas été sélectionné mais reste une perceptive d'analyse des cellules lors des tests de toxicité.

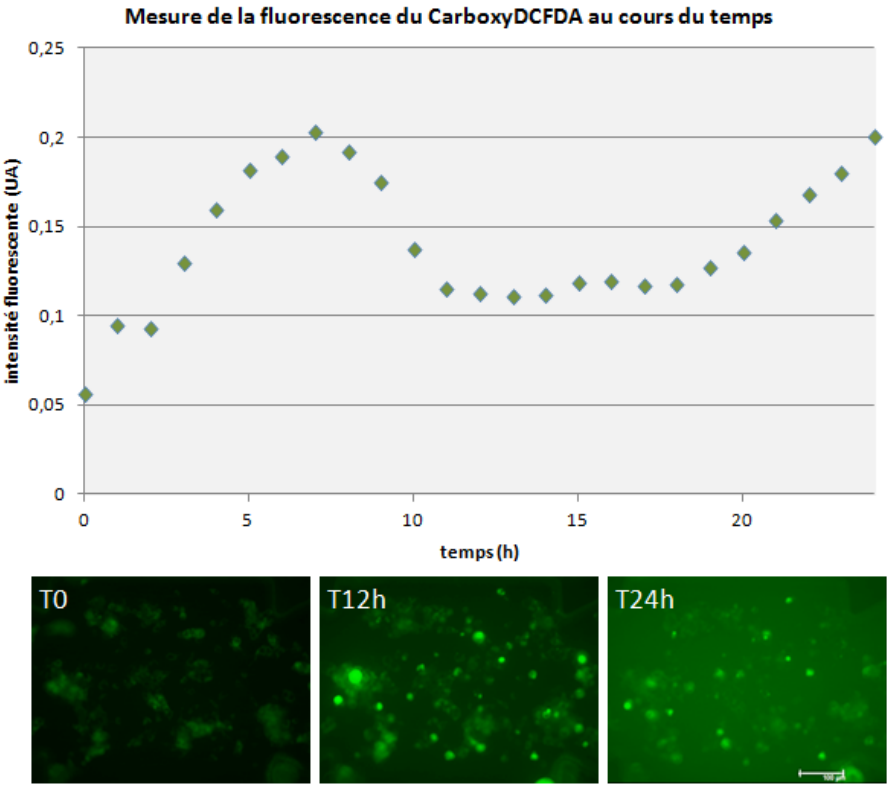


Figure 46 : Evaluation de l'intensité de fluorescence au cours du temps du CarboxyDCFDA-2AM utilisé à 10 µM en biopuce (image prise toutes les heures).

2.6. Bilan

L'ensemble des résultats obtenus pour la partie « choix des sondes fluorescentes » est représenté dans le tableau 5. Ces résultats nous ont permis de sélectionner le Hoechst 33342 et l'EthD-1 comme marqueur de viabilité, le Hoechst33342 (à 2 µg/mL) mettant en évidence l'ensemble des cellules présentes dans l'échantillon et l'EthD-1 (à 4 µM) les cellules

mortes ou endommagées. Le $DiOC_6(3)$ a été choisi à 100 nM pour mettre en évidence l'activité mitochondriale.

Fluorochrome	Application /cible	En LabTek®		En biopuce		Remarque
		[C] testées +	[C] testées -	[C] testées +	[C] testées -	
Hoechst 33342	Noyaux	10 ; 5 ; 2 µg/mL		2 µg/mL	1 µg/mL	Bon marquage
Calcein AM	Cellules vivantes	4µM				Quenching, Saturation
EthD-1	Noyaux des cellules mortes ou endommagées	4 ; 1µM		4µM	1µM, 400nM	Bon marquage
$DiOC_6(3)$	ΔΨm des mitochondries et RE (Golgi)	40 ; 50 ; 60nM		100nM	50nM	Bon marquage, faible bleaching
TMRE	ΔΨm des mitochondries et RE (Golgi)	50nM				Bleaching
Mitotracker™ Green FM	ΔΨm des mitochondries et RE (Golgi)	1µM ; 500 ; 200nM		1µM		Bon marquage mais toxicité du produit
Fluo-4AM	variation [Ca2+] intracellulaire	8µM	6 ; 4µM			Quenching, Saturation
Red Flica™	Apoptose, caspase 3/7		3,33%			Pas de marquage visible, même avec induction
CarboxyDCFDA-2AM	Espèces réactives de l'oxygène (ROS)	10µM		10µM		Quenching, Saturation

Tableau 5 : Synthèse des résultats obtenus lors des tests réalisés sur les différents marqueurs en LabTek® et en biopuce. (ΔΨm = variation du potentiel de membrane des mitochondries, RE = Réticulum Endoplasmique, $[Ca^{2+}]$ = concentration de Calcium).

L'étape de culture en LabTek® nous a permis d'éliminer les sondes non stables dans le temps, tel que la Calcein-AM, le TMRE ou le Fluo-4AM. Les variations de fluorescences non spécifiques observées que ce soit du bleaching ou de la saturation ne permettent pas un traitement par imagerie efficace. Le RedFlica™ n'a pas permis de mettre en évidence l'apoptose pourtant présente dans l'échantillon. Il est fort probable que cette sonde ne soit pas assez concentrée, même si la concentration utilisée est préconisée pour une densité cellulaire située entre 10^4 et 10^5 (dans notre cas nous somme à 1,3 . 10^5 cellules).

Lors du passage des sondes du système LabTek® (statique) à la biopuce cultivée en condition dynamique, nous avons dû augmenter la concentration des sondes testées en raison de l'opacité des biopuces mais également du bruit de fond généré par le PDMS. Le Hoechst 33342 placé en biopuce, permet un marquage visible et stable au cours du temps. Cependant, il apparait que le marquage nécessite un temps d'incubation supérieur à 30 min

pour être optimal, en effet lors de la première heure de mise sous microscope le marquage n'est pas optimal. C'est pourquoi, le temps d'incubation pour la suite des expériences avec le Hoechst 33342 a été fixé à 1 h 30. L'EthD-1 qui marque les noyaux des cellules ne présentant plus d'intégrité membranaire a été sélectionné pour être employé à 4 µM. Même si à 1 µM d'EthD-1 un marquage était visible, nous avons souhaité limiter le temps d'exposition ainsi que l'intensité pour ne pas favoriser l'apparition de photo-toxicité. Le $DiOC_6(3)$ qui révèle l'activité mitochondriale des cellules a du être employé à une concentration plus importante en biopuce du fait de l'auto-fluorescence dans le vert du PDMS de la biopuce. Les mitochondries des cellules n'ont pu être observées correctement qu'a 100 nM de $DiOC_6(3)$: plus du double de la concentration nécessaire en LabTek®. Le choix de ces trois marqueurs est conforté par le fait que :

- le Hoechst 33342 a déjà été utilisé en « time-lapse » (Lukandu *et al.,* 2009 ; Burguillos *et al.,* 2011) et pour du HCS (Nadaciva *et al.,* 2010 ; Hu *et al.,* 2007 ; Carter and Hamm 2009 ; Lieggi *et al.,* 2010).

- l'EthD-1 bien que jamais employé en « time lapse », semble être le seul marqueur de cellules mortes non toxique. Il a d'ailleurs récemment remplacé l'iodure de propidium (IP) dans les kit Live/Dead des différents fournisseurs (invitrogen, FluoProbes, Molecular Devices, Lonza, etc…) en raison de la forte toxicité de ce dernier.

- le $DiOC_6(3)$ déjà employé en « time-lapse » (Lukandu *et al.,* 2009), présente lors de nos expériences un faible bleaching qui ne gène pas le traitement par imagerie.

Ces 3 marqueurs nous permettent d'utiliser l'ensemble des canaux possibles lors de la prise d'images fluorescentes sous microscope. Le comptage (marquage dans le bleu) réalisé ainsi que l'identification des cellules mortes (réalisée dans le rouge) sont des paramètres importants qu'il faut conserver, en revanche, il est envisageable, si l'on souhaite observer d'autres phénomènes que l'activité mitochondriale, d'échanger le $DiOC_6(3)$ par un autre marqueur qui serait visible dans le vert.

Lors de l'observation sous microscope d'hépatocytes en présence de ces trois marqueurs, un phénomène de compétition entre marqueur a été observé. Les cellules initialement marquées dans le bleu, lorsqu'elles meurent, ne présentent plus d'intégrité

membranaire, l'EthD-1 peut alors se fixer sur l'ADN des cellules. Petit à petit le marquage rouge va venir remplacer le marquage bleu au niveau des noyaux (voir figure 47). Ce résultat va générer une perte du nombre de cellules totales comptées lors du traitement des images, les cellules mortes n'apparaissant plus dans le bleu mais dans le rouge. Comme le changement de marquage se fait relativement lentement dans le temps, un co-marquage est observable, les noyaux apparaissent alors violet.

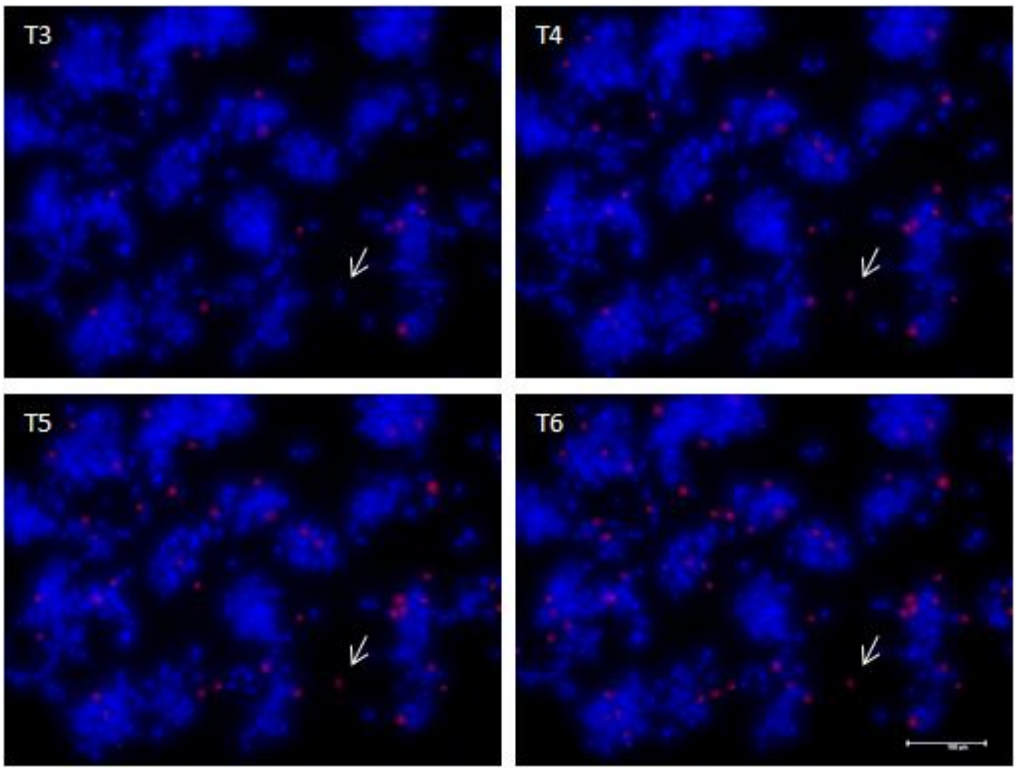


Figure 47 : Phènoméne de co-marquage des noyaux au Hoechst 33342 (bleu) et à l'EthD-1 (rouge) visible sur ces images entre T3 et T6. La flèche blanche localise le changement de couleur d'un noyau, il est co-marqué à T4, apparait en violet puis à T5 devient rouge.

3. Optimisation des paramètres de prise d'images

Comme vu précédemment, l'acquisition d'images en « time-lapse » a nécessité l'adaptation du dispositif de culture au microscope. Une fois le marquage fluorescent réalisé et le temps d'incubation à l'obscurité respecté, la biopuce et son circuit sont placés sous microscope. Le logiciel Leica ne permet de réaliser le focus que sur un canal, nous avons choisi de le faire sur le canal le plus utilisé lors du traitement par imagerie : le marquage des noyaux au Hoechst 33342 (bleu). Ce réglage permet d'obtenir des images fluorescentes de

bonne qualité puisque tous les éléments marqués sont globalement dans le même plan. En revanche, l'image en contraste de phase apparait la plupart du temps floue et s'avère donc inexploitable. Celle-ci pourrait être utilisée soit telle quelle en employant un algorithme qui compenserait le flou observé (Baldock and Graham 2000), soit en ajoutant une séquence de prise d'image qui ne prendrait que le contraste de phase. Cependant cette méthode doublerait le temps de prise d'image et donc le temps d'exposition avec les risques de photo-toxicité que cela comporte. L'intervalle de temps sélectionné pour prendre des images (1 fois par heure) pendant l'expérience a également été choisi afin de limiter le temps d'exposition et donc le risque de photo-toxicité. Ce phénomène bien décrit par la littérature peut avoir plusieurs origines : la longueur d'onde d'excitation, si celle-ci est proche des UV, ou le marqueur une fois qu'il a été excité. La photo-toxicité apparait généralement après une forte exposition ou des expositions répétées durant l'expérience (Warther *et al.,* 2010 ; Kikuta and Ishii 2012). La durée maximale d'expérience observée dans des publications en HCS est de 12 h (Lukandu *et al.,* 2010). C'est pourquoi, par précaution, nous avons choisi de fixer la durée de nos expériences en biopuce sous microscope à 10 h.

Chapitre 4 : Traitement des images de cultures cellulaires en biopuces

Ce chapitre a pour but de présenter les choix opérés pour permettre le traitement par imagerie des données issues de la culture sous microscope. Tout d'abord il a fallu sélectionner le logiciel d'imagerie. Puis, il a été nécessaire de développer un protocole permettant de récupérer les caractéristiques recherchées telles que le nombre de cellules ou la surface occupée par les cellules. Ce développement a parfois nécessité l'adaptation du protocole de culture sous microscope pour permettre l'obtention d'informations pertinentes. Les différentes étapes de traitement d'images mises au point génèrent certaines erreurs qui ont été évaluées et qui sont directement dépendantes de la qualité de la culture cellulaire des images obtenues et de la nécessité d'automatiser le traitement d'un grand nombre de données..

1. Choix du logiciel d'imagerie : CellProfiler

De nombreux logiciels d'imagerie sont actuellement présents sur le marché. Après avoir songé à utiliser le logiciel Matlab®, nous nous sommes orientés vers les logiciels dédiés au traitement d'images, plus faciles d'emploi pour les biologistes et ne nécessitant pas d'apprentissage complet d'un langage de programmation. Parmi ces logiciels présents en libre accès, ImageJ et CellProfiler ont été testés. ImageJ est un logiciel générique de traitement d'images qui offre de nombreuses fonctionnalités telles que filtrages, seuillages, détections de contours, ce qui permet de développer des « pluggings » personnalisés, mais qui nécessite la connaissance du langage de programmation (basé sur Java). Il est facile d'utilisation, cependant il n'est pas spécifique au traitement d'images cellulaires et n'est pas adapté à une analyse d'un grand nombre de données. CellProfiler est un logiciel dédié spécifiquement aux traitements d'images cellulaires à grandes échelles, il offre des outils pertinents et adaptés pour ce type d'images. Il permet une segmentation par différentes méthodes, tous les paramètres sont modulables et entièrement automatisables. Enfin, il offre une palette d'analyses plus spécifique qu'ImageJ, tel que : la correction d'éclairage, l'identification d'objet par segmentation, le mesure de la taille, de la forme, de l'intensité et de la texture des objets observés dans chaque image. Basée sur un principe de conception

modulaire, son interface est intuitive. Il aide les chercheurs à aborder une variété de questions biologiques de manière quantitative, allant des analyses classiques, par exemple, le nombre de cellules, la taille, les niveaux d'expression de protéines dans des cellules, à des analyses morphologiques complexes, tels que l'identification d'organites, de motifs subcellulaires, de l'ADN ou de la coloration des protéines. Il est également possible d'appeler des commandes d'ImageJ depuis CellProfiler (Carpenter *et al.,* 2006 ; Kamentsky *et al.,* 2011). C'est pour ces raisons que CellProfiler a été choisi pour être utilisé durant la thèse.

Il pourrait être intéressant de tester d'autres logiciels dédiés à l'imagerie comme TimeLapseAnalyser et de comparer les résultats obtenus avec ceux de CellProfiler. Le logiciel TimeLapseAnalyser mis au point en 2011 (soit 1 an après le début de la thèse) semblerait être plus adapté à une analyse en time-lapse et en 3D. Il permettrait entre autre de réaliser une identification des cellules même à forte densité (Huth *et al.,* 2011), ce qui, dans notre cas, pourrait être très utile.

2. Obtention des caractéristiques biologiques

Au total, le traitement mis au point sur CellProfiler est composé de 4 ensembles de modules dédiés chacun à l'obtention d'une caractéristique : l'ensemble appelé « Nombre de cellules totales », l'ensemble appelé « Surface occupée », l'ensemble « Nombre de cellules mortes » et enfin l'ensemble « Fluorescence des mitochondries » (Voir figure 48). Ce traitement utilise les images issues des marquages fluorescents réalisés avec le Hoechst 33342, l'EthD-1 et le $DiOC_6(3)$.

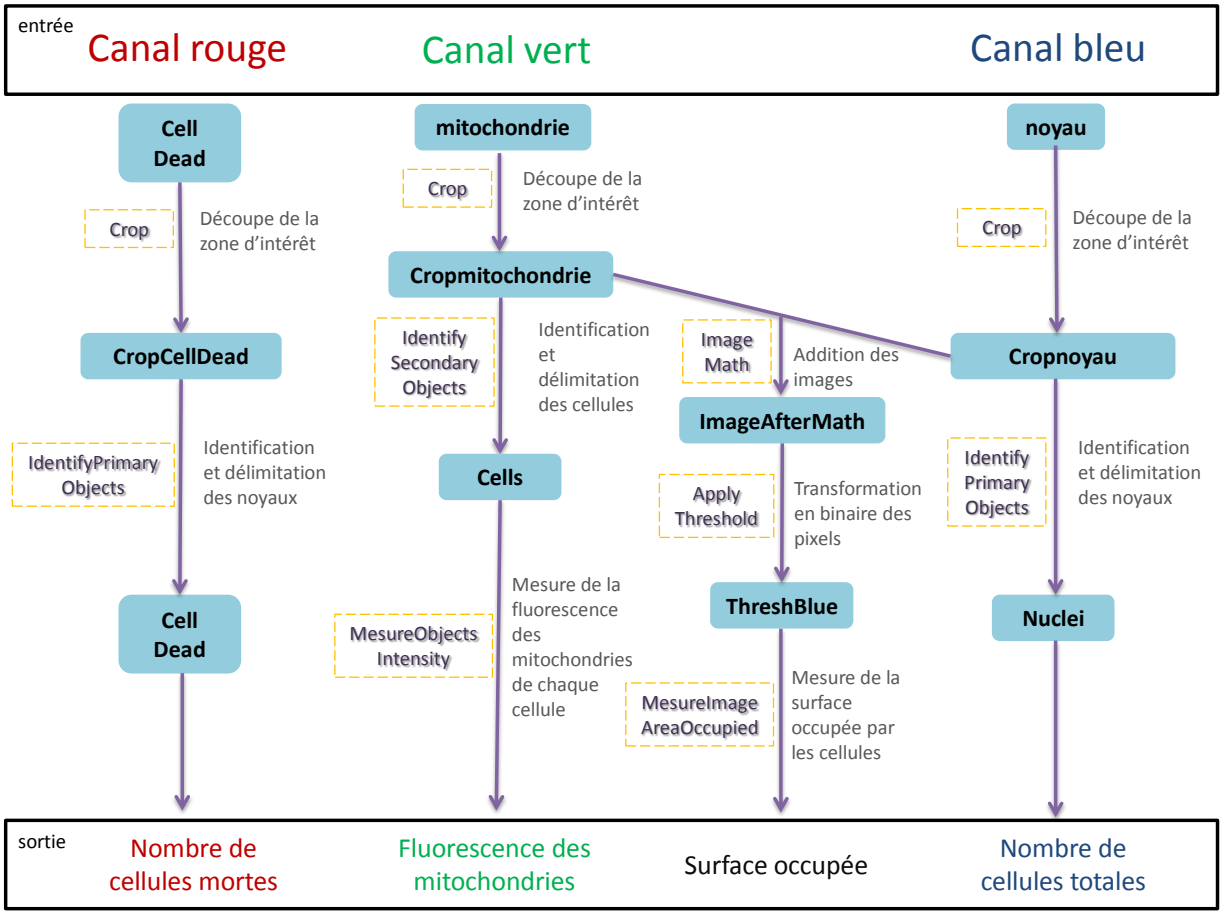


Figure 48 : Représentation du pipeline de traitement sur CellProfiler. Les données d'entrées et de sorties sont encadrées en noir. Les cadres bleus correspondent aux noms donnés aux fichiers temporaires générés après chaque traitement. Encadrés en orange sont écrits les noms des modules employés. L'écriture en gris correspond à l'action réalisée au sein de chaque module.

2.1. Nombre de cellules totales

Le premier ensemble appelé « Nombre de cellules totales » utilise le canal bleu correspondant au marquage des cellules par le Hoechst 33342. Son objectif est d'identifier le nombre de cellules totales présentes sur l'image. Après sélection de la ROI, l'image est analysée par un module (IdentifyPrimaryObjects) qui réalise une segmentation par la méthode d'Otsu à 3 classes, ce qui permet d'affiner la segmentation. La variance pondérée a été minimisée et les pixels appartenant à la classe d'intensité moyenne ont été assignés au fond et non aux noyaux. Un facteur de correction du seuillage est appliqué à 0.7 ce qui permet d'attribuer un peu plus de pixels aux cellules qu'au fond. Ce module identifie les noyaux lorsque ceux-ci ont un diamètre compris entre 10 et 50 pixels sachant que la valeur moyenne d'un noyau est de 22 pixels. Nous avons volontairement choisi un intervalle

d'identification large puisque la fluorescence peut diffuser et le marquage peut ne pas être optimal. En cas de région segmentée comme étant de la classe des noyaux mais comportant plus de 50 pixels, l'algorithme utilise l'intensité de fluorescence pour distinguer les noyaux entre eux et les compter.

2.2. Surface occupée

L'ensemble « Surface occupée » comprend : un module qui associe le canal vert et le canal bleu ; puis un module appelé « ApplyThreshold », transforme cette nouvelle image en binaire par la méthode d'Otsu à 2 classes (binarisation). Et enfin, un module (MesureImageAreaOccupied) mesure la surface en blanc considérée comme la surface occupée par les cellules. La surface occupée n'a pas été évaluée à partir de l'image en contraste de phase pour des raisons qui seront explicitées dans le paragraphe 4.2.

2.3. Nombre de cellules mortes

L'ensemble « Nombre de cellules mortes » utilise le canal rouge qui correspond au marquage des noyaux des cellules mortes ou endommagées. L'image passe par le module « IdentifyPrimaryObjects2 », où elle est segmentée par la méthode d'Otsu à 3 classes, la classe d'intensité moyenne étant assignée au fond. Un facteur de correction du seuillage est appliqué à 0.7. La variance pondérée a été minimisée. Une borne inférieure du seuillage a été fixée à 0.02 au lieu de 0 afin de soustraire le bruit de fond généré par l'auto-fluorescence des hépatocytes. Les noyaux sont identifiés lorsque ceux-ci ont un diamètre compris entre 10 et 50 pixels. L'information utilisée pour distinguer les noyaux entre eux est l'intensité de fluorescence.

2.4. Fluorescence des mitochondries

L'ensemble « Fluorescence des mitochondries » utilise le canal vert (marquage au $DiOC_6(3)$) pour obtenir comme information l'intensité de fluorescence des mitochondries propre à chaque cellule. Pour ce faire, le module « IdentifySecondaryObject » est employé, il utilise les images dans le bleu où les noyaux ont déjà été identifiés pour isoler chaque cellule les unes des autres et leur reporter le marquage des mitochondries qui leur correspond. La méthode utilisée pour identifier les mitochondries d'une cellule est appelé « propagation »,

elle permet d'attribuer la fluorescence des mitochondries aux cellules en partant du noyau et en se propageant jusqu'à forte diminution de l'intensité de fluorescence correspondant aux limites de la cellule. Les cellules sont séparées en fonction de la différence d'intensité mesurée dans le vert. La méthode de seuillage employée est celle d'Otsu Global à 2 classes. Le facteur de correction de seuillage est placé à 0.7 et le facteur de régularisation est fixé à 0.05. Puis, grâce au module « MeasureObjectIntensity » la fluorescence des mitochondries est mesurée pour chaque cellule.

Toutes les données obtenues sont ensuite exportées en fichier « csv » pour être analysées sous Excel.

3. Analyse des données

Les données générées par CellProfiler pour une expérience, nous permettent de récupérer de nombreuses informations. L'ensemble « nombre de cellules mortes » nous permet d'obtenir la valeur $m(t)$ qui correspond au nombre de cellules mortes à l'instant t. L'ensemble « fluorescence des mitochondries » nous permet d'obtenir $\overline{m_\iota(t)}$ la moyenne d'intensité fluorescente des mitochondries d'une cellule. L'ensemble « Surface occupée » nous donne comme information : n'_1, la quantité de pixels ayant pour valeur 1 dans l'image binaire à l'instant t. Et l'ensemble « Nombre de cellules totales » nous permet d'obtenir $C(t)$ le nombre de cellules totales comptées à l'instant t (Cf. chapitre 2, paragraphe 6.3).

Un calcul du pourcentage de la surface occupée S à l'instant t est réalisé à partir des données issues du traitement « Surface occupée » :

$$S(t) = \frac{n'_1}{N}\ x\ 100$$

Pour rappel, N est le nombre total de pixels. A partir de cette surface mesurée, on cherche à observer l'évolution de la surface au cours du temps. Le calcul suivant est utilisé :

$$Evolution\ de\ la\ surface\ occupée = \frac{S(t) - S(0)}{S(0)}$$

A partir des informations issues des ensembles « Nombre de cellules totales » et « Nombre de cellules mortes » il est possible de calculer le taux de mortalité à l'instant t.

$$Taux\ de\ mortalité = \frac{m(t) - m(0)}{\max\limits_{0 \le t \le 10} C(t)}\ x\ 100$$

Avec $m(t)$ le nombre de cellules mortes et $C(t)$ le nombre de cellules totales.

L'activité mitochondriale est déterminée grâce à la variation de fluorescence des mitochondries au cours du temps. On définit en premier la fluorescence des mitochondries à un temps donné :

$$Activité\ mitochondriale = \frac{\overline{I(t)} - \overline{I(0)}}{\overline{I(0)}}$$

Avec l'intensité de fluorescence des mitochondries à l'instant t :

$$\overline{I(t)} = \frac{\sum_{i=1}^{C(t)} \overline{m_i(t)}}{C(t)}$$

4. Estimation de l'erreur générée par CellProfiler

Les étapes de traitement (modules) mises au point sur CellProfiler, nécessitent le réglage de différents paramètres. Ces paramètres ont été ajustés de manière à rester constant quelque soit l'expérience tout en maintenant une qualité d'image satisfaisante. Le fait de fixer les valeurs des paramètres permet d'être indépendant des conditions expérimentales et de faciliter l'automatisation du traitement même si le marquage fluorescent n'est pas toujours le même. En revanche, ce choix induit une source d'erreur de part les variabilités inter-expérimentales. Nous avons quantifié ce taux d'erreur en testant le pipeline développé sur un échantillon de 5 expériences correspondant à des cultures en biopuce statique, dynamique et en boite de Pétri. Sur ces 5 expériences, les images provenant des 6 positions à 3 temps différents ont été analysées par CellProfiler et, en parallèle, manuellement ou avec l'aide du logiciel ImageJ afin de comparer les différences observées. Au total, l'échantillon testé correspond à n = 90 images. Ces analyses ont été réalisées sur les 4 caractéristiques biologiques recherchées : la surface occupée, le nombre total de cellules, le nombre de cellules mortes et l'activité mitochondriale.

4.1. Surface occupée par les cellules

L'image employée pour évaluer la surface occupée par les cellules est une superposition du marquage réalisé dans le bleu (nombre de cellules totales) et du marquage réalisé dans le vert (activité des mitochondries). L'image en contraste de phase ne peut pas être utilisée pour plusieurs raisons :

- la mise au point (focus) est faite sur l'image dans le bleu et se retrouve floue en contraste de phase.
- le contour des cellules est révélé lorsque celles-ci adhérent au support mais pour le cas où des cellules ont adhéré à d'autres cellules plutôt qu'au support, celles-ci ne sont pas visibles de la même manière et ne seront pas correctement prises en compte lors de la phase de binarisation du traitement d'image.

Des tests ont été réalisés sur les images en contraste de phase lorsqu'elles étaient nettes. Les résultats obtenus sont la plupart du temps inexploitables. En effet, si l'on regarde la figure 49A, on observe que certaines zones blanches correspondent au contour des cellules alors que d'autres correspondent au noyau, cette double correspondance pour une seule couleur ne permet pas d'obtenir des informations correctes après segmentation (pour les techniques utilisant l'information de niveaux de gris comme Otsu) que se soit pour réaliser une mesure de la surface occupée ou un comptage des cellules (figure 49B et C). De plus, toutes les cellules ne sont pas sur le même plan ce qui complique encore plus l'identification. Peut être serait il plus intéressant d'utiliser une autre technique de prise d'image tel que le contraste interférentiel différentiel qui présente l'avantage d'éliminer le phénomène de halo.

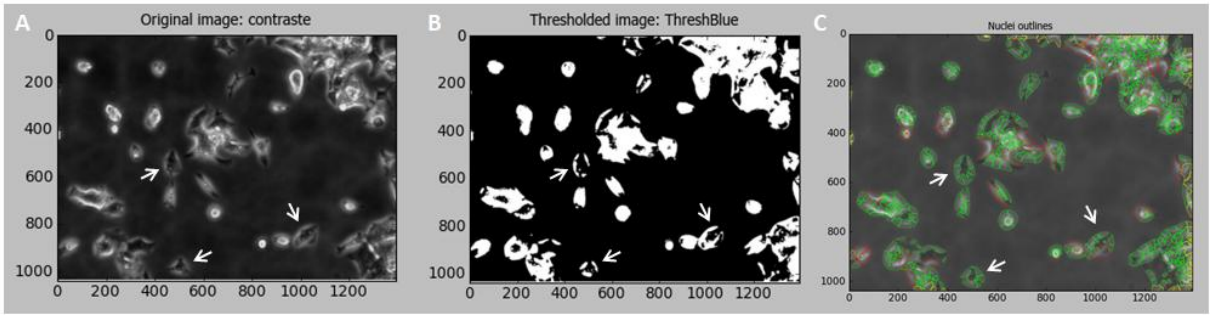


Figure 49 : Traitement de l'image en contraste de phase par CellProfiler. (A) image originale en contraste de phase, (B) binarisation de l'image en contraste de phase, (C)

comptage des cellules à partir de l'image en contraste de phase. Des exemples d'erreurs d'identification sont représentés par les flèches blanches.

Pour ces raisons, nous avons fait le choix de nous rapprocher de la surface occupée en combinant sur une image deux marquages : bleu et vert (figure 50). L'évaluation de la surface occupée mesurée par CellProfiler a été comparée avec une évaluation réalisée sur ImageJ de manière manuelle. Le logiciel ImageJ n'a été employé que pour mesurer en binaire la zone occupée par les cellules délimitée manuellement. A l'issue des 90 analyses, la différence mesurée entre l'analyse par CellProfiler et celle faite à l'aide d'ImageJ est estimée à 2,74 % (+/- 1,66).

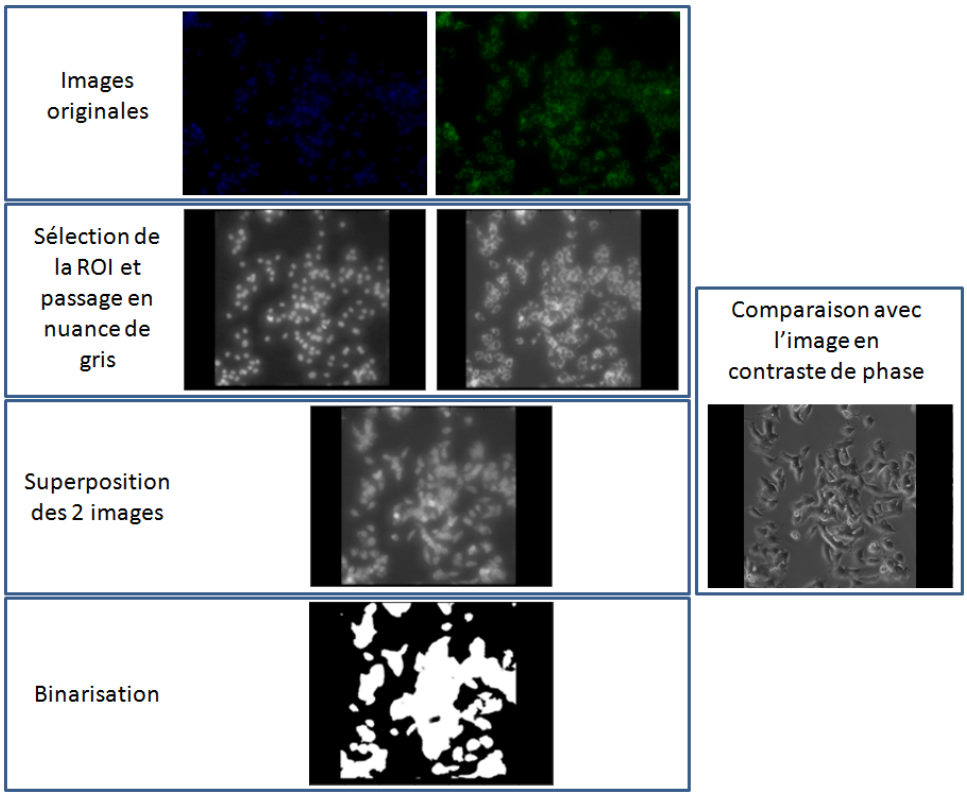


Figure 50 : Les différentes étapes de modification des images nécessaires à l'obtention de la surface occupée par les cellules dans la zone d'intérêt dans CellProfiler. Les images originales bleues (Hoechst 33342) et vertes ($DiOC_6(3)$) sont transformées en nuance de gris et la région d'intérêt (ROI) est sélectionnée. Les deux images sont ensuite superposées et l'image obtenue est binarisée par méthode d'Otsu. Ce résultat est comparé avec l'image initiale en contraste de phase.

Cette méthode d'évaluation de la surface occupée, en utilisant les canaux bleu et vert, a permis de donner des résultats très proches de ce que l'on observe sur l'image en contraste de phase. Cependant, vers la fin des expériences y compris celles de toxicité, le marquage des mitochondries au $DiOC_6(3)$ est plus faible qu'au début de l'expérience. Le

risque alors est d'avoir une partie de la cellule non visible en fluorescence, la surface occupée est alors sous-estimée. C'est particulièrement le cas lorsque les cellules sont mortes. En effet, celles-ci une fois mortes, bien que conservant leur marquage dans le bleu (tant qu'il n'est pas remplacé par le rouge), n'ont plus d'activité mitochondriale et donc plus de marquage dans le vert. La surface occupée évaluée ne correspond plus qu'à la surface occupée par le noyau et non par la cellule entière. Lors des études de toxicité, si les cellules sont mortes (non visibles dans le bleu ni dans le vert), leur surfaces ne seront pas comptabilisées. Ce point définit une limite à l'utilisation de cette méthode pour évaluer la surface occupée par les cellules.

4.2. Nombre total de cellules

L'image employée pour évaluer le nombre de cellules totales correspond au marquage bleu du Hoechst 33342. Le nombre de noyaux comptés par CellProfiler (voir figure 51) a été comparé à un comptage manuel. La différence mesurée entre l'analyse par comptage manuelle et celui opérée par CellProfiler est de 9,75 % (+/- 8,52). L'erreur de comptage réalisé par le logiciel semble être due aux deux phénomènes suivants :

- la présence d'amas cellulaire qui rend le comptage, même manuel, approximatif
- la superposition de cellules, dans ce cas le logiciel n'identifie qu'un seul élément au lieu de deux (ou plus).

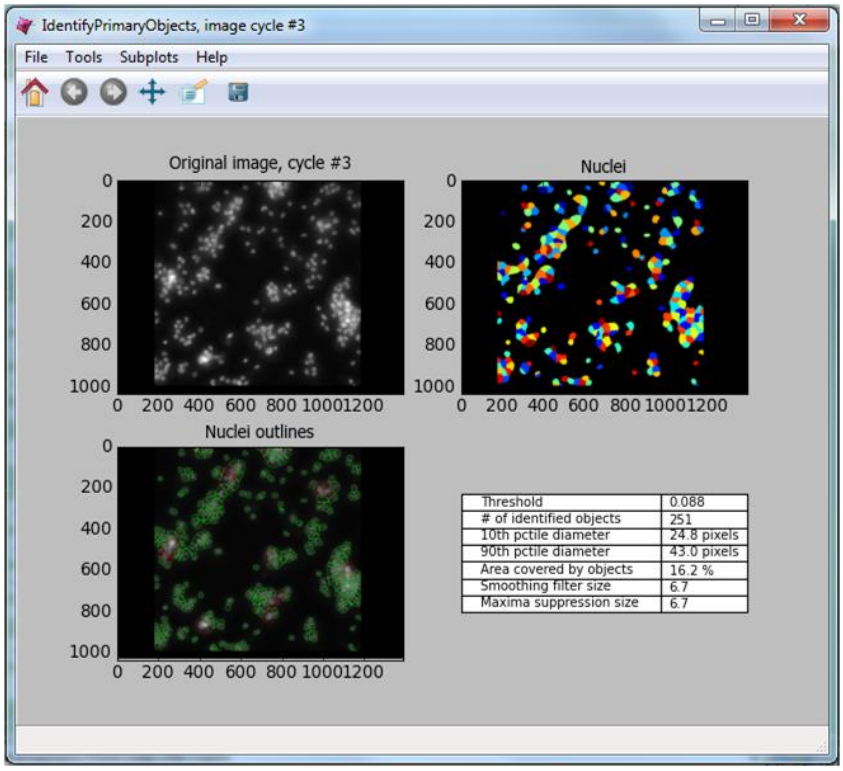


Figure 51 : Exemple d'un comptage de cellules réalisé par CellProfiler. L'image en haut à gauche correspond à l'image à analyser : ici les noyaux des cellules marqués dans le bleu par le Hoechst 33342. Celle en haut à droite représente l'identification (labellisation) des noyaux réalisée par CellProfiler en fonction des paramètres fixés. L'image en bas représente en vert les cellules comptées et en rouge les cellules non comptées par CellProfiler. Le tableau donne plusieurs renseignements tels que, le nombre de cellules comptés ou la surface occupée par les noyaux dans l'image.

Lors de l'analyse des images correspondant au marquage des noyaux (bleu ou rouge) un phénomène de compétition entre marqueurs est apparu, qu'il a fallu prendre en compte lors du traitement des images et de l'extraction des informations. En effet, une compétition entre le marquage des noyaux au Hoechst 33342 ou à l'EthD-1 a été observée, ce résultat pose un problème de comptage des cellules totales. Les cellules mortes seulement marquées dans le rouge ne seront plus comptabilisées dans le nombre de cellules totales. Si l'on additionne les noyaux marqués dans le bleu et ceux dans le rouge, on réalise là aussi une erreur, puisqu'il existe des cellules co-marquées, le nombre de cellules est alors surestimé. C'est pourquoi, en ayant posé l'hypothèse qu'en 10 h d'expérience nous n'avions pas de division cellulaire, nous avons choisi pour estimer le nombre de cellules totales d'utiliser la valeur suivante: le nombre maximum de cellules comptées dans le canal bleu sur l'ensemble des images de l'expérience pour une position donnée.

4.3. Nombre de cellules mortes

L'image utilisée pour évaluer le nombre de cellules mortes correspond au marquage réalisé avec l'EthD-1. Le nombre de noyaux comptés par CellProfiler (figure 52) a été comparé à un comptage manuel. Ayant sur la plupart des échantillons un petit nombre de cellules mortes (en moyenne 6), la moindre différence de comptage peut représenter un fort taux d'erreur, c'est pour cette raison que j'ai également estimé la différence de comptage qui est de 0,23 cellules en moyenne (+/- 0,75) soit un taux d'erreur de 13,72% (+/- 17,7). Cette différence de comptage reste faible, la labellisation réalisée par CellProfiler permet d'obtenir des données cohérentes.

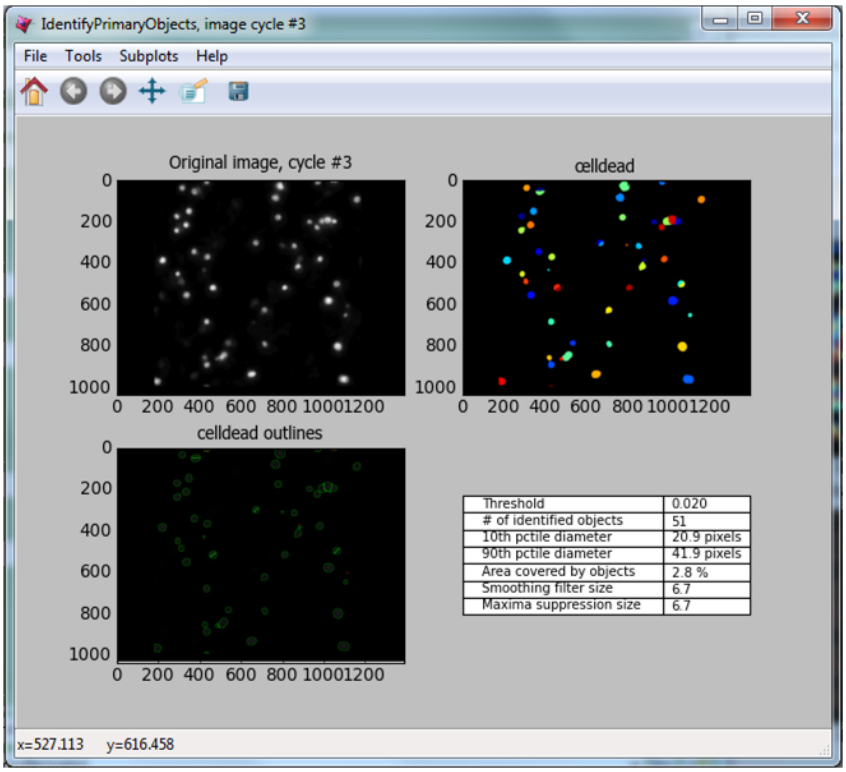


Figure 52 : Exemple de comptage des cellules mortes réalisé par CellProfiler. L'image en haut à gauche correspond à l'image à analyser : ici les cellules mortes marquées dans le rouge par l'EthD-1. L'image en haut à droite représente l'identification (labellisation) des noyaux réalisée par CellProfiler en fonction des paramètres fixés. L'image en bas représente en vert les cellules comptées et en rouge les cellules non comptées par CellProfiler. Le tableau donne plusieurs renseignements tels que, le nombre de cellules comptées ou la surface occupée par les noyaux dans l'image.

4.4. Activité mitochondriale

Pour quantifier l'intensité de fluorescence spécifique des mitochondries des cellules, nous avons choisi d'employer, dans CellProfiler, un module : « IdentifySecondaryObject » qui identifie le marquage des mitochondries pour chaque cellule. L'objectif est d'éliminer une partie du bruit de fond en enlevant les zones ne contenant pas de cellules. Un résultat de la délimitation réalisée est présenté dans la figure 53. Il présente une marge d'erreur qui dépend essentiellement de la qualité du marquage, de l'intensité mesurée et du comptage des cellules que le logiciel utilise pour attribuer à une cellule donnée une activité mitochondriale. Dans la figure 53, la flèche met en évidence une erreur d'attribution des mitochondries due à une erreur initiale de comptage. Sur l'image en haut à gauche on observe bien 2 noyaux de cellules accolés, cependant le logiciel n'en dénombre qu'un seul et attribue par la suite à la seule cellule comptée le marquage des mitochondries des deux cellules. Cette mesure de l'intensité de fluorescence des mitochondries a été comparée à une simple mesure de l'intensité de fluorescence présente sur l'image. La différence d'intensité de fluorescence entre les deux techniques de mesure a été estimée à 13,83 % (+/-9,28). L'objectif ici est d'attribuer une activité mitochondriale pour chaque cellule dénombrée, tout en s'affranchissant du bruit de fond. Le dispositif mis en place sur CellProfiler a permis d'éliminer le bruit de fond, augmentant ainsi de 13,83 % l'intensité de fluorescence mesurée. Il présente également l'avantage d'identifier les cellules mortes ne présentant plus d'activité mitochondriale, mais dont les noyaux sont encore visibles par un marquage bleu.

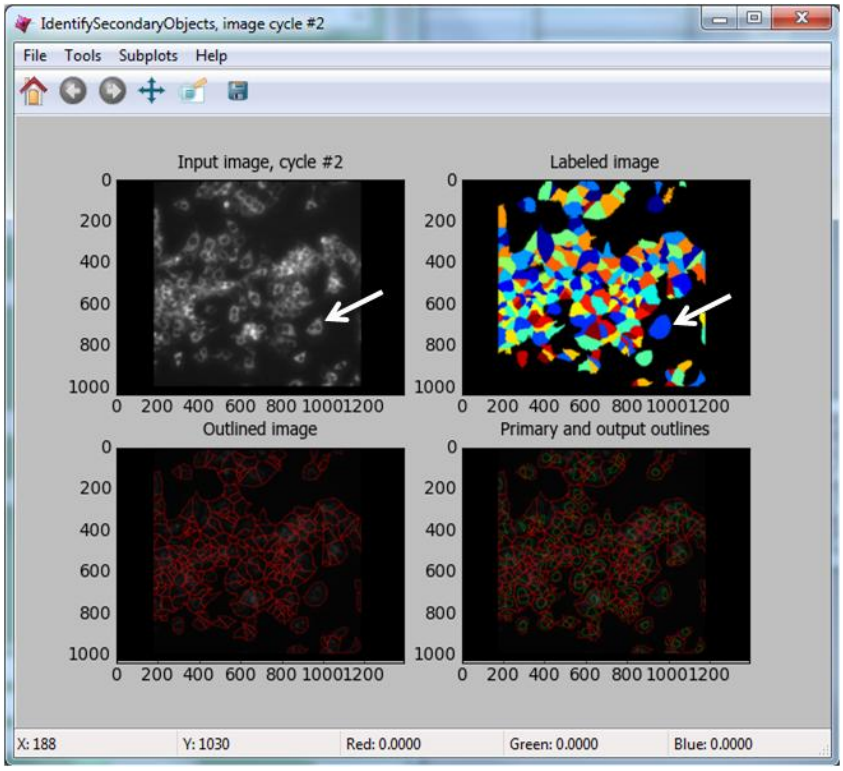


Figure 53 : Exemple d'attribution d'intensité de fluorescence des mitochondries aux cellules. L'image en haut à gauche correspond à l'image à analyser : les mitochondries marquées par le $DiOC_6(3)$. L'image en haut à droite représente les zones d'activités attribuées et labélisées par CellProfiler en fonction des paramètres fixés. Celle en bas à gauche représente en rouge les délimitations de ces zones. Et l'image en bas à droite affiche la délimitation réalisée (en rouge) par rapport au dénombrement des noyaux (en vert).

5. Bilan

Le pipeline développé sur CellProfiler permet d'obtenir comme information la surface occupée par les cellules avec un faible taux d'erreur (2,75 %). Il fonctionne correctement lorsque le marquage est optimal ; en cas de perte de marquage, il est possible que ce taux d'erreur augmente. Un bon comptage du nombre total de cellules nécessite des cellules bien séparés les unes des autres et présentes en monocouche. Les cellules mortes sont globalement bien labellisées par le logiciel, mais là encore il nécessite des cellules en monocouche. Enfin, la mesure de l'intensité de fluorescence réalisée en fonction du comptage des cellules permet de supprimer le bruit de fond, mais l'identification peut être biaisée lors d'une mauvaise labellisation des cellules. Le pipeline a été conservé et utilisé pour l'ensemble des études qui seront présentées dans la suite du manuscrit.

Ce pipeline développé sur CellProfiler a été développé dans le but d'obtenir rapidement des informations. Les paramètres ont été fixés pour permettre une bonne analyse à partir des images données. Cependant on sait que le pipeline a produit un certain nombre d'erreurs qui peuvent être minimisées par différentes étapes d'ajustement. Il serait possible d'ajouter une étape de suppression du bruit de fond qui garantira des données de meilleures qualités. Ce pipeline permet un comptage des cellules mortes et une évaluation de la surface occupée optimale, en revanche des améliorations des modules dédiés à l'évaluation du nombre total de cellules et à la mesure de l'intensité de fluorescence des mitochondries peuvent être amenées comme une modification du facteur de correction utilisé lors de la labellisation, ou une modification de la méthode de séparation des objets qui peut se faire en fonction de l'intensité de fluorescence, de la forme des cellules ou par propagation. De plus, les images correspondant à la culture en biopuce sont de moins bonne qualité que celles des contrôles en boite de Pétri. Il serait peut être plus juste de créer un pipeline propre à chaque mode de culture. Il n'est pas nécessaire d'utiliser les mêmes facteurs de correction d'image pour celles présentant très peu de bruit de fond à savoir les images des cultures en boite de Pétri.

Chapitre 5 : Caractérisation de la culture en biopuce

Ce chapitre regroupe l'ensemble des données obtenues après traitement CellProfiler des images correspondant aux cultures de cellules dans différentes conditions. L'aspect morphologique et comportemental des cellules a été étudié par le biais de différents paramètres : la surface occupée, le nombre total de cellules, le taux de mortalité et l'activité mitochondriale mise en évidence par l'intensité de fluorescence des mitochondries.

1. Impact de l'ensemencent

Un comptage post-adhésion des cellules en boite de Pétri et en biopuce a été réalisé afin d'identifier le pourcentage de cellules ayant adhéré au support après ensemencement. Pour ce faire, les deux supports de culture ont été ensemencés avec 200 000 cellules par cm^2. Après 24 h d'adhésion, les cultures ont été rincées avec du PBS puis les cellules ont été détachées et comptées. 99 % des cellules placées en boite de Pétri ont adhéré au support contre seulement 65 % en biopuce, malgré la réalisation d'un coating à la fibronectine. Ce résultat a également été observé dans d'autres études menées au laboratoire avec les biopuces microfluidiques (Legendre *et al.,* 2013). C'est pourquoi, pour la suite des tests réalisés durant ce projet, le taux d'ensemencement en boite de Pétri a été placé à 130 000 cellules par cm^2 afin de se retrouver avec la même densité cellulaire post-adhésion qu'en biopuce.

La répartition post-adhésion des cellules au sein du système de culture a été évaluée grâce aux données traitées par CellProfiler. Les données utilisées pour cette analyse correspondent au comptage à T0 dans les différentes zones (position 1 à 6) de la biopuce et de la boite de Pétri (figure 54). Pour rappel, les positions 1 et 6 correspondent à l'entrée, les positions 2 et 5 au centre et les positions 3 et 4 à la sortie de la biopuce. Les positions à l'entrée de la biopuce semblent présenter un peu moins de cellules que celles situées au centre ou en sortie de la biopuce. Mais après analyse statistique par ANOVA 1 (avec $\alpha = 0.05$), aucune différence significative n'a été observée entre les différentes positions (N = 3). On remarque qu'après adaptation du taux d'ensemencement en boite de Pétri, on retrouve

globalement le même nombre de cellules post-adhésion qu'en biopuce microfluidique. Une plus grande hétérogénéité des résultats est observée en biopuce.

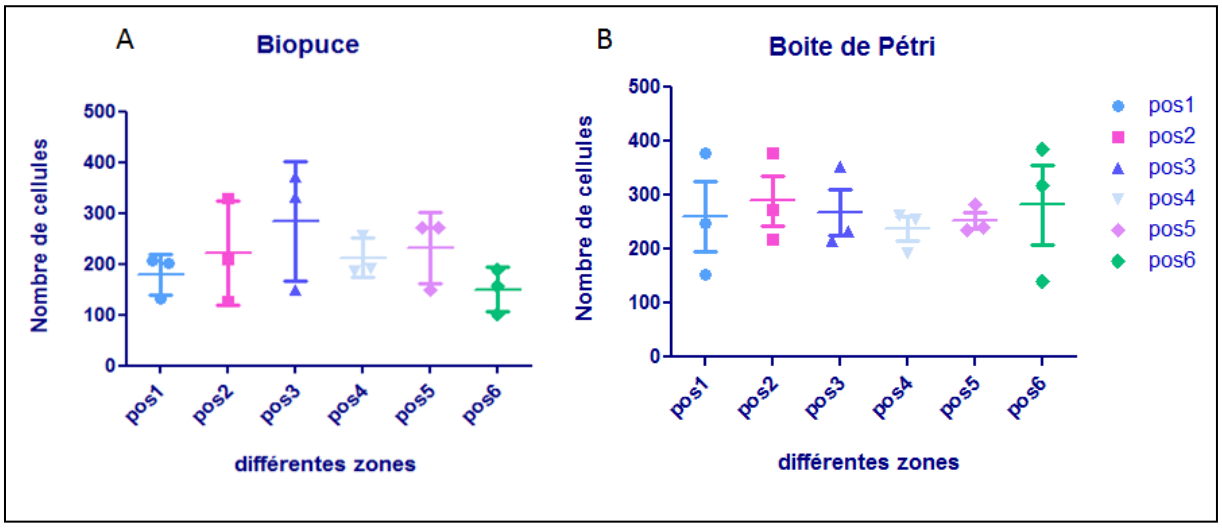


Figure 54 : Evaluation du nombre de cellules présentes dans les différentes zones de la biopuce (A) et de la boite de Pétri (B) (N=3).

Lors du début des expérimentations (T0), aucune différence significative du nombre de cellules présentes dans les différentes zones n'a été observée. Mais, ces résultats sont-ils valables dans le temps ? N'y a-t-il toujours aucune différence entre les positions au cours de la culture sous microscope ou une réorganisation des cellules peut-elle apparaitre ? Nous allons tenter de répondre à ces interrogations dans le prochain paragraphe.

2. Etude de la réorganisation des cellules au sein de la biopuce

Dans cette partie nous avons souhaité rechercher l'apparition d'une réorganisation spatio-temporelle au sein de la biopuce cultivée en dynamique, phénomène déjà mis en évidence dans la littérature (Cheng *et al.,* 2012). En d'autres termes, nous avons recherché l'apparition d'un comportement cellulaire différent selon les zones de culture dans la biopuce (position 1 à 6). Pour ce faire, nous avons étudié différents paramètres : l'évolution de la surface occupée, le nombre de cellules, le taux de mortalité ainsi que l'activité mitochondriale (via l'intensité de fluorescence). Tous ces éléments vont nous renseigner sur l'aspect morphologique et comportemental des cellules cultivées dans les différentes zones de la biopuce en condition dynamique durant 10 h (N = 3). Des tests ANOVA 1 ont été réalisés aux temps : 2 h, 5 h et 10 h pour les différents paramètres.

2.1. Evolution de la surface occupée par les cellules

L'évolution de la surface occupée par les cellules dans les différentes positions de la biopuce a été étudiée. La courbe de tendance représentant cette évolution est observable dans la figure 55.

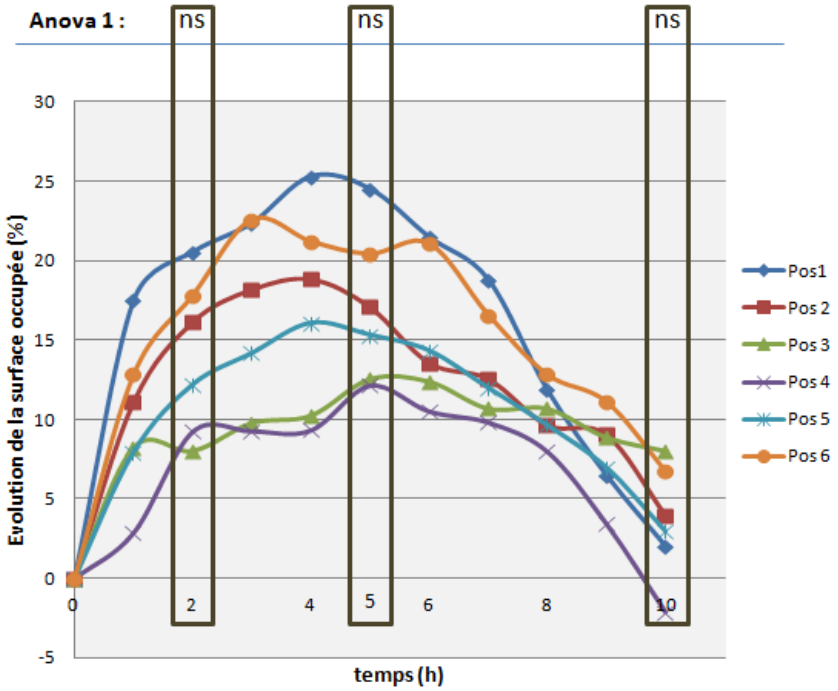


Figure 55 : Courbe de tendance de l'évolution de la surface occupée sur les 6 positions en biopuce en condition dynamique. Les tests ANOVA 1 ont été réalisés pour les résultats obtenus à 2 h, 5 h et 10 h de culture (ns : non significatif). Les écarts types n'ont pas été représentés afin de conserver la figure lisible (N = 3).

Les 6 positions présentent la même tendance, la surface occupée augmente durant les 4-5 premières heures puis diminue progressivement. Les positions semblent groupées par zone, en effet la position 1 et la 6 qui correspondent à l'entrée de la biopuce présentent une augmentation de la surface occupée un peu plus importante que les autres. Peuvent également être groupées, les positions centrales 2 et 5 ainsi que les positions 3 et 4 correspondant à la sortie de la biopuce. Les tests ANOVA 1 réalisés avec $\alpha = 0,05$, ne révèlent aucune différence significative entre les 6 positions. Ce résultat est essentiellement dû au fait que les écarts types sont élevés. En analysant les images correspondant à ces données (figure 56), on constate qu'il est difficile à l'œil nu d'évaluer l'augmentation de surface

occupée, mais l'image B correspondant à 5 h d'expérience semble être l'image présentant la plus grande surface occupée par les cellules. On peut constater qu'au cours du temps les cellules ont tendance à se regrouper et à former des amas. En effet, sur la figure 56C, les cellules sont plus regroupées, elles occupent moins de place que dans la figure 56A correspondant au début de l'expérience. La formation d'amas, après mise en dynamique de la culture a également été observée lors d'une précédente étude avec des HepG2/C3A en biopuces microfluidiques (Prot *et al.,* 2011a). Avec une densité d'ensemencement plus importante, cette réorganisation a été observé sur 72h conduisant à former un tissu en multicouche, riche en collagène, et très dense dans la biopuce. Après 72h les microstructures de la biopuce sont alors partiellement recouvertes.

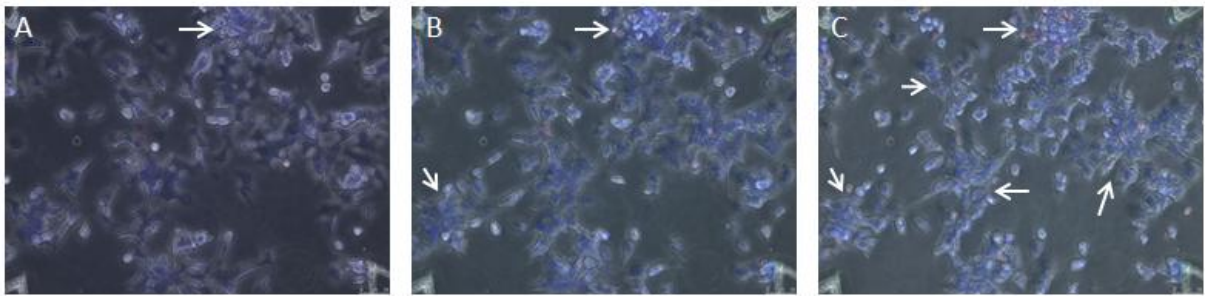


Figure 56 : Exemple d'images représentant la surface occupée par les cellules dans une chambre microfluidique de la biopuce (superposition des 4 canaux). (A) correspond au début de l'expérience : T0, (B) à T5 et C à la fin de l'expérience : T10. Quelques amas cellules sont mis en évidence par des flèches blanches.

2.2. Nombre de cellules totales

Les cellules présentes dans les 6 positions au cours du temps ont été dénombrées. Ici on ne parle pas de prolifération, sachant que les cellules sont assez mobiles au sein des biopuces, il est possible qu'une cellule puisse entrer ou sortir de la zone d'observation. Nous ne pouvons donc pas être sûrs que l'augmentation du nombre de cellules soit due à une division cellulaire. Les résultats présentés dans la figure 57 mettent en évidence un nombre de cellules relativement stable au cours du temps dans les 6 positions de la biopuce. La position 3 correspondant au centre de la biopuce semble avoir plus de cellules que les autres positions mais les tests statistiques (ANOVA 1 avec $\alpha = 0.05$) ne révèlent pas de différences significatives entre les différentes positions. Ces résultats laissent supposer, qu'outre la formation d'amas cellulaire, aucune variation du nombre de cellules dans la biopuce n'a eu

lieu au cours du temps. Les cellules ne se comportent pas différemment d'une zone à une autre dans la biopuce.

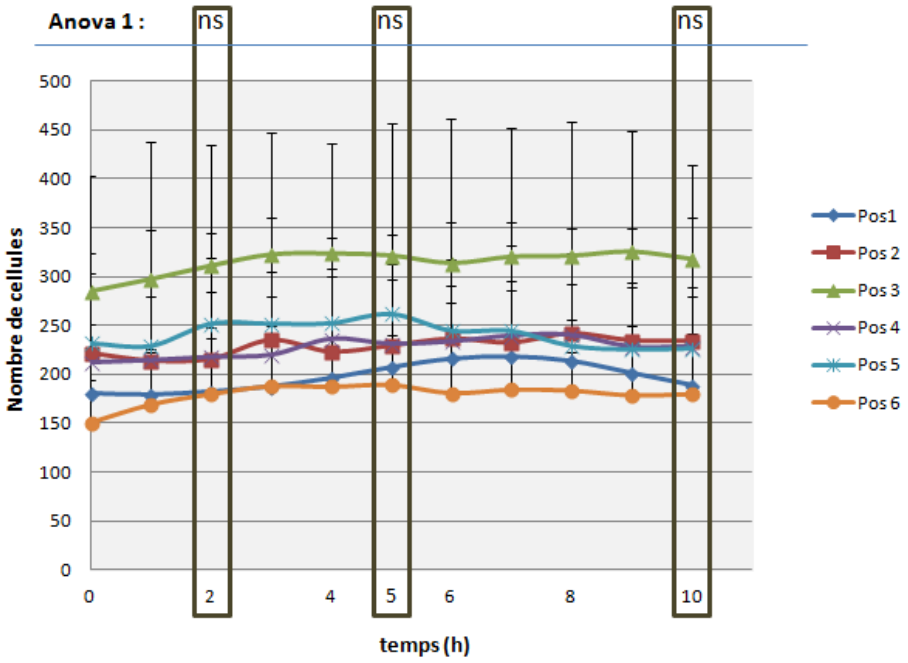


Figure 57 : Nombre de cellules au cours du temps dans les 6 positions de la biopuce en condition dynamique. Les tests ANOVA 1 ont été réalisés pour les résultats obtenus à 2 h, 5 h et 10 h de culture (ns : non significatif ; N = 3).

2.3. Taux de mortalité des cellules

Le taux de mortalité des cellules dans les différentes positions de la biopuce a été étudié (figure 58). Les 6 positions présentent la même tendance, c'est à dire une augmentation de la mortalité proche des 11 % après 10 h de culture en dynamique. On peut remarquer en position 1 et 3, un taux de mortalité légèrement supérieur aux autres positions après 10 h de culture, cependant cette différence n'est pas significative d'après les tests ANOVA 1 (avec $\alpha = 0,05$). La présence d'un taux de mortalité non négligeable en biopuce soumise à un flux sera expliquée plus en détails dans la suite de ma thèse (paragraphe 4).

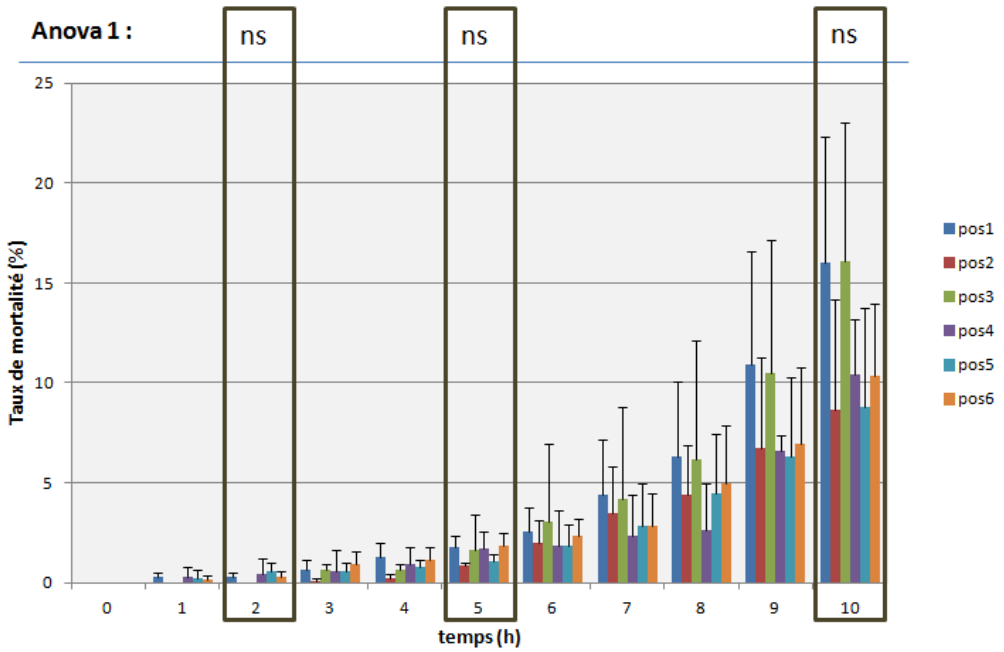


Figure 58 : Taux de mortalité de la population cellulaire dans les 6 positions de la biopuce. Les tests ANOVA 1 ont été réalisés pour les résultats obtenus à 2 h, 5 h et 10 h de culture (ns : non significatif ; N = 3).

2.4. Activité mitochondriale

L'évolution de l'intensité de fluorescence des mitochondries a été étudiée pour les 6 positions de la biopuce pendant 10 h (figure 59). Les résultats mettent en évidence une augmentation de la fluorescence très importante durant les 2 premières heures puis plus faible jusqu'à 6h de culture. De 6 à 10 h de culture, l'intensité de fluorescence diminue progressivement, l'évolution passe de 2 à 1,5 pour les positions 1 et 2. Les 6 positions présentent la même tendance et les résultats ne sont pas significativement différents les uns des autres (tests ANOVA 1 avec $\alpha = 0,05$). Les cellules semblent avoir la même activité mitochondriale quelque soit leur positionnement dans la biopuce.

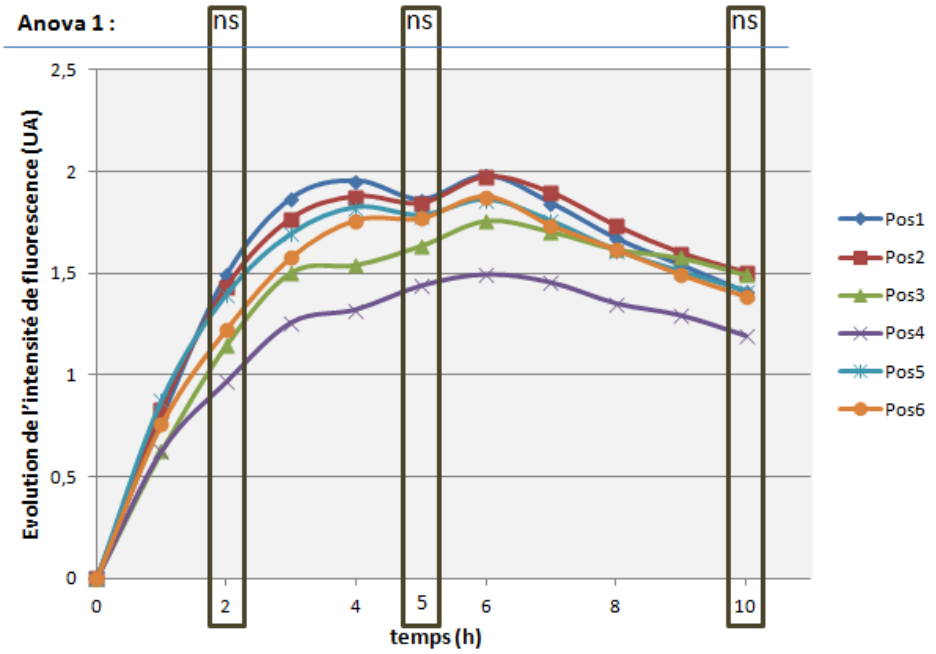


Figure 59 : Courbe de tendance de l'évolution de l'intensité de fluorescence des mitochondries pour les 6 positions de la biopuce. Les tests ANOVA 1 ont été réalisés pour les résultats obtenus à 2 h, 5 h et 10 h de culture (ns : non significatif ; α = 0.05) (N = 3).

Nous avons cherché à regarder plus en détails l'activité mitochondriale et en particulier la répartition de l'intensité de fluorescence dans la population cellulaire pour chaque position (figure 60). On peut constater que les 6 positions présentent les mêmes tendances. Au début de l'expérience (T0), une grande partie de la population cellulaire présente une intensité de fluorescence faible : 93 % des cellules sur les 6 positions présentent une intensité de fluorescence comprise entre 0,07 et 0,1 UA. Avec le temps, l'activité mitochondriale des cellules et la distribution de la fluorescence augmente, par exemple pour la Position 1 à T5 : les cellules sont réparties entre les seuils de fluorescence allant de 0,2 à 0,9 UA. A la fin de l'expérience (T10), l'intensité de fluorescence a légèrement diminué mais les cellules sont encore réparties entre les seuils de fluorescence compris entre 0,13 et 0,8 UA pour la position 1.

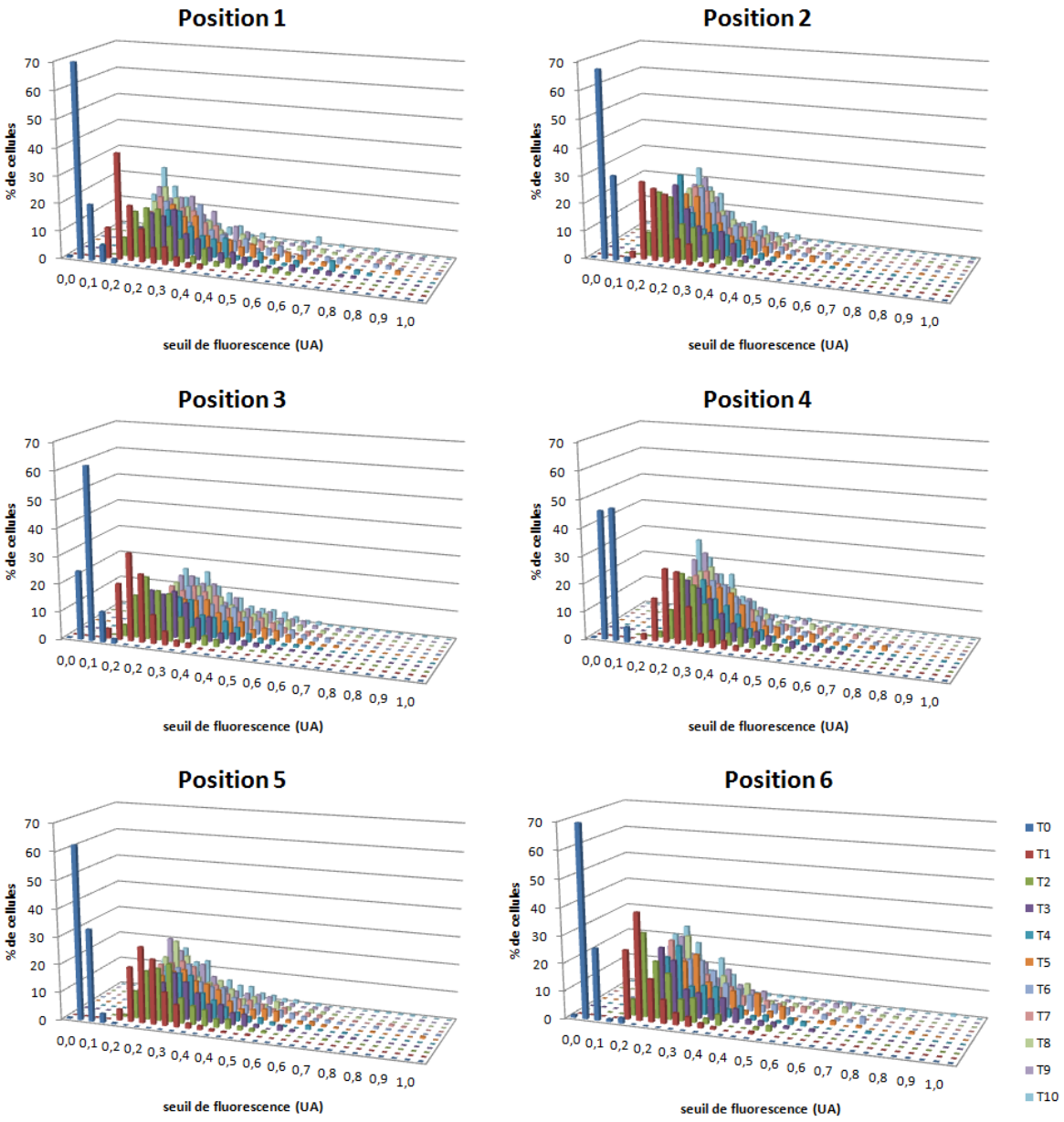


Figure 60 : Histogramme 3D de la répartition de l'intensité de fluorescence des mitochondries pour une population cellulaire dans les 6 positions de la biopuce. L'axe X représente les seuils de fluorescence (UA), l'axe Y : le pourcentage de cellules appartenant à un des seuils donné, l'absence de fluorescence correspondant au seuil 0,0 et la saturation de la fluorescence au seuil 1,0. L'axe Z représente le temps allant de T0 : le début à T10 : la fin de l'expérience.

Les résultats obtenus pour cette partie sur la mise en place d'une réponse spatio-temporelle au sein de la biopuce, que ce soit l'étude de la surface occupée, le nombre de cellules, le taux de mortalité ou l'activité mitochondriale, tous vont dans le même sens : il ne semble pas y avoir, dans nos conditions, de comportement cellulaire différent selon les

zones de culture, que se soit à l'entrée, au milieu ou en sortie de biopuce. Pour la suite de la thèse, nous supposerons que les 6 positions ont le même comportement sur les 10 h d'expérience. Nous utiliserons alors la moyenne des 6 positions de la biopuce.

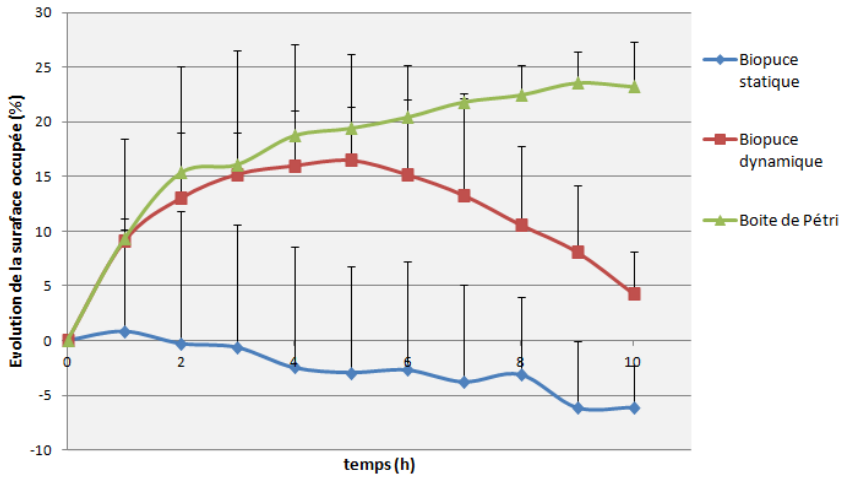
3. Comparaison des cultures réalisées en biopuces ou en boite de Pétri

Après avoir analysé le comportement des cellules dans une biopuce microfluidique cultivée en dynamique, nous allons comparer le comportement des cellules au cours du temps dans 3 conditions différentes : en biopuce statique, en biopuce dynamique et en boite de Pétri. Les paramètres étudiés sont : l'évolution de la surface occupée, le taux de mortalité et l'activité mitochondriale des cellules. Ces paramètres vont nous permettre de savoir si les cellules se comportent différemment selon les conditions de culture.

3.1. Evolution de la surface occupée par les cellules

Dans les trois conditions : biopuce statique, biopuce dynamique et boite de Pétri, la surface occupée par les cellules a été évaluée (N = 3). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 61.

A



B

Anova 2	t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8	t9	t10
Biopuce statique Vs Biopuce dynamique	ns	ns	ns	*	**	***	**	**	*	*	ns
Biopuce statique Vs Boite de Pétri	ns	ns	*	**	***	***	***	***	***	***	***
Biopuce dynamique Vs Boite de Pétri	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	***

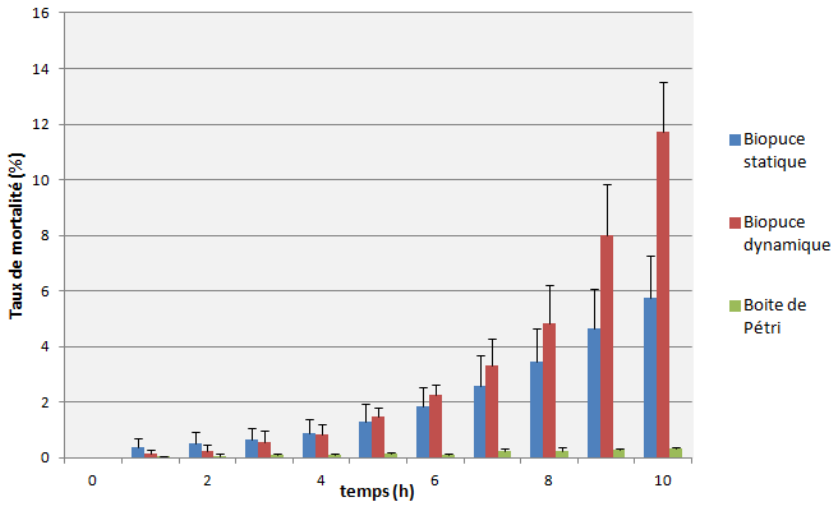
Figure 61 : (A) Evolution de la surface occupée au cours du temps, en biopuce statique (courbe bleu), en biopuce dynamique (courbe rouge) et en boite de Pétri (courbe verte). (B) Tests ANOVA 2, réalisés sur l'ensemble des données (ns : non significatif ; * = P < 0.05 ; ** = P < 0.01 et *** = P < 0.001) (N = 3).

La surface occupée par les cellules en biopuce statique reste stable les deux premières heures puis chute faiblement pour arriver après 10 h de culture à 6 % de surface occupée en moins. Pour la biopuce cultivée en dynamique, la surface occupée augmente jusqu'à 5 h de culture puis décroit ; après 10 h de culture la surface occupée a augmenté de 4,5 % par rapport au début de l'expérience. L'évolution de la surface occupée par les cellules en boite de Pétri augmente durant tout le temps de l'expérience, à 10 h d'expérimentation la surface occupée a augmentée de 23 % par rapport à T0. Les tests statistiques réalisés par ANOVA 2 avec $\alpha = 0,05$ (figure 61B), révèlent une différence significative entre la condition en biopuce statique et celle en boite de Pétri dès la deuxième heure de l'expérience. Les résultats obtenus entre T2 et T9 avec les conditions biopuce statique et biopuce dynamique semblent significativement différents. Les conditions biopuce dynamique et boite de Pétri semblent différentes à partir de 9 h d'expérience. L'étalement des cellules semble se faire de la même manière en biopuce dynamique et en boite de Pétri durant les premières heures de culture contrairement à celles cultivées en biopuce statique. La biopuce présente un espace de culture restreint qui ne peut contenir que 45 µL de milieu de culture. On peut supposer que les nutriments contenus dans ce milieu sont rapidement consommés et après quelques heures, si le milieu de culture n'est pas renouvelé, il ne permet plus d'assurer le maintien de la culture cellulaire. Ce qui peut expliquer la diminution de la surface occupée en biopuce statique. Cependant des études antérieures utilisant des conditions de culture des HepG2/C3A en biopuces microfluidiques proches de nos conditions, révèlent la présence de glutamine et de glucose dans le milieu de culture après 24 h de culture en condition statique (Baudoin 2008). Des analyses du milieu de culture des hépatocytes à la fin de nos expériences devraient être menées afin de trouver la cause de la diminution de la surface occupée par les cellules en biopuce statique.

3.2. Taux de mortalité des cellules

Le taux de mortalité a été calculé pour les 3 conditions avec les données des 10 h d'expérience (N = 3) (figure 62A). Une analyse statistique a également été réalisée par ANOVA 2 avec $\alpha = 0,05$ (figure 62B).

A



B

Anova 2	t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8	t9	t10
Biopuce statique Vs Biopuce dynamique	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	***
Biopuce statique Vs Boite de Pétri	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	***	***	***
Biopuce dynamique Vs Boite de Pétri	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	***	***	***	***

Figure 62 : (A) Taux de mortalité de la population cellulaire dans les 3 conditions de culture : biopuce statique (bleu), biopuce dynamique (rouge) et en boite de Pétri (vert). (B) Les tests ANOVA 2 ont été réalisés sur l'ensemble des données (ns : non significatif ; * = P < 0.05 ; ** = P < 0.01 et *** = P < 0.001 ; N = 3).

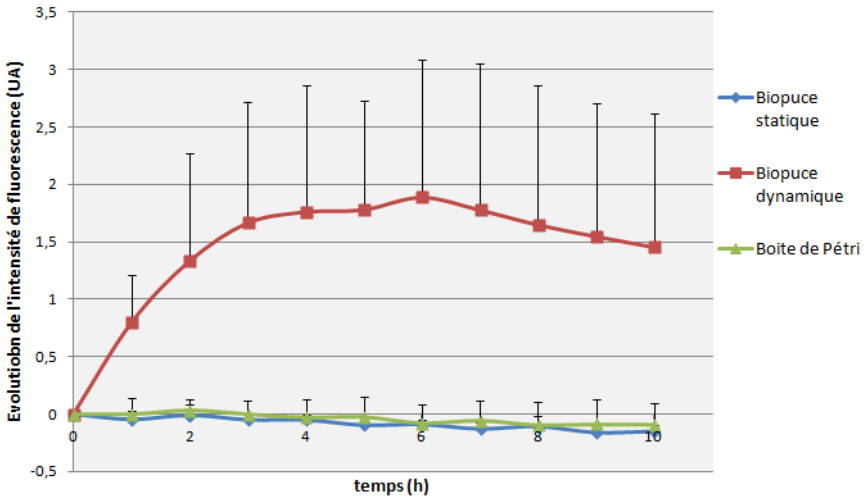
Les résultats obtenus pour la biopuce statique révèlent une augmentation progressive de la mortalité qui atteint 5,75 % (+/- 1,5 %) après 10 h de culture. La condition biopuce dynamique montre également une augmentation de la mortalité au cours du temps, un peu plus importante que la précédente condition, puisqu'à T10 sa valeur est de 11,7 % (+/- 1,78 %). Les résultats de la culture en boite de Pétri présente un taux de mortalité très faible voir négligeable, à la fin de l'expérience il n'est que de 0,33 % (+/- 0,06 %). Jusqu'à 5 h d'expérimentation, aucune différence significative n'est visible entre les 3 conditions, en revanche à T6 les conditions biopuce dynamique et boite de Pétri présentent une différence significative avec $P < 0.01$. Puis à T7 c'est la condition biopuce statique qui présente une différence significative de l'ordre de $P < 0.01$ avec la culture en boite de Pétri. Les conditions en biopuce statique et dynamique s'avèrent différentes à partir de 9 h de culture. Ces résultats nous permettent de penser que l'environnement de culture au sein de la biopuce est différent de celui en boite de Pétri. Pour la biopuce cultivée en condition statique, la présence de cellules mortes à hauteur de 5,75 % après 10 h, pourrait s'expliquer de la même manière que dans le paragraphe précédent : l'appauvrissement du milieu de culture ne

permet plus d'assurer le maintien de la culture cellulaire. Ce résultat est conforté par une étude antérieure. L'estimation du pourcentage de cellules mortes en biopuce statique après 24 h de culture est de 13 % (Baudoin 2008). La présence d'un nombre de cellules mortes non négligeable en biopuce dynamique n'est pas due à l'appauvrissement du milieu puisque celui-ci est renouvelé continuellement grâce au débit imposé de 10 µL/min. Le paragraphe 4, sera consacré à discuter la cause de la mortalité en biopuce dynamique.

3.3. Activité mitochondriale

L'activité mitochondriale représentée par l'intensité de fluorescence des mitochondries des cellules cultivées dans les 3 conditions a été mesurée au cours du temps grâce au marquage réalisé par le $DiOC_6(3)$ (figure 63) (N = 3).

A



B

Anova 2	t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8	t9	t10
Biopuce statique Vs Biopuce dynamique	ns	ns	ns	**	**	**	**	**	**	**	*
Biopuce statique Vs Boite de Pétri	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Biopuce dynamique Vs Boite de Pétri	ns	ns	ns	*	**	**	**	**	**	*	*

Figure 63 : (A) Evolution de l'intensité de fluorescence des mitochondries pour les 3 conditions. (B) Les tests ANOVA 2 ont été réalisés sur l'ensemble des données (ns : non significatif ; * = P < 0.05 ; ** = P < 0.01 et *** = P < 0.001) (N = 3).

On constate que les conditions biopuce statique et boite de Pétri présentent la même tendance : l'intensité de fluorescence reste faible au cours du temps, elle diminue même légèrement lors des dernières heures de cultures. A 10 h de culture, l'évolution de l'intensité est de -0,15 pour la biopuce statique et de -0,08 pour la culture en boite de Pétri, soit une

diminution respective de l'intensité de 15 et 8 %. Les tests statistiques montrent qu'il n'existe aucune différence significative d'activité mitochondriale entre la biopuce statique et la culture en boite de Pétri durant l'ensemble de l'expérience. L'intensité de fluorescence des mitochondries des cellules cultivées en biopuce dynamique augmente durant les 6 premières heures, puis diminue faiblement pour atteindre une valeur 1,45 fois plus élevé que celle à T0. Dès 3 h de culture, la biopuce dynamique présente une activité mitochondriale significativement différente des deux autres conditions. La culture en dynamique augmente l'activité mitochondriale des cellules dès les premières heures de culture. Les cellules cultivées en biopuces soumises à un flux semblent avoir un comportement différent que celles cultivées en conditions statiques, cette augmentation du ΔΨm est un indicateur important qui peut témoigner de différents phénomènes : stress, apoptose. Il a été démontré dans la littérature que le stress joué un rôle critique dans la régulation des CYP chez les hépatocytes, il induirait entre autre l'expression des CYP1A (Daskalopoulos *et al.,* 2012). Une précédente étude réalisée avec les biopuces microfluidiques a mis en évidence une surexpression des CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP3A5 et CYP3A7 (Prot *et al.,* 2011a). L'augmentation du ΔΨm observé avec le $DiOC_6(3)$ pourrait donc être un témoin de stress qui conduirait les cellules à sur-exprimer une partie des CYP.

4. Effet toxique en biopuce dynamique

Avant d'identifier la cause de la mortalité, nous avons situé la position des cellules mortes dans les micro-chambres et analysé un lien possible entre la structuration de la biopuce et la présence des cellules mortes.

4.1. Localisation des cellules mortes

Pour rappel, les biopuces sont composées d'un ensemble de rangées, elles-mêmes composées d'une succession de canaux et de micro-chambres. Ces micro-chambres sont les zones que nous avons souhaité étudier. Des simulations d'écoulement en biopuce avec un débit fixé à 10 µl/min ont déjà été réalisées grâce au logiciel Fluent (Baudoin *et al.,* 2007), une partie des résultats obtenus est représentée dans la figure 64.

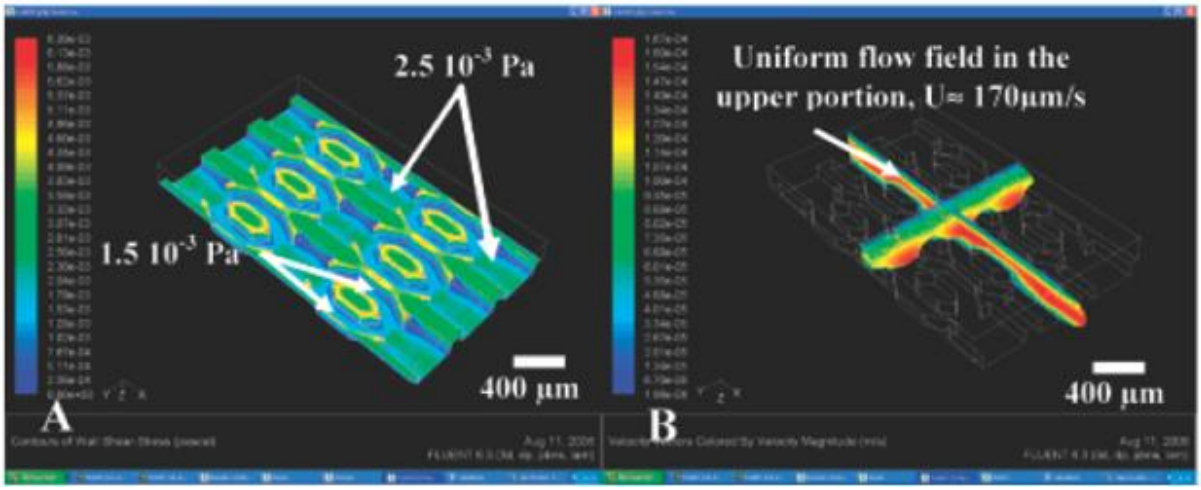


Figure 64 : Simulation d'écoulement fixé à 10 µl/min en biopuce microfluidique. (A) Les contraintes de cisaillement, (B) Les profils de vitesse (d'après Baudoin *et al.,* 2007).

On peut remarquer dans la figure 64A que les micro-chambres présentent une contrainte de cisaillement la plus élevée en leur centre. Les cellules subiront des pressions d'une intensité de l'ordre de $2{,}5.10^{-3}$ Pa imposées par le flux. Les profils de vitesse d'écoulement du flux sont représenté en figure 64B. Dans l'épaisseur de la biopuce la vitesse d'écoulement la plus importante est observée en plein milieu de la biopuce, ce phénomène ne favorise pas la prolifération des cellules en pluri-couches. Mais cela laisse supposer que les cellules poussant en hauteur auront tendance à être plus facilement stressées ou éluées. Ces résultats nous ont incités à observer, plus en détails, le comportement des cellules dans la zone centrale (voir figure 65) des micro-chambres en particulier l'apparition des cellules mortes.

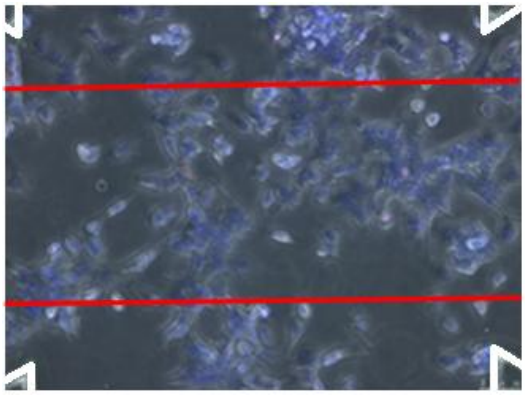


Figure 65 : La zone d'observation correspond à la zone centrale délimitée par les bandes rouges.

Les images correspondant aux 3 expériences réalisées en biopuces dynamique ont été observées. Nous avons tout d'abord constaté que la plupart des cellules mortes se trouvaient au sommet d'amas cellulaire quelle que soit la zone de la micro-chambre observée (voir figure 66). Ainsi il est possible, que la vitesse d'écoulement ait un impact sur l'apparition des cellules mortes.

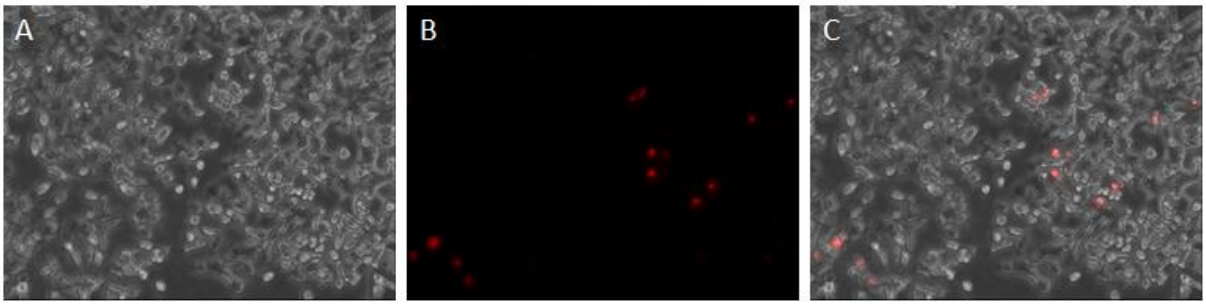


Figure 66 : Exemple de cellules mortes observées dans des amas cellulaires présents dans une micro-chambre de la biopuce microfluidique. (A) Image en contraste de phase, (B) marquage à l'EthD-1 et (C) superposition des 2 images.

Un comptage des cellules mortes dans la zone centrale et en dehors a été réalisé au temps T5 et T10. Puis nous avons évalué parmi les 36 images analysées, la répartition des cellules mortes, ces résultats sont présentés dans le tableau 6. On constate, qu'à T5 : correspondant au temps d'apparition des premières cellules mortes, 44 % des images présentent plus de cellules mortes en dehors de la zone centrale. A la fin de l'expérience (T10), la tendance s'est inversée, 44,5 % des images présentent plus de cellules mortes dans la zone centrale. Le nombre d'images présentant une répartition égale des cellules mortes dans les micro-chambres a également augmenté. L'apparition des premières cellules mortes ne semble pas être liée aux contraintes de cisaillement imposées par le flux à l'intérieur de la biopuce. En revanche, à la fin de l'expérience la zone en micro-chambre présentant les contraintes de cisaillement les plus élevées comptabilise un plus grand nombre de cellules mortes. Le flux imposé en biopuce semble avoir un impact visible à long terme, il provoquerait un stress qui déclencherait un processus apoptotique dans les cellules. En effet, l'apoptose : mort cellulaire programmée, est un phénomène relativement long à se mettre en place, les premières cellules mortes apparaissant 6 h après l'induction de l'apoptose (Krysko *et al.,* 2008 ; Feng *et al.,* 2010). L'apoptose est un phénomène faisant intervenir de nombreuses protéines qui peuvent être identifiées par un marquage ciblé (Cf.

paragraphe 4.4). La nécrose est une mort qui se manifeste par un éclatement de la membrane lipidique, ce processus est rapide, il peut être identifié par un marquage des membranes cellulaires (Larbert 2013). Il serait intéressant de rechercher les marqueurs d'apoptose ou de nécrose afin d'identifier le type de mort observé dans notre cas, le temps est un premier indicateur car il est peu probable qu'une mort apparu avant 6 h de culture soit dû à l'apoptose, dans ce cas la nécrose sera privilégiée.

Pourcentage d'images présentant	t5	t10	tous temps
plus de cellules dans la zone qu'en dehors	38,89	44,44	41,67
autant de cellules dans les deux zones	16,67	33,33	25,00
plus de cellules en dehors que dans la zone	44,44	22,22	33,33

Tableau 6 : Evaluation de la localisation des cellules mortes dans les micro-chambres après 5 h et 10 h d'expérience (N = 36).

Afin d'identifier la cause de cette mortalité observée en biopuce cultivée en dynamique, plusieurs hypothèses ont été posées. La mortalité serait provoquée:

- par le flux imposé lors de la culture en dynamique

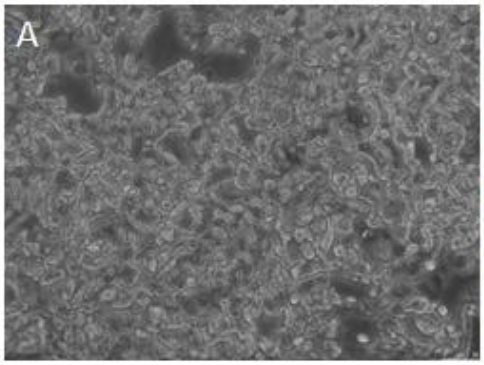
- par la présence des sondes fluorescentes

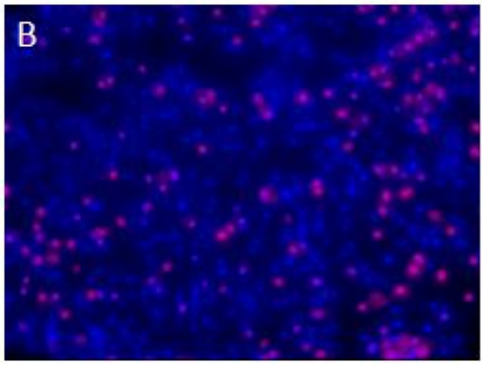
- par le flux imposé et la présence des sondes fluorescentes

4.2. Effet dynamique seul

Afin de visualiser l'effet de la culture en dynamique sans utiliser les sondes fluorescentes, des cellules ont été cultivées en biopuce dynamique en incubateur classique pendant 24 h. Puis elles ont été marquées avec les 3 sondes fluorescentes et placées sous microscope pour la prise d'images (N = 3). Les résultats obtenus (figure 67), révèlent qu'après 24 h de culture en dynamique en incubateur classique sans les marqueurs fluorescents et donc sans risque de photo-toxicité, 22 % (+/- 7,3%) des cellules sont mortes. Les cellules visibles en contraste de phase sont globalement bien étalées. Il est impossible de

distinguer avec ces images les cellules mortes des cellules vivantes. L'utilisation des sondes fluorescentes permet de mettre en évidence un taux de mortalité non négligeable qui dans notre cas est dû à la fluidisation de la culture.





C Taux de mortalité	Moyenne	Ecart type
biopuce cultivée en dynamique pendant 24h sans sondes fluorescentes	22,126	7,28

Figure 67 : Mortalité observée en biopuce cultivée pendant 24 h en dynamique sans sondes fluorescentes. (A) image en contraste de phase, (B) superposition du marquage des cellules totales (bleu) et du marquage des cellules mortes (rouge), (C) tableau présentant le taux de mortalité obtenu après traitement des images de type (B) par CellProfiler.

Le flux même utilisé à faible débit (10 µL/min) provoque une certaine mortalité dans la population cellulaire. Un système microfluidique mis au point en 2012, présente un taux de mortalité proche de 10 % en utilisant un flux fixé à 1,3 µL/min pour assurer la culture des cellules pendant 2 jours (Booth and Kim 2012). Ce résultat montre qu'il est fort possible qu'une partie de la mortalité observée lors de la culture en biopuce dynamique sous microscope soit due à la perfusion. La culture en dynamique rendrait les cellules plus sensibles à leur environnement voir stressées, certaines d'entre elles s'engageraient alors vers un processus d'apoptose. De précédentes études réalisées sur les HepG2/C3A cultivées en biopuces, révèlent pourtant que très peu de cellules mortes sont observées après 72 h de cultures en dynamique, le nombre de cellules a même été multiplié par 2 (Prot *et al.,* 2011 ; Baudoin 2008). Il est possible que le flux ait fini par éluer les cellules mortes. En effet, les cellules mortes visibles après 10 h de culture en dynamique vont avec le temps se fragmenter, être lyser et finalement disparaitre. Il est également possible qu'une fois la culture cellulaire adaptée à la présence du flux très peu de cellules mortes apparaissent.

C'est la concluison à laquelle est arrivée L. Choucha-Snouber qui a mis en évidence la présence d'un stress oxidatif chez les MDCK dans nos biopuces en début de culture (24 h) sans présence d'une forte mortalité après 72 h (Choucha-Snouber *et al.,* 2012a). Une autre hypothèse peut se poser, nos conditions sont différentes des précédentes études menées, de par la présence de sondes fluorescentes et de l'utilisation d'un microscope avec incubateur intégré. Nos conditions pourraient donc être moins favorables au développement de la culture cellulaire en biopuce sous microscope.

4.3. Effet des sondes fluorescentes

L'hypothèse selon laquelle les sondes fluorescentes seraient uniquement responsables de la mortalité observée en biopuce dynamique semble peu probable. En effet, dans la figure 62, la culture en boite de Pétri faite dans les mêmes conditions que la biopuce dynamique avec également les 3 marqueurs fluorescents ne présente que très peu de cellules mortes (0,33 % de mortalité). Ainsi, la présence seule des marqueurs ne semble pas être à l'origine de la toxicité observée en biopuce dynamique.

4.4. Effet dynamique combiné à la présence des sondes fluorescentes

L'hypothèse que la mortalité est induite par la combinaison de la culture en dynamique et la présence des marqueurs nous semble plausible. Nous avons voulu savoir si la mortalité pouvait être due à la présence d'une sonde chimique en particulier. Nous les avons donc testés séparément en biopuce dynamique, puis à l'issue des 10 h de culture, un second marquage contenant les autres marqueurs a été réalisé afin d'obtenir les mêmes données que dans la condition biopuce en dynamique. Pour chaque marqueur fluorescent utilisé séparément nous avons évalué son effet sur la culture cellulaire par calcul de la mortalité à la fin de l'expérience (N = 1) (figure 68).

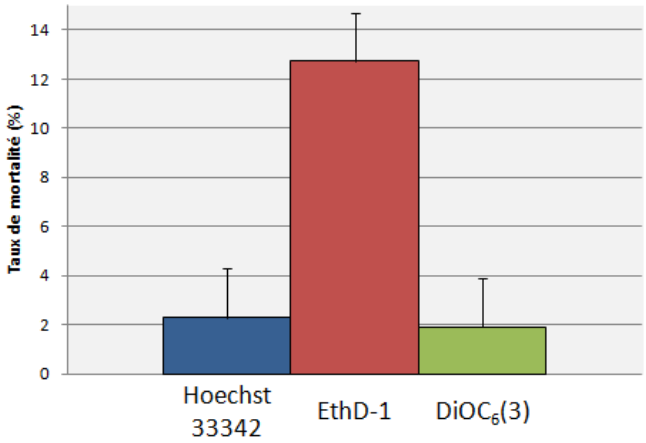


Figure 68 : Effet des marqueurs utilisés séparément sur les cellules cultivées en biopuce dynamique. Taux de mortalité observée après 10 h de culture avec le Hoechst 33342 (bleu), l'EthD-1 (rouge) ou avec du $DiOC_6(3)$.

Le Hoechst 33342 ainsi que le $DiOC_6(3)$ présentent respectivement un taux de mortalité de 2,3 et 1,9 %, qui peut être considéré comme négligeable au vu du résultat obtenu par la culture en présence de l'EthD-1 qui est à 12,8 %. L'EthD-1 semble donc provoquer, en grande partie, la mort des cellules maintenues dans la biopuce en condition dynamique.

Le marquage réalisé avec l'EthD-1 seul permet de suivre l'apparition des cellules mortes au cours du temps. Ces résultats sont présentés dans la figure 69.

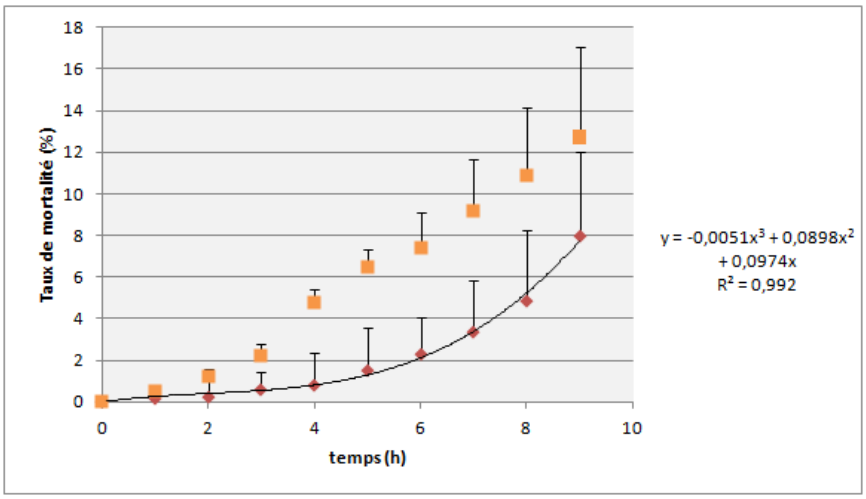


Figure 69 : Taux de mortalité au cours du temps en biopuce dynamique avec comme seul marqueur l'EthD-1 (losange rouge) (N = 1) comparé à ceux obtenus pour la biopuce en dynamique avec les 3 marqueurs (carré orange) (N = 3).

L'évolution du taux de mortalité dans la biopuce suit une loi polynomiale de degrés 3 d'équation : $y = -0{,}0051x^3 + 0{,}0898x^2 + 0{,}0974x$. Cette expérience n'ayant été réalisée qu'une seule fois il n'est pas possible de déterminer statistiquement s'il existe une différence entre les deux expériences. Mais à première vu, il semblerait que l'augmentation du nombre de cellules mortes en biopuce cultivée en dynamique soit due à la présence d'EthD-1. Cependant il est nécessaire, avant de conclure, de renouveler ces séries d'expériences.

Il est nécessaire de rappeler que le marqueur utilisé : l'EthD-1 pénètre dans les cellules lorsque celles-ci n'ont plus d'intégrité membranaire, or il a déjà été reporté dans la littérature que la présence d'un flux à faible débit provoque la perméabilisation des membranes cellulaires (Park *et al.,* 2011 ; Waters *et al.,* 1996). Ce qui permet aux marqueurs non perméants (comme l'EthD-1) de traverser les membranes cellulaires bien que les cellules ne soient pas mortes. Les cellules perméabilisées sont alors identifiées comme mortes alors qu'elles ne le sont pas (encore). Certaines techniques de perméabilisation temporaires des cellules sont utilisées pour permettre entre autres des transfections sans conduire à la mort de ces cellules, c'est le cas des ultrasons. Mais dans notre cas, le flux imposé de manière constante et chronique va probablement conduire les cellules perméabilisées et marquées à l'EthD-1 à une mort cellulaire par apoptose. Mais il est également possible que la mort soit due à l'altération de l'ADN par marquage à l'EthD-1 ou à la photo-toxicité de l'EthD-1. Afin de visualiser l'état d'avancement de la mort des cellules, des marqueurs d'apoptose ou d'intégrité des mitochondries peuvent être employés (voir figure 70). En revanche toute technique de mesure du taux de viabilité basée sur l'intégrité membranaire tels que la Calcein AM, le LDH, ou le bleu trypan sont à proscrire, puisque ces cellules n'ont plus d'intégrité membranaire. Comme le montre la figure 18, le $DiOC_6(3)$ utilisé en cytométrie en flux permet de distinguer les cellules en voie d'apoptose lors de la réduction du potentiel mitochondrial. Ce marqueur ayant été utilisé durant la thèse, une nouvelle analyse plus ciblée des données obtenues avec le $DiOC_6(3)$ pourrait nous permettre d'identifier les cellules en cours d'apoptose par une observation de l'évolution du marquage des mitochondries de chaque cellule et pas d'une population comme nous l'avons durant ces travaux.

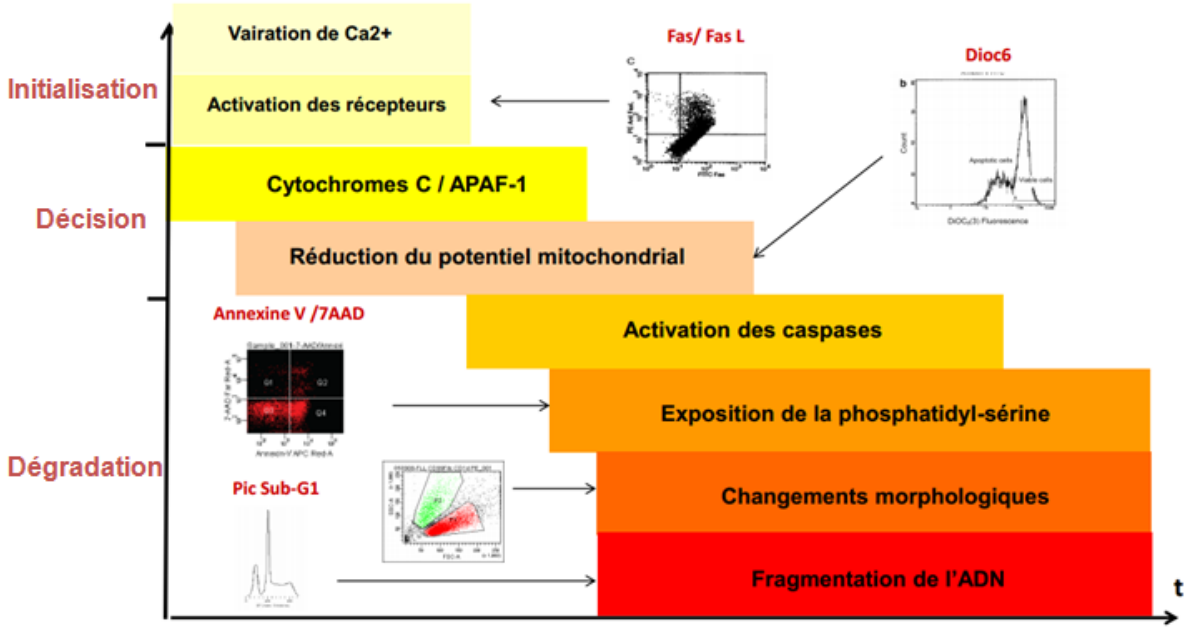


Figure 70 : Techniques permettant d'identifier l'avancement de la voie d'apoptose par Cytométrie en Flux (d'après Larbret 2013).

En conclusion de cette partie, la mise en place d'un flux permanant lors de la culture des hépatocytes en biopuce semble stresser les cellules et/ou provoquer la perméabilisation de certaines d'entres elles, ce qui conduirait celles-ci à une mort programmée. L'apparition de cellules mortes serait accentuée par l'utilisation en « time-lapse » de l'EthD-1.

Chapitre 6 : Test de toxicité : effet de la staurosporine

Afin d'éprouver l'efficacité du microsystème à détecter un effet toxique produit par une molécule chimique donnée, nous avons examiné l'effet toxique de la staurosporine (STS). La staurosporine a été testée en biopuce cultivée en condition dynamique et en boite de Pétri à 2 concentrations : 1 µM et 5 µM pendant 10 h. Tout comme dans les autres paragraphes, le comportement des cellules traitées avec de la STS est mis en évidence par la surface occupée par les cellules dans la zone d'intérêt, par le taux de mortalité et par l'activité mitochondriale au cours du temps. Ces expériences ont été comparées à des contrôles : biopuce dynamique et boite de Pétri sans STS. Chaque condition a été réalisée 3 fois.

1. Evolution de la surface occupée par les cellules traitées à la STS

Les résultats obtenus pour l'évaluation de la surface occupée par les cellules au cours du temps lorsque celles-ci sont traitées à la STS dans différentes conditions sont représentés sur la figure 71. En regardant la tendance des courbes, on remarque que la culture cellulaire en biopuce dynamique traitée avec 5 µM de STS perd rapidement (dès la deuxième heure) de sa surface d'adhésion avec le support. A la fin de l'expérience elle est de -35 % par rapport à T0.

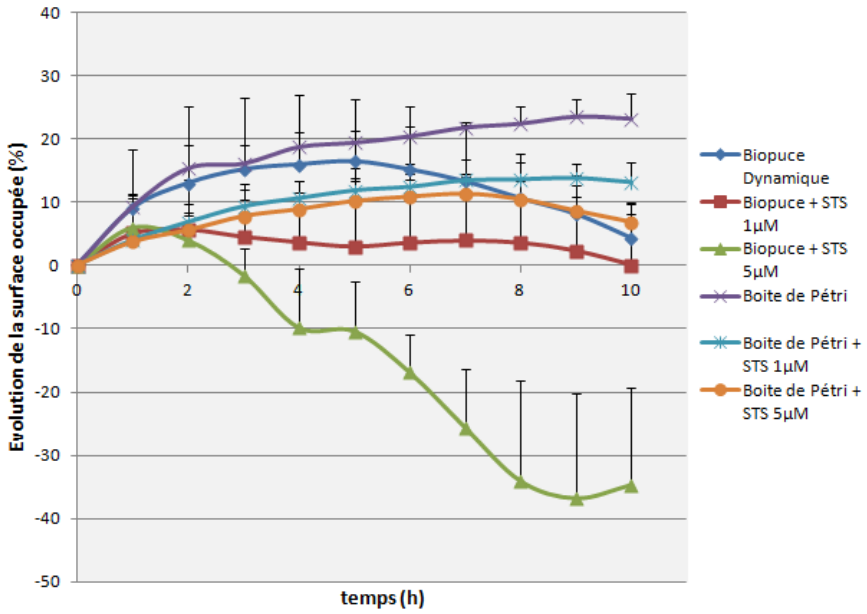


Figure 71 : Evolution de la surface occupée par les cellules. Courbe représentant les différentes conditions testées : biopuce sans STS (bleu foncé), biopuce + STS 1 µM (rouge), biopuce + STS 5 µM (vert), boite de Pétri (violet), boite de Pétri + STS 1 µM (bleu clair) et boite de Pétri + STS 5 µM (orange) (N = 3).

Les images en contraste de phase correspondant à la condition biopuce + STS 5 µM (exemple : figure 72), présentent dans certains cas un regroupement des cellules, formant des amas beaucoup plus compacts qu'en biopuce contrôle. Certaines cellules se détachent puis sont éluées avec le flux, mais la plupart des cellules mortes restent dans la zone d'observation. L'absence de membranes plasmiques bien délimitées témoigne de cellules mortes ou stressées. Toutes ces observations expliquent la perte de surface occupée par les cellules dans cette condition. Les autres conditions présentent une augmentation de la surface occupée par les cellules. Pour les conditions en biopuce avec ou sans STS à 1 µM on observe une augmentation puis une diminution de la surface. Les trois conditions en boite de Pétri présentent une surface occupée par les cellules qui augmente progressivement mais après 8h de culture, les cellules cultivées en boite de Pétri avec 5 µM de STS semblent occuper moins d'espace, entre T7 et T10, la perte est estimée à 4,5 %.

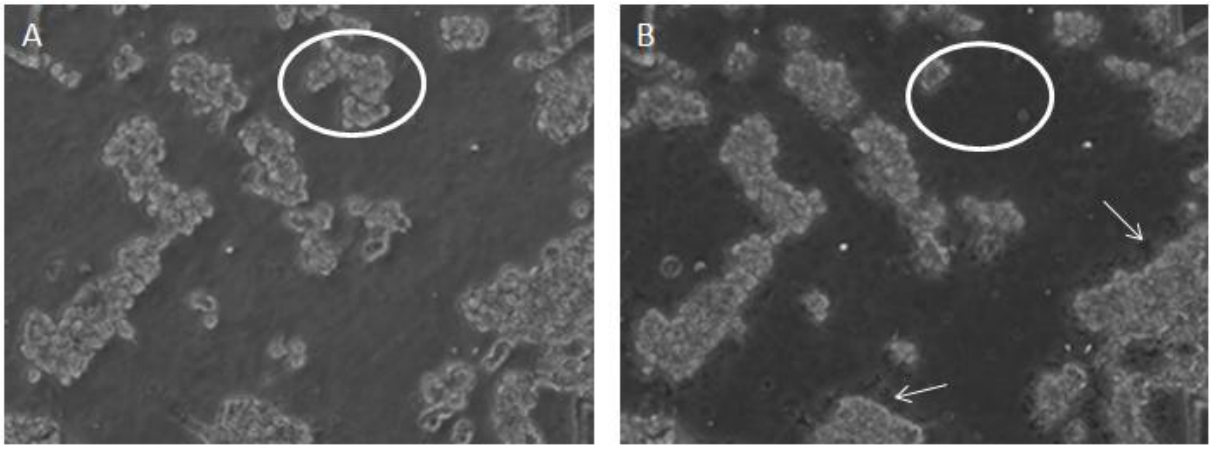


Figure 72 : Cellules traitées avec 5 µM de Staurosporine. L'image A correspond au début de l'expérience : T0 et (B) à 10 h d'expérience. A T10, les cellules sont moins réfringentes, leur membrane plasmique est moins clairement visible. Le cercle blanc met en évidence des cellules qui se sont détachées et ont été éliminées par le flux. Certaines cellules mortes ou débris cellulaires encore présents dans la zone d'intérêt sont représentées par les flèches.

Les tests statistiques (Anova 1) ont été réalisés au temps T2, T5 et T10 (figure 73). La condition : biopuce + STS 5 µM à 5 h et 10 h de culture présente une différence significative avec son contrôle en biopuce sans traitement et avec les cellules cultivées en boite de Pétri avec la même dose de STS. Après 10 h de culture, le résultat des cellules cultivées avec 1 µM de STS en biopuce s'avère différent de cellules traitées avec 5 µM de STS avec le même mode de culture. La comparaison entre biopuce dynamique et boite de Pétri n'a pas été représentée car déjà présentée dans le paragraphe 3.3. La culture cellulaire en biopuce microfluidique traitée avec 5 µM de STS présente une baisse de la surface occupée par les cellules significativement différente des autres conditions dès 5 h de traitement. En boite de Pétri aucune différence significative n'a été observée quelle que soit la dose de STS employée et le temps. La surface occupée nous donne une information pertinente qui témoigne de la toxicité de la STS employée à 5 µM en biopuce.

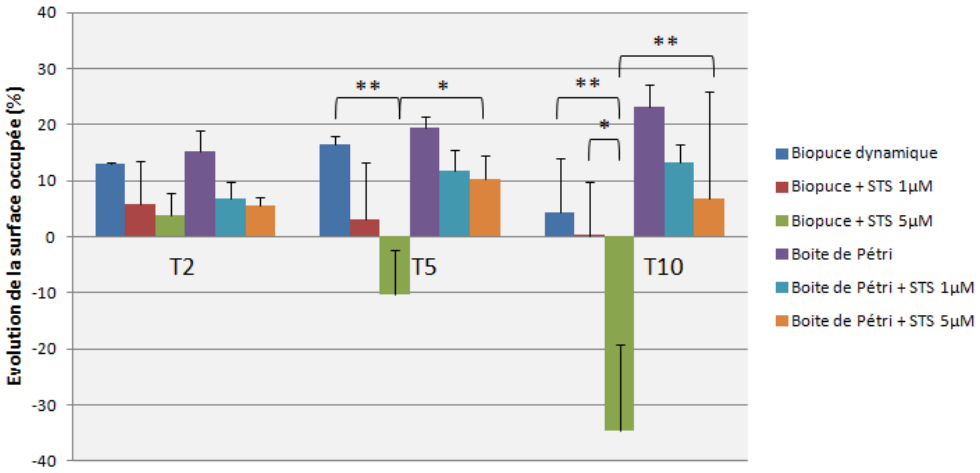


Figure 73 : Histogramme représentant l'évolution de la surface occupée obtenue pour les différentes conditions après 2 h, 5 h et 10 h d'expérience. Les tests ANOVA 1 avec α = 0.05 ont été réalisés à chacun de ces temps, seuls les résultats significativement différents ont été représentés (* = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$). La comparaison entre biopuce dynamique et boite de Pétri n'a pas été représentée car déjà présentée dans le paragraphe 3.3.

2. Taux de mortalité des cellules en présence de STS

Les taux de mortalité des cellules calculés pour les différentes conditions sont représentés dans la figure 74 (N = 3). Les cellules cultivées en biopuce dynamique avec 5 µM de STS expriment un taux de mortalité très élevé, après 5 h de culture, 34 % des cellules sont mortes et à la fin de l'expérience le taux de mortalité culmine à 86 %.

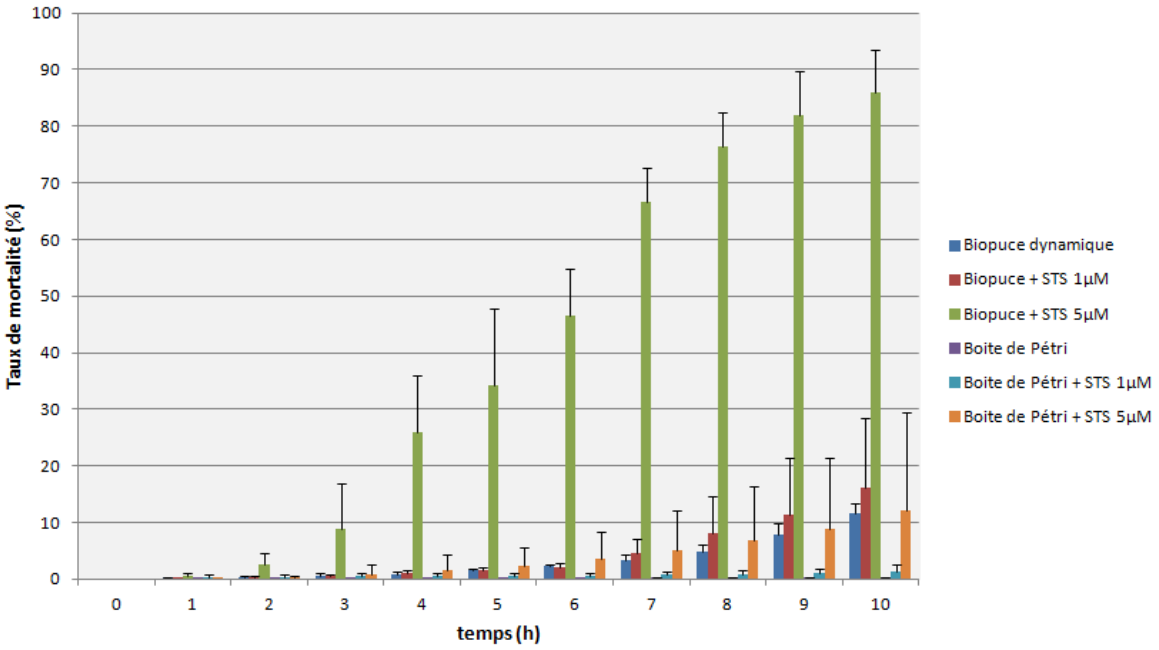


Figure 74 : Evaluation du taux de mortalité au cours du temps en présence ou non de STS à 1 ou 5 µM. Histogramme représentant les différentes conditions testées : biopuce dynamique (bleu foncé), biopuce + STS 1 µM (rouge), biopuce + STS 5 µM (vert), boite de Pétri (violet), boite de Pétri + STS 1 µM (bleu clair) et boite de Pétri + STS 5 µM (orange) (N = 3).

Les tests statistiques (Anova1) réalisés aux temps : T2, T4 et T10 (figure 75), montrent que dès 4 h de culture, la condition biopuce + STS 5 µM diffère significativement de son contrôle (biopuce dynamique) mais aussi de la condition : biopuce + STS 1 µM ainsi que des cellules cultivées en boite de Pétri avec 5 µM de STS. Ces résultats se confirment à T10. En revanche, à la fin de l'expérience, aucune différence significative n'est visible entre les expériences en boite de Pétri avec ou sans traitement au STS à 1 µM et 5 µM. La condition biopuce + STS 1 µM ne semble pas différente de la condition contrôle : biopuce dynamique sans STS. Une toxicité est clairement observée en biopuce lorsque les cellules sont traitées avec 5 µM de STS.

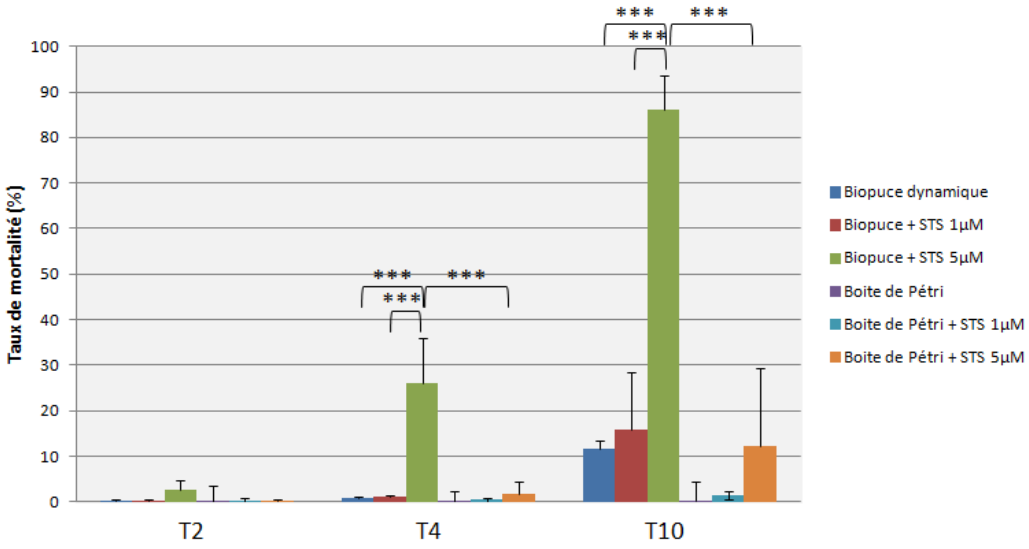


Figure 75 : Histogramme de la mortalité observée pour les différentes conditions après 2 h, 5 h et 10 h d'expérience. Les tests ANOVA 1 avec α = 0.05, ont été réalisés à chacun de ces temps, seuls les résultats significativement différents ont été représentés (*** = P < 0.001). La comparaison entre biopuce dynamique et boite de Pétri n'a pas été représentée car déjà présentée dans le paragraphe 3.3.

3. Activité mitochondriale des cellules traitées à la STS

Les variations de l'activité mitochondriale des cellules cultivées en biopuce ou en boite de Pétri en présence de STS sont visibles sur la figure 76 (N = 3).

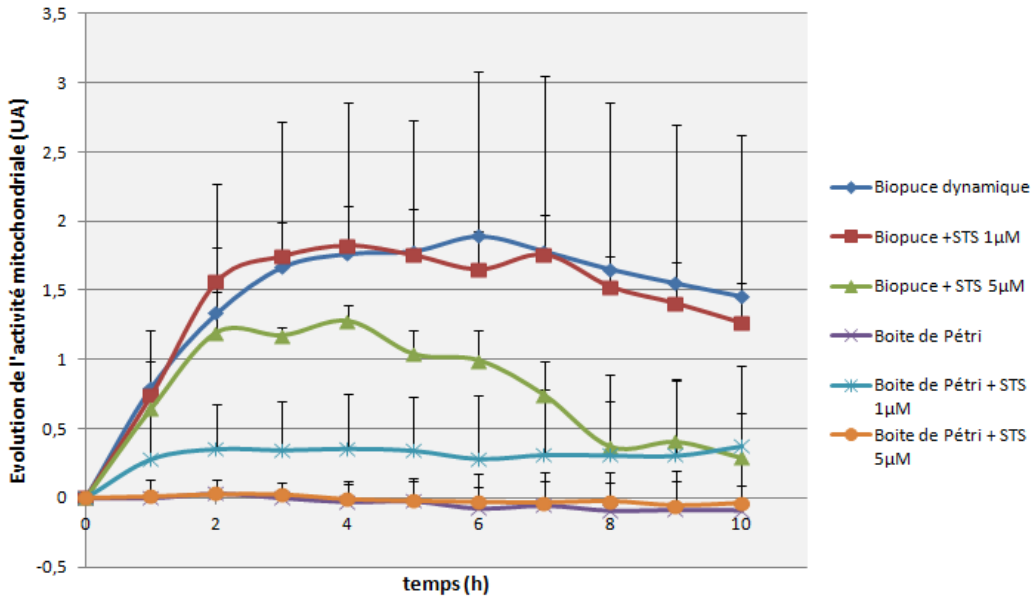


Figure 76 : Evolution de l'intensité de fluorescence des mitochondries pour les conditions suivante : biopuce dynamique (bleu foncé), biopuce + STS 1 µM (rouge), biopuce + STS 5 µM (vert), boite de Pétri (violet), boite de Pétri + STS 1 µM (bleu clair) et boite de Pétri + STS 5 µM (orange) (N = 3).

On note plusieurs comportements : la condition biopuce dynamique ainsi que la biopuce + STS 1 µM montrent une augmentation de l'intensité de fluorescence pendant les 3 premières heures, puis celles-ci stagnent jusqu'à T7, où elles commencent à chuter. La condition biopuce + STS 5 µM présente une augmentation de l'intensité de fluorescence des mitochondries durant les 2 premières heures puis, l'intensité diminue progressivement jusqu'à la fin de l'expérience. Les conditions en boite de Pétri possèdent des intensités de fluorescence qui restent relativement stables au cours du temps, aucune augmentation d'activité n'est observée, sauf pour la condition traitée avec 1 µM de STS qui augmente de 35 % entre T0 et T2 puis stagne le reste de l'expérience. Cependant cette variation entre le contrôle en boite de Pétri et la culture traitée avec 1 µM STS s'avère non significative lorsque l'on regarde les résultats des tests statistiques réalisés à T2, T5 et T10 (figure 77). La seule différence observée avec $P < 0.05$ à T5, correspond à la comparaison entre la biopuce traitée avec 1 µM de STS et la culture en boite de Pétri traitée avec 1 µM de STS. Il existe également une différence significative entre la biopuce cultivée en dynamique et la condition : boite de Pétri (résultats présentés dans le paragraphe 3.3).

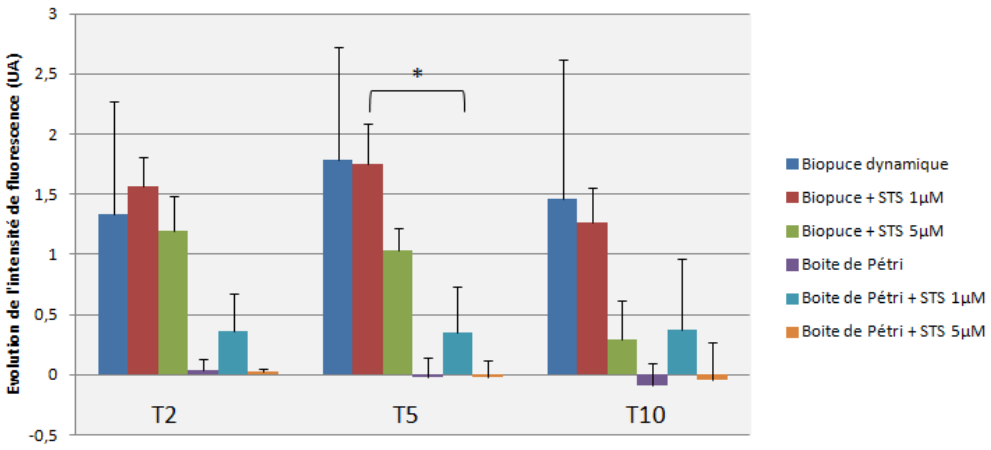


Figure 77 : Histogramme représentant l'évolution de l'intensité de fluorescence obtenue pour les différentes conditions après 2 h, 5 h et 10 h d'expérience. Les tests ANOVA 1 avec $\alpha = 0.05$, ont été réalisés à chacun de ces temps, seuls les résultats significativement différents ont été représentés (* = $P < 0.05$). La comparaison entre biopuce dynamique et boite de Pétri n'a pas été représentée car déjà présentée dans le paragraphe 3.3.

Lorsque l'on regarde les histogrammes 3D des répartitions d'intensité de fluorescence des mitochondries pour les 6 conditions (figure 78), on constate que la plus grosse différence de comportement est observée entre les deux modes de culture : biopuce

dynamique et boite de Pétri. En comparant les cellules cultivées en biopuce, celles traitées avec 1 µM de STS présentent globalement la même répartition d'intensité fluorescente que le contrôle avec des pics un peu plus étalés. La condition biopuce + STS 5µM présente des pics plus étalés à partir de T3 où les cellules semblent avoir une forte activité mitochondriale, puis après 7h d'expérience les mitochondries des cellules possèdent une intensité de fluorescence plus homogène entre elles mais plus faible. Les cellules cultivées en boite de Pétri seule ou avec 1µM de STS présentent une activité mitochondriale stable au cours du temps située entre les seuils de fluorescence 0,166 et 0,3. La condition boite de Pétri + STS 5µM présente la même répartition de l'activité mitochondriale puisqu'elle reste stable au cours du temps mais l'activité est plus importante que dans les autres conditions, puisque située entre les seuils 0,33 et 0,56, les mêmes que ceux occupées par la condition biopuce + STS 5µM. Il semble donc que la staurosporine induise une modification de l'activité mitochondriale qui se traduit par une augmentation temporaire de l'intensité de fluorescence des mitochondries avant de provoquer la mort des cellules.

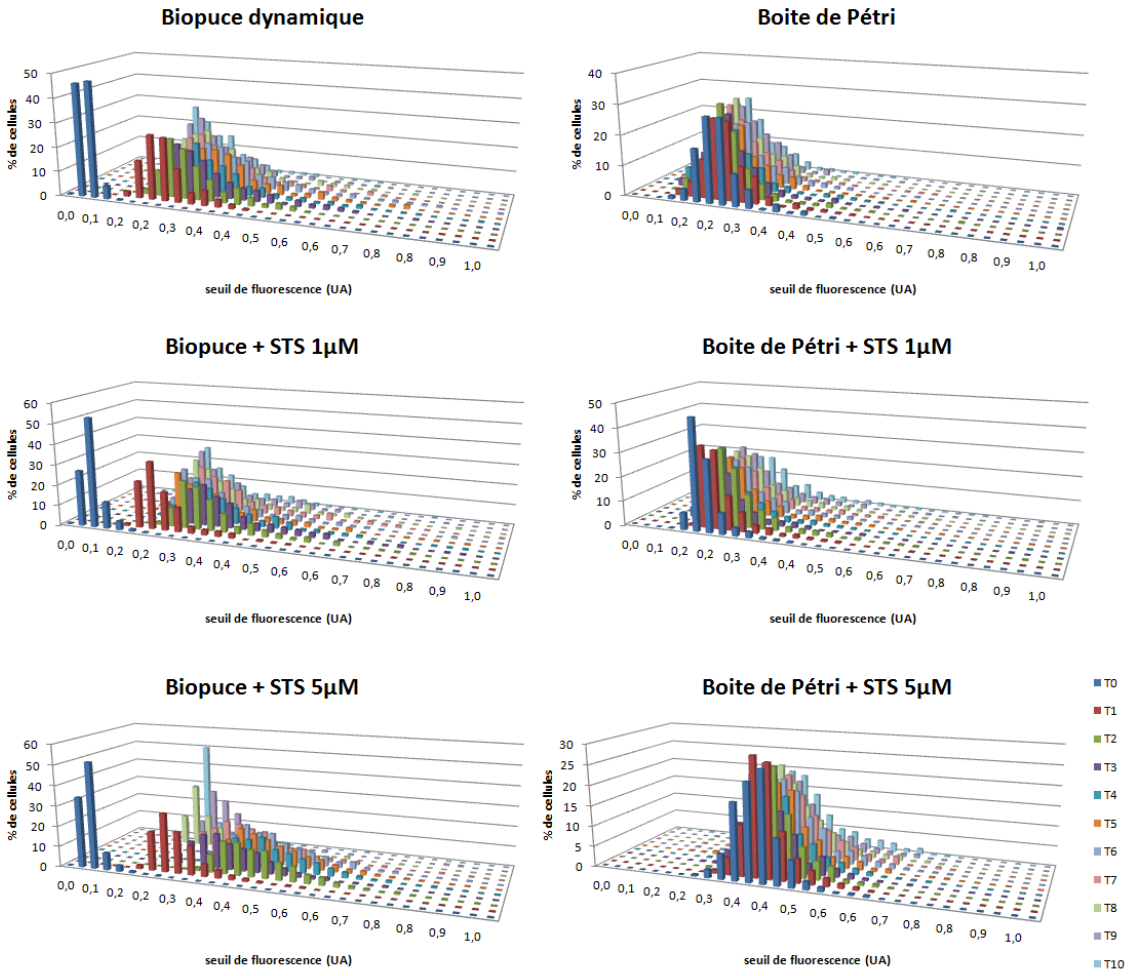


Figure 78 : Histogramme 3D de la répartition de l'intensité de fluorescence des mitochondries pour une population cellulaire dans les 6 conditions testées. L'axe X représente les seuils de fluorescence (UA), l'axe Y : le pourcentage de cellules appartenant à un des seuils donné, l'absence de fluorescence correspondant au seuil 0,0 et la saturation de la fluorescence au seuil 1,0. L'axe Z représente le temps allant de T0 : le début à T10 : la fin de l'expérience.

Ces résultats montrent que la STS utilisée à 5 µM est détectée comme toxique en biopuce mais pas en mode de culture conventionnel : la boite de Pétri. La forte concentration de STS employée a été choisie volontairement pour s'assurer l'observation d'une mortalité sous 10 h. Ce temps de culture très court est imposé par l'utilisation de l'imagerie, et s'avère être une limite à l'utilisation de cette méthode pour détecter une toxicité. Il est envisageable de cultiver les cellules avec le produit toxique hors microscope et de ne placer les échantillons sous celui-ci pour une analyse en « time-lapse » qu'à des intervalles de temps judicieux (24h, 48h, 72h). Aucun calcul de DL50 ni d'autres indicateurs de toxicité n'a été réalisé avec les données obtenues avec la STS car il a été montré dans le

précédent paragraphe que les cellules cultivées en biopuce dynamique subissaient un stress. Ce stress cellulaire est incompatible avec la réalisation d'un test de toxicité. C'est pourquoi, les tests de toxicité devraient être réalisés 24 h après la mise en dynamique de la culture, afin de s'affranchir de l'état de stress observé chez les cellules dans nos conditions. La pertinence des résultats pourrait être vérifiée par des tests *in silico* via l'utilisation d'un modèle PBPK ou par des tests *in vivo* chez le rat, dans ce cas, les tests réalisés en biopuce devront avoir lieu avec des hépatocytes primaires de rat.

Conclusion et Perspectives

Le développement d'outils dédiés à la culture hépatique demeure à l'heure actuelle un axe de recherche très dynamique. Ces outils employés, entre autres, pour des études toxicologiques et pharmacologiques, permettent de répondre en partie aux problèmes éthiques, en limitant l'emploi d'animaux, financiers et aux difficultés d'interprétation résultant des études *in* vivo.

Les protocoles et les modes de culture innovants permettent une meilleure simulation des conditions physiologiques et un maintien accru des activités métaboliques des hépatocytes et en particulier des enzymes de phase 1 et 2. Ainsi, de nouvelles lignées hépatiques plus proches des hépatocytes primaires ont vu le jour. Les supports de culture ont évolué grâce à l'ingénierie tissulaire et permettent le maintien de l'ensemble des fonctions hépatiques et la simulation de l'environnement physiologique des hépatocytes *in vivo*.

Les nouvelles technologies ont joué un rôle considérable dans cette recherche de nouveaux modèles alternatifs. L'informatique a permis l'avènement des systèmes *in silico* qui facilitent l'extrapolation inter-espèces grâce à la modélisation mathématique et bioinformatique. La micro-fabrication adaptée à la biologie a permis l'élaboration de dispositifs de culture en 3D et/ou en dynamique.

Parmi ces dispositifs, les systèmes microfluidiques reconstituent le microenvironnement cellulaire, renforçant ainsi l'expression des fonctions différenciées, favorisant la croissance et le développement 3D et améliorant l'organisation des tissus. En revanche, le suivi au cours du temps de ce type d'expérimentation par des prises d'images à des intervalles de temps définis, génère un nombre considérable de données qu'il est difficile d'analyser manuellement. C'est dans ce cadre que l'imagerie, qui va de l'acquisition des images jusqu'à l'obtention d'informations biologiques, est désormais employée. Automatisable, l'imagerie présente l'avantage de pouvoir traiter un grand nombre de données rapidement, ce qui fait de cette technique, une alternative ou un complément de choix aux analyses couramment utilisées pour les cultures biologiques. En outre, les logiciels

dédiés au traitement des images cellulaires se sont multipliés ces dernières années et offrent de plus en plus de possibilités.

Dans l'approche expérimentale présentée dans ce mémoire, nous avons choisi d'étudier par imagerie au cours du temps le comportement d'hépatocytes (HepG2/C3A) cultivées en biopuce microfluidique. Il a été nécessaire de développer des protocoles expérimentaux mais également de traitement d'images afin d'extraire des données pertinentes. La biopuce a été modifiée pour permettre une analyse sous microscope. Un boitier adapté au microscope comprenant 12 biopuces parallélisées a été fabriqué (Brevet en cours), afin d'analyser simultanément plusieurs biopuces et donc plusieurs conditions. La première perspective de la thèse est donc de réaliser des cultures au sein de ce système afin de vérifier la fonctionnalité du boitier.

Le choix de la fluorescente pour obtenir des informations a nécessité la recherche de sondes fluorescentes appropriées à nos conditions expérimentales. Les sondes fluorescentes sélectionnées : le Hoechst 33342, l'EthD-1 et le $DioC_6(3)$ donnent des résultats convaincants qui nous permettent de dénombrer les cellules, d'évaluer la surface occupée par les cellules et de quantifier l'intensité de fluorescence des mitochondries. Cependant, leur utilisation présente des limites d'interprétations. Nos travaux ont permis la mise en place de protocole de traitement d'images permettant de corriger certaines des limites identifiées. Les limites principales dans l'emploi de ces sondes proviennent du type cellulaire employé (HepG2/C3A). En effet, cette lignée a tendance à former des amas compliquant l'analyse. Une autre limite dans l'emploi de cette méthode est de conserver une faible densité cellulaire dans la biopuce afin d'éviter la culture en pluri-couches des HepG2/C3A, ce qui complique également l'analyse des images.

Durant nos travaux des sondes ont été sélectionnées mais d'autres sondes fluorescentes non retenues ou non testées durant la thèse, pourraient être employées, tel que :

- le Carboxy-DCFDA pour mettre en évidence la production de ROS.

- les sondes fluorescentes : DiD, DiA, DiI qui se fixent dans les membranes cellulaires, ce qui nous donnerait une estimation de la surface réellement occupée par les cellules.

- les sondes de type : TOTO1, YOYO1 iodure, non perméants, elles semblent ne pas être toxiques pour les cellules contrairement à ce que nous avons montré avec l'EthD-1 (Cf. chapitre 5, 4.4) et pourraient venir le remplacer.

- les marqueurs de la gamme CellTracker® (blue, green) qui sont employés pour du suivi des cellules (cell tracking) à long terme.

Mais sauf le Carboxy-DCFDA, les autres sondes devront faire l'objet de tests de faisabilité de marquage au cours du temps dans nos conditions expérimentales ainsi que de photo-toxicité.

Une méthode de traitement des images sur CellProfiler a été mise au point. Elle est adaptée aux images de culture cellulaire obtenues en présence des sondes fluorescentes. Les paramètres des algorithmes ont été choisis, la plupart du temps, de manière empirique. Leur optimisation doit être réalisée pour corriger les erreurs identifiées et quantifiées (labellisation des noyaux, attribution des mitochondries aux cellules). Il serait intéressant de tester les nouveaux logiciels d'imagerie développés spécialement pour des cultures 3D et/ou en « time-lapse » de cellules vivantes pour du criblage à haut débit, tel TimeLapseAnalyser, pour voir si de meilleures données pourraient être obtenues.

L'emploi des HepG2/C3A, lignée facile d'entretiens, nous a permis de mettre au point une méthode d'analyse sous microscope au cours du temps. Dans le but de réaliser des tests toxicologiques pertinents, il semble indispensable de remplacer la lignée utilisée par des hépatocytes primaires, en effet les HepG2/C3A présentent des divergences avec les hépatocytes *in vivo* en ce qui concerne le métabolisme. La matrice extracellulaire adaptée aux hépatocytes primaires, le collagène, doit être employée. Cependant, le collagène est connu pour générer un bruit de fond important sur les images. Cette modification nécessitera l'adaptation de la méthode de traitement des images et particulier par ajout d'algorithme de correction du bruit de fond. L'emploi des hépatocytes primaires peut aussi s'avérer pratique du point de vu technique. En effet, ces cellules ne se divisent pas et forment une monocouche stricte. Cela rend le traitement des images plus aisé. Ainsi les erreurs de comptage observées avec les HepG2/C3A dues à la culture en pluri-couches ou à la superposition des cellules seront évitées.

La caractérisation de la culture en biopuce grâce à l'imagerie, a tout d'abord permis d'identifier le pourcentage d'adhésion cellulaire. La valeur obtenue grâce à cette méthode (65%) s'avère pertinente. Celle-ci pourrait même être optimisée par une modification du matériau utilisé pour fabriquer les biopuces ou de la matrice extracellulaire.

Notre stratégie d'échantillonnage employée lors de l'acquisition d'images des biopuces nous a permis d'obtenir une vision d'ensemble du comportement cellulaire dans la biopuce. Les cellules présentes dans les différentes zones ont un comportement homogène. Nous pouvons donc conclure qu'à l'échelle de la biopuce, les cellules ne forment qu'une seule et même population. Durant les 10 premières heures de la mise en dynamique des biopuces, les cellules se comportent globalement de la même manière. Cependant qu'en est-il après adaptation des cellules à ce nouvel environnement ? Il serait intéressant de regarder les différentes zones de la biopuce, 24h, 48h ou 72h après la mise en dynamique, pour étudier l'évolution du comportement cellulaire.

Ainsi lors de nos expériences, on observe la formation d'amas sur l'ensemble de la biopuce, les cellules se regroupent et des cellules mortes apparaissent après quelques heures de cultures en dynamique. Nos analyses révèlent que ce phénomène correspond à un effet combiné du flux et des sondes fluorescentes (principalement l'EthD-1). Afin de comprendre parfaitement les phénomènes intervenant dans ces conditions des dosages et tests par cytomètre de flux pourrait être menées.

L'activité mitochondriale, observée avec le $DioC_6(3)$, est plus importante en biopuce qu'en boite de Pétri. Cette augmentation d'activité peut être une réponse adaptative des cellules à la présence du flux ou le signe d'un stress qui peut conduire à une mort cellulaire par apoptose. La recherche du processus d'apoptose doit être menée, afin de conclure sur le type de mort observé en biopuce (apoptose ou nécrose) (Cf. chapitre 5, 4.4).

Lors des tests de toxicité, la STS a été placée en biopuce au même moment que la mise en dynamique de la culture, or il s'avère que les cellules ont besoin d'un temps d'adaptation à la mise en dynamique. Il serait donc judicieux de reproduire les tests de toxicité 24 h après la mise en dynamique de la culture en biopuce. Les résultats ainsi obtenus seront plus pertinents et plus représentatifs de l'effet toxique du produit testé.

Au cours de ces travaux, nous avons exploré un certain nombre de stratégies et identifiés les limites associées à celles-ci. Ainsi, nous avons grandement progressé dans les connaissances nécessaires à la réalisation de test toxicologique en time lapse par imagerie. Nous avons donc développé certains des outils nécessaires à ceux-ci qui seront à optimiser au vu de l'évolution des connaissances dans ce domaine novateur.

Références bibliographiques

Abraham V C, Taylor D L, Haskins J R. High content screening applied to large-scale cell biology. Trends in biotechnology (2004) 22 : 15-22.

Ahmed W M, Leavesley S J, Rajwa B, Ayyaz M N, Ghafoor A, Robinson J P. State of the art in information extraction and quantitative analysis for multimodality biomolecular imaging. Proceedings of the IEEE (2008) 93 : 512-530.

Albrecht D R, Underhill G H, Resnikoff J, Mendelson A, Bhatia S N, Shah J V. Microfluidics-integrated time-lapse imaging for analysis of cellular dynamics. Integrative biology (2010) 2 : 278-287.

Allen J W, Khetani S R, Bhatia S N. In vitro zonation and toxicity in a hepatocyte bioreactor. Toxicological sciences (2005) 84 : 110-119.

Aly H and Domenech O. Cytotoxicity and mitochondrial dysfunction of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in isolated rat hepatocytes. Toxicology letters (2009) 191 : 79-87.

Antonsson A and Persson J. Induction of apoptosis by staurosporine involves the inhibition of expression of the major cell cycle proteins at the G(2)/M checkpoint accompanied by alterations in Erk and Akt kinase activities. Anticancer research (2009) 29 :2893-98.

Andersen M E and Krewski D. Toxicity testing in the 21st century: bringing the vision to life. Toxicological sciences (2009) 107 : 324-330.

Anderson J R, Chiu D T, Jackman R J, Cherniavskaya O, McDonald J C, Wu H, Whitesides S H, Whitesides G M. Fabrication of topologically complex three-dimensional microfluidic systems in PDMS by rapid prototyping. Analytical chemistry (2000) 72 : 3158-64.

Antolino-Lobo I, Meulenbelt J, Nijmeijer S M, Maas-Bakker R F, Meijerman I, van den Berg M, van Duursen M B M. 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) interacts with therapeutic drugs on CYP3A by inhibition of pregnane X receptor (PXR) activation and catalytic enzyme inhibition. Toxicology letters (2011) 203 : 82-91.

Baldock R. and Graham J. Image Processing and Analysis. A Practical Approach. Oxford University Press, 2000.

Baudoin R, Griscom L, Monge M, Legallais C, Leclerc E. Development of a Renal Microchip for In Vitro Distal Tubule Models. Biotechnol. Prog. (2007) 23 : 1245−1253.

Baudoin Régis. Développement et caractérisation d'une puce à cellules pour le criblage d'agents toxiques. 187p. Thèse : Bio-Ingénierie, Biomécanique, Biomatériaux : UTC : 2008.

Benhamouche S, Decaens T, Godard C, Chambrey R, Rickman D S, Moinard C, Vasseur-Cognet M, Kuo C J, Kahn A, Perret C, Colnot S. Developmental cell (2006) 10 : 759-770.

Bhadriraju K and Chen S C. Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. Drug discovery today (2002) 7 : 612-620.

Bhadriraju K, Elliott J T, Nguyen M, Plant A L. Quantifying myosin light chain phosphorylation in single adherent cells with automated fluorescence microscopy. BMC cell biology (2007) 8 : 43-56.

Bidault Godard Cécile. Rôle de la glutamine dans les foies prétumoraux présentant une singalisation β–Catérine Activée : Etude de la double invalidation génétique de la glutamine synthètase et du gene suppresseur de tumeur APC dans le foie murin. Mémoire : École Patrique des Hautes Études, Paris : 2011.

Blouin A, Bolender R P, Weibel E R. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. The Journal of Cell Biology (1977) 72 : 441-455.

Booth R and Kim H. Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (μBBB). Lab Chip (2012) 12 : 1784-1792.

Briquet F, Colas A, Thomas X. Silicones à usage médical. Dow Corning France - Division Santé Europe (1996) 1-11.

Burgess A, Lorca T, Castro A. Quantitative live imaging of endogenous DNA replication in Mammalian cells. PloS one (2012) 7 : e45726.

Burguillos M A, Hajji N, Englund E, Persson A, Cenci A M, Machado A, Cano J, Joseph B, Venero J L. Apoptosis-inducing factor mediates dopaminergic cell death in response to LPS-induced inflammatory stimulus ; evidence in Parkinson's disease patients. Neurobiology of Disease (2011) 41 : 177–188.

Campbell J L, Clewell R A, Gentry P R, Andersen M E, Clewell H J. Physiologically based pharmacokinetic/toxicokinetic modeling. Methods Mol Biol. (2012) 929:439-499.

Carlile D J, hakooz N, Houston J B. Kinetics of drug metabolism in rat liver slices : IV : comparison of ethoxycoumarin clearance by liver slices, isolated hepatocytes, and hepatic microsomes from rats pretreated with known modifiers of Cytochrome P -450 Activity. Drug Metabolism And Disposition (1999) 27 : 526-32.

Carpenter AE, Jones T R, Lamprecht M R, Clarke C, Kang I H, Friman O, Guertin D, Chang J H, Lindquist R, Moffat J, Golland P, Sabatini D M. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. Genome biology (2006) 7 : R100.

Carmona R, Macías D, Guadix J, Portillo V, Pérez-Pomares J M, Muñoz-Chápuli R. A simple technique of image analysis for specific nuclear immunolocalization of proteins. Journal of microscopy (2007) 225 : 96-99.

Carter C A and Hamm J T. Multiplexed quantitative high content screening reveals that cigarette smoke condensate induces changes in cell structure and function through alterations in cell signaling pathways in human bronchial cells. Toxicology (2009) 261 : 89-102.

Celli A, Que F G, Gores G J, LarussoN F. Glutathione depletion is associated with decreased Bcl-2 expression and increased apoptosis in cholangiocytes. Am J Physiol (1998) 275 : 749-757.

Chao P, Maguire T, Novik E, Cheng K-C, Yarmush M L. Evaluation of a microfluidic based cell culture platform with primary human hepatocytes for the prediction of hepatic clearance in human. Biochemical pharmacology (2009) 78 : 625-632.

Cheng S, Prot J-M, Leclerc E, Bois F. Zonation related function and ubiquitination regulation in human hepatocellular carcinoma cells in dynamic vs. static culture conditions. BMC Genomics 2012, 13 : 54-74.

Cho J S, Maysinger D, Jain M, Röder B, Hackbarth S, Winnik F M. Long-Term Exposure to CdTe Quantum Dots Causes Functional Impairments in Live Cells. Langmuir (2007) 23 : 1974-1980.

Choucha-Snouber L, Chafey P, Broussard C, Monge M, Legallais C, Leclerc E. Analysis of Transcriptomic and Proteomic Profiles Demonstrates Improved Madin–Darby Canine Kidney Cell Function in a Renal Microfluidic Biochip. Biotechnol Prog. (2012a) 28 : 474-84.

Choucha-Snouber L, Jacques S, Monge M, Legallais C, Leclerc E. Transcriptomic analysis of the effect of ifosfamide on MDCK cells cultivated in microfluidic biochips. Genomics (2012b) 100 : 27–34.

Choucha-Snouber L, Aninat C, Griscom L, Madalinski G, Brochot C, Poleni P E, Razan F, Guillouzo C G, Legallais C, Corlu A, Leclerc E. Investigation of ifosfamide nephrotoxicity induced in a liver-kidney co-culture biochip. Biotechnology and bioengineering (2013) 110 : 597-603.

Commission Européen Journal officiel C9 du 15/01/2008 (COM 2007, 675)

Corbineau Sébastien. Génération de progéniteurs hépatiques dérivés de cellules souches : application à l'hypercholestérolémie familial. 224p. Thèse : Physiopathologie Moléculaire et Cellulaire : UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11: 2011.

Custodio J M, Wu C-Y, Benet L Z. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. Advanced drug delivery reviews (2008) 60 : 717-733.

Darnell M, Schreiter T, Zeilinger K, Urbaniak T, So T, Rossberg I, Dillne B, Berg A-L, Gerlach C J, Andersson T B. Cytochrome P450-Dependent Metabolism in HepaRG Cells Cultured in a Dynamic Three-Dimensional Bioreactor. Drug Metabolism and Disposition (2011) 39 : 1131-1138.

Daskalopoulos E P, Malliou F, Rentesi G, Marselos M, Lang M A, Konstandi M. Stress is a critical player in CYP3A, CYP2C, and CYP2D regulation: role of adrenergic receptor signaling pathways. Am J Physiol Endocrinol Metab (2012)303 : 40-54.

De Buck S S and Mackie C E. Physiologically based approaches towards the prediction of pharmacokinetics: in vitro-in vivo extrapolation. Expert opinion on drug metabolism & toxicology (2007) 3 : 865-78.

Dertinger S K W, Chiu D T, Jeon N L, Whitesides G M. Generation of Gradients Having Complex Shapes Using Microfluidic Networks. Analytical Chemistry (2001) 73 : 1240-1246.

De Simone V and Cortese R. Transcription factors and liver-specific genes. Biochimica et Biophysica Acta, (1992) 1132 : 119-126.

De Sousa R C and Baertschi A J. Transport Membranaire. Cours de Faculté de Médecine, Département de Neuroscience fondamentale, Université de Genève, 2002.

Doktorova T Y, Yildirimman R, Vinken M, Vilardell M, Vanhaecke T, Gmuender H, Bort R, Brolen G, Holmgren G, Li R, Chesne C, van Delft J, Kleinjans J, Castell J, Bjorquist P, Herwig R, Rogiers V. Transcriptomic responses generated by hepatocarcinogens in a battery of liver-based in vitro models. Carcinogenesis (2013) 34 : 1393-402.

Domansky K, Inman W, Serdy J, Dash A, Lim M H M, Griffith L G. Perfused multiwell plate for 3D liver tissue engineering. Lab on a chip (2010) 10 : 51-8.

Donato M T, Tolosa L, Jiménez N, Castell J V, Gómez-Lechón M J. High-content imaging technology for the evaluation of drug-induced steatosis using a multiparametric cell-based assay. Journal of biomolecular screening (2012) 17 : 394-400.

Doull J, Borzelleca J F, Becker R, Daston G, DeSesso J, Fan A, Fenner-Crisp P, Holsapple M, Holson J, Llewellyn G C, MacGregor J, Seed J, Walls I, Woo Y, Olin S. Framework for use of toxicity screening tools in context-based decision-making. Food and chemical toxicology (2007) 45 : 759-796.

Duffy D C, McDonald J C, Schueller O J, Whitesides G M. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). Analytical chemistry (1998) 78 : 4974-4984.

Ekins S, Waller C L, Swaan P W, Cruciani G, Wrighton S, Wikel J H. Progress in predicting human ADME parameters in silico. Journal of pharmacological and toxicological methods (2001) 44 : 215-72.

Ellenberger S L and Young I T. Microscope image acquisition. Image Processing and Analysis : A Practical Approach. Par Baldock R. et Graham J. Oxford University Press, 2000, p. 1-36.

El Yamani M and Seret C. La toxicologie diffuse par l'Afsset : agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail, p.1-6, 2006.

Engman Helena. Intestinal Barriers to Oral Drug Absorption, Cytochrome P450 3A and ABC-Transport Proteins. 62p. Thèse : Pharmacy : Uppsala University : 2003.

Enoch S J, Cronin M T D, Schultz T W, Madden J C. An evaluation of global QSAR models for the prediction of the toxicity of phenols to Tetrahymena pyriformis. Chemosphere (2008) 71 : 1225-32.

Eschbach E, Chatterjee S S, Nöldner M, Gottwald E, Dertinger H, Weibezahn K-F, Knedlitschek G. Microstructured scaffolds for liver tissue cultures of high cell density: morphological and biochemical characterization of tissue aggregates. Journal of cellular biochemistry (2005) 95 : 243-255.

Falconnet D, Csucs G, Grandin H M, Textor M. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. Biomaterials (2006) 27 : 3044-63.

Feng Y, Tian Z, Wan M. Bioeffects of Low-Intensity Ultrasound In Vitro, Apoptosis, Protein Profile Alteration, and Potential Molecular Mechanism. J Ultrasound Med (2010) 29 : 963–974.

Feng Z-Q, Chu X-H, Huang N-P, Leach M K, Wang G, Wang Y-C, Ding Y-T, Gu Z-Z. Rat hepatocyte aggregate formation on discrete aligned nanofibers of type-I collagen-coated poly(L-lactic acid). Biomaterials (2010) 31 : 3604-3612.

Fey S J and Wrzesinski K. Determination of drug toxicity using 3D spheroids constructed from an immortal human hepatocyte cell line. Toxicological sciences (2012) 127 : 403-11.

Filippi C, Keatch S, Rangar D, Nelson L J, Hayes P C, Plevris J N. Improvement of C3A cell metabolism for usage in bioartificial liver support systems. Journal of hepatology (2004) 41 : 599-605.

Francis R, Xu X, Park H, Wei C-J, Chang S, Chatterjee B, Lo C. Connexin43 modulates cell polarity and directional cell migration by regulating microtubule dynamics. Plos one (2011) 6 : e26379.

Friedman S L. Transcriptional regulation of stellate cell activation. Journal of gastroenterology and hepatology (2006) 21 : S79-83.

Fukuda J, Sakai Y, Nakazawa K. Novel hepatocyte culture system developed using microfabrication and collagen/polyethylene glycol microcontact printing. Biomaterials (2006) 27 : 1061-70.

Gagné F, Auclair J, Turcotte P, Fournier M, Gagnon C, Sauvé S, Blaise C. Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. Aquatic toxicology (2008) 86 : 333-40.

Galloway J F, Winter A, Lee K H, Park j H, Dvoracek C M, Devreotes P, Searson P C. Quantitative characterization of the lipid encapsulation of quantum dots for biomedical applications. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine (2012) 8 : 1190–1199.

Giedt R J, Pfeiffer D R, Matzavinos A, Kao C-Y, Alevriadou B R. Mitochondrial dynamics and motility inside living vascular endothelial cells: role of bioenergetics. Annals of biomedical engineering (2012) 40 : 1903-16.

Glaser S S, Gaudio E, Miller T, Alvaro D, Alpini G. Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. Expert reviews in molecular medicine (2009) 11 : 1-20.
Hansch C, Leo A, Mekapati S B, Kurup A. QSAR and ADME. Bioorganic & medicinal chemistry (2004) 12 : 3391-3400.

Godoy P, Hengstler J G, Ilkavets I, Meyer C, Bachmann A, Müller A, Tuschl G, Mueller S O, Dooley S. Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor beta-induced apoptosis. Hepatology (2009) 49 : 2031-43.

Gómez-Lechón M J, Castell J V, Donato M T. Hepatocytes--the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: in vitro variability as a reflection of in vivo. Chemico-biological interactions (2007) 168 : 30-50.

Goubko C A and Cao K. Patterning multiple cell types in co-cultures: A review. Materials Science and Engineering: C (2009) 29 : 1855-1868.

Gueguen Y, Mouzot K, Ferrari E, Lobaccaro J M A, Batt A M, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M. Les cytochromes P450 : metabolism des xénobiotiques, régulation et rôle en Clinique. Ann Biol Clin (2006) 64 : 535-48.

Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. Chemico-biological interactions (2007) 168 : 66-73.

Gunness P, Mueller D, Shevchenko V, Heinzle E, Ingelman-Sundberg M, Noor F. 3D Organotypic Cultures of Human HepaRG Cells: A Tool for In Vitro Toxicity Studies. Toxicological sciences (2013) 133 : 67–78.

Hansch Co, Leo A, Mekapati S B, Kurup A. QSAR and ADME. Bioorganic & medicinal chemistry (2004) 12 : 3391-400.

Hanslick J L, Laua K, Noguchi K K, Olneya J W, Zorumski C F, Mennerick S, Farber N B. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. Neurobiology of Disease (2009) 34 : 1–10.

Harada Y, Matsumoto T, Hirahara S, Nakashima A, Ueno S, Oda S, Miyazaki S, Iwao Y.
Characterization of a sperm factor for egg activation at fertilization of the newt Cynops pyrrhogaster. Developmental biology (2007) 306 : 797-808.

Hariparsad N, Carr B A, Evers R, Chu X. Comparison of Immortalized Fa2N-4 Cells and Human Hepatocytes as in Vitro Models for Cytochrome P450 Induction. Drug Metabolism and Disposition (2008)36 : 1046-1055.

Hazama K, Asayama S, Kawakami H. Up-Regulation of Gene Expression by Transfection to Hepatocyte Spheroids. Molecular pharmaceutics (2012) 9 : 3602-05.

Higuchi S, Wu R,Zhou M, Ravikumar T S, Wang P. Downregulation of hepatic cytochrome P-450 isoforms and PPAR-gamma: their role in hepatic injury and proinflammatory responses in a double-hit model of hemorrhage and sepsis. The Journal of surgical research (2007) 137 : 46-52.

Ho C-T, Lin R-Z, Chen R-J, Chin C-K, Gong S-E, Chang H-Y, Peng H-L, Hsu L, Yew T-R, Chang S-F, Liu C-H. Liver-cell patterning Lab Chip: mimicking the morphology of liver lobule tissue. Lab on a chip (2013).

Horobin R W, Stockert JC, Rashid-Doubell F. Uptake and localisation of small-molecule fluorescent probes in living cells: a critical appraisal of QSAR models and a case study concerning probes for DNA and RNA. Histochemistry and cell biology (2013) 139 : 623-37.

Howarth M, Takao K, Hayashi Y, Ting A Y. Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase. PNAS (2005) 102 : 7583-7588.

Huang B, Wu H, Bhaya D, Grossman A, Granier S, Kobilka B K, Zare R N. Counting low-copy number proteins in a single cell. Science (2007) 315 : 81-4.

Huang M, Fan S, Xing W, Liu C. Microfluidic cell culture system studies and computational fluid dynamics. Mathematical and Computer Modelling (2010) 52 : 2036-2042.

Huh D, Hamilton G A, Ingber D E. From 3D cell culture to organs-on-chips. Trends in cell biology (2011) 21 : 745-54.

Huth J, Buchholz M, Kraus J M, Mølhave K, Gradinaru C, von Wichert G, Gress T M, Neumann H, Kestler H A. TimeLapseAnalyzer: Multi-target analysis for live-cell imaging and time-lapse microscopy. Computer Methods and Programs in Biomedicine (2011) 104 : 227-234.

Iverson S V, Comstock K M, Kundert J A, Schmidt E E. Contributions of new hepatocyte lineages to liver growth, maintenance, and regeneration in mice. Hepatology (2011) 54 : 655-63.

Jennen DG J, Magkoufopoulou C, Ketelslegers H B, van Herwijnen M H M, Kleinjans J C S, van Delft J H M. Comparison of HepG2 and HepaRG by whole-genome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. Toxicological sciences (2010) 115 : 66-79.

Johnson I A, Kumar SG B, Malathi R. De-intercalation of Ethidium Bromide and Acridine Orange by Xanthine Derivatives and Their Modulatory Effect on Anticancer Agents: A study of DNA-directed Toxicity Enlightened by Time Correlated Single Photon Counting. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics (2003) 20 : 677-685.

Ju L, Zhang G, Zhang C, Sun L, Jiang Y, Yan C, Duerksen-Hughes P J , Zhang X, Zhu X , Chen F F, Yang J. Quantum dot-related genotoxicity perturbation can be attenuated by PEG encapsulation. Mutation Research (2013) 753 : 54–64.

Kamentsky L, Jones T R, Fraser A, Bray M A, Logan D J, Madden K L, Ljosa V, Rueden C, Eliceiri K W, Carpenter A E. Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. Bioinformatics (2011) 27 : 1179–1180.

Kanebratt K P and Andersson T B. Evaluation of HepaRG Cells as an in Vitro Model for Human Drug Metabolism Studie. Drug Metabolism and Distribution (2008) 36 : 1444-1452.

Kelm J M, Timmins N E, Brown C J, Fussenegger M, Nielsen L K. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. Biotechnology and bioengineering (2003) 83 : 173-80.

Khan R, Lee J E, Yang Y-M, Liang F-X, Sehgal P B. Live-cell imaging of the association of STAT6-GFP with mitochondria. PloS one (2013) 8 : e55426.

Khetani S R and Bhatia S N. Microscale culture of human liver cells for drug development. Nature biotechnology (2008) 26 : 120-6.

Kikuta J and Ishii M. Recent Advances in Intravital Imaging of Dynamic Biological Systems. Journal of Pharmacological Sciences (2012) 119 : 193-197.

Kim H J, Huh D, Hamilton G, Ingber D E. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. Lab on a chip (2012) 12 : 2165-74.

Knasmüller S, Parzefall W, Sanyal R, Ecker S, Schwab C, Uhl M, Mersch-Sundermann V, Williamson G, Hietsch G, Langer T, Darroudi F, Natarajan A T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. Mutation research (1998) 402 : 185-202.

Kruh GD and Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. Oncogene. (2003) 22 : 7537-52.

Krysko D V, Vanden B T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. Methods (2008) 44 : 205-21.

Larbret Frédéric. Etude de la mort cellulaire par Cytométrie en Flux. Cours à l'Université Sophia Antipolis, 2013.

Leclerc E, David B, Griscom L, Lepioufle B, Fujii T, Layrolle P, Legallais C. Study of osteoblastic cells in a microfluidic environment. Biomaterials (2006) 27 : 586-95.

LeCluyse E L, Witek RP, Andersen M E, Powers M J. Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. Critical reviews in toxicology (2012) 42 : 501-48.

Lee P J, Hung P J, Lee L P. An Artificial Liver Sinusoid With a Microfluidic Endothelial-Like Barrier for Primary Hepatocyte Culture. Biotechnology and Bioengineering (2007) 97 : 1340-1346.

Lee M-Y, Kumar R A, Sukumaran S M, Hogg M G, Clark D S, Dordick J S. Three-dimensional cellular microarray for high-throughput toxicology assays. PNAS (2008) 105 : 59-63.

Legendre A, Baudoin R, Alberto G, Paullier P, Naudot M, Bricks T, Brocheton J, Jacques S, Cotton J, Leclerc E. Metabolic Characterization of Primary Rat Hepatocytes Cultivated in Parallel Microfluidic Biochips. Journal of Pharmaceutical Sciences (2013) 102 : 3264–3276.

Lemasters J J, Nieminen A L, Qian T, Trost L C, Elmore S P, Nishimura Y, Crowe R A, Cascio W E, Bradham C A, Brenner D A, Herman B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. Biochimica et biophysica acta (1998) 1366 : 177-96.

Li S and Chen S. Polydimethylsioxane Fluidic Interconnects for Microfluidic Systems. IEEE Transactions on advanced Packaging (2003) 26 : 242-247.

Lieggi N T, Edvardsson A, O'Brien P J. Translation of novel anti-cancer cytotoxicity biomarkers detected with high content analysis from an in vitro predictive model to an in vivo cell model. Toxicology in vitro (2010) 24 : 2063-71.

Lin Z, Cherng-Wen T, Roy P, Trau D. In-situ measurement of cellular microenvironments in a microfluidic device. Lab on a chip (2009)9 : 257-62.

Lin D-S, Zhuang X, Wong S H, Kupnik M, Khuri-Yakub B T. Encapsulation of Capacitive Micromachined Ultrasonic Transducers Using Viscoelastic Polymer. J. Microelectromech Syst. (2010) 6: 1341–1351.

Linder V, Wu H, Jiang X, Whitesides G M. Rapid prototyping of 2D structures with feature sizes larger than 8 microm. Analytical chemistry (2003) 75 : 2522-7.

Liu, Q-B, Liu, L-L, Lu Y-M, Tao R-R, Huang J-Y, Shioda N, Moriguchi S, Fukunaga K, Han F, Lou, Y-J. The induction of reactive oxygen species and loss of mitochondrial Omi/HtrA2 is associated with S-nitrosoglutathione-induced apoptosis in human endothelial cells. Toxicology and applied pharmacology (2010) 244 : 374-84.

Liu W, Li L, Wang J-C, Tu Q, Ren L, Wang Y, Wang J. Dynamic trapping and high-throughput patterning of cells using pneumatic microstructures in an integrated microfluidic device. Lab on a chip (2012) 12 : 1702-1709.

Loichot C and Grima M. Chaptire 5 : Métabolisme des medicaments. Faculté de Médecine de Strasbourg, Module de Pharmacologie Générale, 2004.

Luis G and Valerio Jr. In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. Toxicology and applied pharmacology (2009) 241 : 356-70.

Lukandu O M, Bredholt T, Neppelberg E, Gjertsen B T, Johannessen A C, Vintermyr O K, Costea D E. Early loss of mitochondrial inner transmembrane potential in khat-induced cell death of primary normal human oral cells. Toxicology (2009) 263 : 108-16.

Masson M J, Carpenter L D, Graf M L, Pohl L R. Pathogenic role of natural killer T and natural killer cells in acetaminophen-induced liver injury in mice is dependent on the presence of dimethyl sulfoxide. Hepatology (2008) 48 : 889-97.

Mata A , Fleischman A J, Roy S. Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems. Biomedical Microdevices (2005) 7 : 281-293.

Meijering E, Dzyubachyk O, Smal I. Methods for cell and particle tracking. Methods of enzymology (2012) 504 : 183-200.

Meli L, Jordan E T, Clark D S, Linhardt R J, Dordick J S. Influence of a three-dimensional, microarray environment on human cell culture in drug screening systems. Biomaterials (2012) 33 : 9087-96.

Mills J B, Rose K A, Sadagopan N, Sahi J, De Morais S M F. Induction of Drug Metabolism Enzymes and MDR1 Using a Novel Human Hepatocyte Cell Line. JPET (2004) 309 : 303-309.

Morgan E T. Impact of infectious and inflammatory disease on cytochromeP450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. Clin Pharmacol Ther (2009) 85 : 434-438.

Nadanaciva S, Lu S, Gebhard D F, Jessen B, Pennie W D, Will Y. A high content screening assay for identifying lysosomotropic compounds. Toxicology in vitro (2011) 25 : 715-23.

Nechyporuk-Zloy V, Dieterich P, Oberleithner H, Stock C, Schwab A. Dynamics of single potassium channel proteins in the plasma membrane of migrating cells. American journal of physiology. Cell physiology (2008) 294 : C1096-102.

Neumann B, Held M, Liebel U, Erfle H, Rogers P, Pepperkok R, Ellenberg J. High-throughput RNAi screening by time-lapse imaging of live human cells. Nature Methods (2006) 3 : 385-390.

Ng S, Wu Y-N, Zhou Y, Toh Y-E, Ho Z-Z, Chia S-M, Zhu J-H, Mao H-Q, Yu H. Optimization of 3-D hepatocyte culture by controlling the physical and chemical properties of the extra-cellular matrices. Biomaterials (2005) 26 : 3153-63.

Oh T-I, Sung J H, Tatosian D, Shuler M L, Kim D. Real-time fluorescence detection of multiple microscale cell culture analog devices in situ. Cytometry (2007) 71 : 857-65.

Ohta T, Tokishita S-I, Yamagata H. Ethidium bromide and SYBR Green I enhance the genotoxicity of UV-irradiation and chemical mutagens in E. coli. Mutation Research (2001) 492 : 91–97.

Ong S-M, Zhang C, Toh Y-C, Kim S H, Foo H L, Tan C H, van Noort D, Park S, Yu H. A gel-free 3D microfluidic cell culture system. Biomaterials (2008) 29 : 3237-44.

Otsu N. A threshold selection method from grey scale histogram, *IEEE Trans. on Syst. Man and Cyber.*(1979) 1 : 62-66.

Pang Y, Montagne K, Shinohara M, Komori K, Sakai Y. Liver tissue engineering based on aggregate assembly: efficient formation of endothelialized rat hepatocyte aggregates and their immobilization with biodegradable fibres. Biofabrication (2012) 4 : 045004.

Pastor C M and Suter P M. Hepatic hemodynamics and cell functions in human and experimental sepsis. Anesthesia and analgesia (1999) 89 : 344-52.

Park J, Fan Z, Deng C X. Effects of shear stress cultivation on cell membrane disruption and intracellular calcium concentration in sonoporation of endothelial cells. J. Biomech. (2011) 44 : 164–169.

Pereira Rodrigues N, Sakai Y, Fujii T. Cell-based microfluidic biochip for the electrochemical real-time monitoring of glucose and oxygen. Sensors and Actuators B: Chemical (2008) 132 : 608-613.

Perlman Z E, Slack M D, Feng Y, Mitchison T J, Wu L F, Altschuler S J. Multidimensional drug profiling by automated microscopy. Science (2004) 306 : 1194-8.

Pool M, Thiemann J, Bar-Or A, Fournier A E. NeuriteTracer: a novel ImageJ plugin for automated quantification of neurite outgrowth. Journal of neuroscience methods (2008) 168 : 134-9.

Powers M J, Janigian D M, Wack K E, Baker C S, Stolz D B, Griffith L G. Functional Behavior of Primary Rat Liver Cells in a Three-Dimensional Perfused Microarray Bioreactor. Tissue Engineering (2002) 8 : 499-513.

Prot J-M, Aninat C, Griscom L, Razan F, Brochot C, Guguen Guillouzo C, Legallais C, Corlu A, Leclerc E. Improvement of HepG2/C3a Cell Functions in a Microfluidic Biochip. Biotechnology and Bioengineering (2011a) 108 : 1704-1715.

Prot J-M, Briffaut A-S, Letourneur F, Chafey F, Merlier F, Grandvalet Y, Legallais C, Leclerc E. Integrated Proteomic and Transcriptomic Investigation of the Acetaminophen Toxicity in Liver Microfluidic Biochip. Plos one (2011b) 6 : e21268.

Qi W, Ding D, Salvi RJ. Cytotoxic effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on cochlear organotypic cultures. Hear Res. (2008) 236 : 52-60.

Rees P, Brown M R, Summers H D, Holton M D, Errington R J, Chappell S C, Smith P J. A transfer function approach to measuring cell inheritance. BMC systems biology (2011) 5 : 32-38.

Rieger S, Kulkarni R P, Darcy D, Fraser S E, Köster R W. Quantum dots are powerful multipurpose vital labeling agents in zebrafish embryos. Developmental dynamics (2005) 234 : 670-81.

Ripp S L, Mills J B, Fahmi O A, Trevena K A, Liras J L, Maurer T S, De Morais S M. Use of Immortalized Human Hepatocytes to Predict the Magnitude of Clinical Drug-Drug Interactions Caused by CYP3A4 Induction. Drug Metabolism and Disposition (2006) 34 : 1742-48.

Rizvi F, Heimann T, Herrnreiter A, O'Brien W J. Mitochondrial dysfunction links ceramide activated HRK expression and cell death. Plos one (2011) 6 : e18137.

Rodrigues R M, Macko P, Palosaari T, Whelan M P. Autofluorescence microscopy: a non-destructive tool to monitor mitochondrial toxicity. Toxicology letters (2011) 206 : 281-8.

Schmolze D B, Standley C, Fogarty K E, Fischer A H. Advances in microscopy techniques. Archives of pathology & laboratory medicine (2011) 135 : 255-63.

Ehnert S, Schyschka L, Noss A, Knobeloch D, Kleeff J, Büchler P, Gillen S, Stöckle U, Burkhar, J, Fabian E, Nussler A K. Further characterization of autologous NeoHepatocytes for in vitro toxicity testing. Toxicology in vitro (2011) 25 : 1203-8.

Shih M-C, Tseng S-H, Weng Y-S, Chu I-M, Liu C-H. A microfluidic device mimicking acinar concentration gradients across the liver acinus. Biomedical microdevices (2013) 15 : 767-780.

Shitara Y, Horie T, Sugiyama Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. European journal of pharmaceutical sciences (2006) 27 : 425-46.

Silbernagl S and Despopoulos A. Atlas de poche de physiologie. 4éme edition rue et augmentée par Etienne Savin. Médecin-Sciences Flammarion, 1992.

Soars M G, McGinnity D F, Grime K, Riley R J. The pivotal role of hepatocytes in drug discovery. Chemico-biological interactions (2007) 168 : 2-15.

Sterrenburg F A S. Microscopy Primer. Micscape Magazine (2002) disponible sur : http://www.labomediqual.ch/microscope.

Strazzabosco M and Fabris L. Functional Anatomy of Normal Bile Ducts. The Anatomical record (2008) 291 : 653-660.

Sung J and Shuler M. In vitro microscale systems for systematic drug toxicity study. Bioprocess and biosystems engineering (2010) 33 : 5-19.

Sunman J A, Hawke R L, LeCluyse E L, Kashuba A D. Kuppfer cell-mediated IL-2 suppression of CYP3A activity in humanhepatocytes. Drug Metab Dispos (2004) 32 : 359-363.

Tatosian D and Shuler M. A novel system for evaluation of drug mixtures for potential efficacy in treating multidrug resistant cancers. Biotechnology and Bioengineering (2009) 103 : 187-198.

Terryn C, Bonnomet A, Cutrona J, Coraux C, Tournier J-M, Nawrocki-Raby B, Polette M, Birembant P, Zham J M. Video-microscopic imaging of cell spatio-temporal dispersion and migration. Critical Reviews in Oncology/Hematology (2009) 69 : 144–152.
Thygesen P, Macheras P, Van Peer A. Physiologically-based PK/PD modelling of therapeutic macromolecules. Pharmaceutical research (2009) 26 : 2543-50.

Tostões R M, Leite S B, Miranda J P, Sousa M, Wang D I C, Carrondo M J T, Alves P M. Perfusion of 3D Encapsulated Hepatocytes—A Synergistic Effect Enhancing Long-Term Functionality in Bioreactors. Biotechnology and Bioengineering (2011) 108 : 41-49.

Tuschl G, Hrach J, Walter Y, Hewitt P G, Mueller S O. Serum-free collagen sandwich cultures of adult rat hepatocytes maintain liver-like properties long term: a valuable model for in vitro toxicity and drug-drug interaction studies. Chemico-biological interactions (2009) 181 : 124-37.

Ulvestad M, Darnell M, Molden E, Ellis E, Åsberg A, Andersson T B. Evaluation of organic anion-transporting polypeptide 1B1 and CYP3A4 activities in primary human hepatocytes and HepaRG cells cultured in a dynamic three-dimensional bioreactor system. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics (2012) 343 : 145-56.

van Midwoud P M, Groothuis GM M, Merema M T, Verpoorte E. Microfluidic biochip for the perifusion of precision-cut rat liver slices for metabolism and toxicology studies. Biotechnology and bioengineering (2010) 105 : 184-94.

Verdaasdonk J S, Stephens A D, Haase J, Bloom K. Bending the rules: Widefield microscopy and the Abbe limit of resolution. Journal of cellular physiology (2013) DOI: 10.1002/jcp.24439.

Vermeir M, Annaert P, Mamidi R NVS, Roymans D, Meuldermans W, Mannens G. Cell-based models to study hepatic drug metabolism and enzyme induction in humans. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. (2005) 1 : 75-90.

Viau Claude and Tardif Robert. Chaptire 5 : Toxicologie. Environnement et santé publique – Fondements et patrique, p. 119-143. Par Gérin M, Gosselin P, Cordier S, Viau C, Quénel P, Dewailly E. Edisem / Tec & Doc, Acton Vale / Paris, 2003.

Wang Y, Shyy J Y-J, Chien S. Fluorescence proteins, live-cell imaging, and mechanobiology: seeing is believing. Annual review of biomedical engineering (2008) 10 : 1-38.

Warther D, Gug S, Specht A, Bolze F, Nicoud J, Mourot A, Goeldmer A. Two-photon Uncaging : New Prospects in Neuroscience and Cellular Biology. Bioorg. Med. Chem. (2010) 18 : 7753-58.

Waters J. Live-Cell Fluorescence Imaging. Methods in Cell (2007) 81 : 115-140.

Waters C M, Glucksberg M R, Depaola N, Chang J, Grotberg J B. Shear stress alters pleural mesothelial cell permeability in culture. J Appl Physiol (1996) 81 : 448-458.

Westerink W and Schoonen W. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. Toxicology in vitro (2007) 21 : 1592-602.

Westerink W M A, Schirris T J J, Horbach G J, Schoonen W G E J. Development and validation of a high-content screening in vitro micronucleus assay in CHO-k1 and HepG2 cells. Mutation research (2011) 724 : 7-21.

Wilkening S and Bader A. Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. Journal of biochemical and molecular toxicology (2003) 17 : 207-13.

Wilkening S, Stahl F, Bader A. Comparison of primary human hepatocyte and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. Drug Metabolism and Disposition (2003) 31 : 1035-1042.

Williams G M and Latropoulos M J. Alteration of Liver Cell Function and Proliferation: Differentiation Between Adaptation and Toxicity. Toxicol Pathol (2002) 30: 41-53.

Wu R, Cui X, Dong W, Zhou M, Simms HH, Wang P. Suppression of hepatocyte CYP1A2 expression by Kupffer cells via AhR pathway : the central role of proinflammatory cytokines. Int J Mol Med. (2006) 18 : 339-46.

Xia C Q and Smith P G. Drug Efflux Transporters and Multidrug Resistance in Acute Leukemia: Therapeutic Impact and Novel Approaches to Mediation. Molecular Pharmacology (2012) 82 : 1008-1021.

Xu J J, Henstock P V, Dunn M C, Smith A R, Chabot J R, de Graaf D. Cellular imaging predictions of clinical drug-induced liver injury. Toxicological sciences (2008) 105 : 97-105.

Yoon M, Campbell J L, Andersen M E, Clewell H J. Quantitative in vitro to in vivo extrapolation of cell-based toxicity assay results. Critical reviews in toxicology (2012) 42 : 633-52.
Youn H-Y, McCanna D J, Sivak J G, Jones L W. In vitro ultraviolet-induced damage in human corneal, lens, and retinal pigment epithelial cells. Molecular vision (2011) 17 : 237-46.

Young E and Beebe D. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. Chemical Society reviews (2010) 39 : 1036-48.

Zamek-Gliszczynski M J, Hoffmaster K A, Nezasa K-I, Tallman M N, Brouwer K L R. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. European journal of pharmaceutical sciences (2006) 27 : 447-86.

Zhang S, Tong W, Zheng B, Susanto T A K, Xia L, Zhang C, Ananthanarayanan A, Tuo X, Sakban R B, Jia R, Iliescu C, Chai K-H, McMillian M, Shen S, Leo H, Yu H. A robust high-throughput sandwich cell-based drug screening platform. Biomaterials (2011) 32 : 1229-41.

Zhao L, Shang E Y, Sahajwalla C G. Application of Pharmacokinetics – Pharmacodynamics / Clinical Response Modeling and Simulation for Biologics Drug. Journal of Pharmaceutical Sciences (2012) 101 : 4367-4382.

Zheng G, Lee S A, Antebi Y, Elowitz M B, Yang C. The ePetri dish, an on-chip cell imaging platform based on subpixel perspective sweeping microscopy (SPSM). PNAS (2011) 108 : 16889-94.

Ziaie B, Baldi A, Lei M, Gu Y, Siegel R A. Hard and soft micromachining for BioMEMS: review of techniques and examples of applications in microfluidics and drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews (2004) 56 : 145-172.