

Titre: Afficheurs microfluidiques comme outil d'étude des voies de signalisation cellulaires en biologie des systèmes
Title: [Afficheurs microfluidiques comme outil d'étude des voies de signalisation cellulaires en biologie des systèmes](#)

Auteur: Pierre Clapperton Richard
Author: [Pierre Clapperton Richard](#)

Date: 2022

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Clapperton Richard, P. (2022). Afficheurs microfluidiques comme outil d'étude des voies de signalisation cellulaires en biologie des systèmes [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/10356/>
Citation: [Clapperton Richard, P. \(2022\). Afficheurs microfluidiques comme outil d'étude des voies de signalisation cellulaires en biologie des systèmes \[Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal\]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/10356/](#)

Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/10356/>
PolyPublie URL: [https://publications.polymtl.ca/10356/](#)

Directeurs de recherche: Thomas Gervais, & Laurent Potvin-Trottier
Advisors: [Thomas Gervais](#), [Laurent Potvin-Trottier](#)

Programme: Génie biomédical
Program: [Génie biomédical](#)

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Afficheurs microfluidiques comme outil d'étude des voies de signalisation
cellulaires en biologie des systèmes**

PIERRE CLAPPERTON RICHARD

Institut de génie biomédical

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie biomédical

Mai 2022

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

**Afficheurs microfluidiques comme outil d'étude des voies de signalisation
cellulaires en biologie des systèmes**

présenté par **Pierre CLAPPERTON RICHARD**

en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Marc LAVERTU, président

Thomas GERVAIS, membre et directeur de recherche

Laurent POTVIN-TROTTIER, membre et codirecteur de recherche

Lucien WEISS, membre

DÉDICACE

À mon grand-père Hercule qui aurait sûrement été bien curieux de lire ça,

À mes proches et ma famille sur qui je peux toujours compter,

À l'abordage,

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de recherche, Thomas Gervais, et à mon codirecteur de recherche, Laurent Potvin-Trottier, pour m'avoir fait confiance avec ce projet et pour leur supervision tout au long de ma maîtrise.

Je tiens aussi à remercier mes collègues, présents et anciens, du laboratoire à Polytechnique, notamment Pierre-Alexandre Goyette pour m'avoir transmis tes secrets sur les PCD, Elena Refet pour tes conseils en début de maîtrise, Oscar Boyadjian-Braize pour les bons moments passés au labo pré-pandémie, Amélie St-Georges-Robillard pour ta bonne gestion rassurante et Dina Dorri pour toutes tes réponses à mes petites questions.

Merci à tous mes amis qui m'ont aidé, de près ou de loin, à garder le moral même quand plus rien n'allait avec mon projet, notamment William et Pier-Daniel pour les bonnes rigolades à distance, Olivier et Alexa pour m'avoir accueilli dans votre bulle pendant la pandémie, Laurent pour les parties d'échecs et les séances de courses. Mention spéciale à Antoine Noreau pour m'avoir toujours encouragé à continuer, et ce, dès le jour un.

Évidemment je remercie ma famille, mes parents et ma sœur, pour leur support constant et perpétuel. Il y a beaucoup de vous dans ce travail.

Merci également à Antoine, François, Adèle et Serge pour leur relecture de mon manuscrit et leurs commentaires très utiles.

En terminant, je souligne le support financier que j'ai reçu pendant ma maîtrise par l'entremise des bourses du Fonds de recherche du Québec sur la nature et les technologies (FRQNT) et du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG).

ACKNOWLEDGMENTS

I would now want to thank all my colleagues at Concordia, campus Loyola, that made my stay there a lot more enjoyable.

First, I want to thank Mathieu Husser for showing me the ropes of cell culture and answering all my questions in cell biology. Also, thanks to Jenny-Ann Gagnon for the moral support in the TC room and the few highly appreciated carpool rides to the campus.

Finally, I would like to thank more specifically all the members of Potvin Lab for welcoming me as one of their own and being truly helpful at every time. Notably, thanks to Giselle McCallum and Krista Jager for your help when I arrived in the lab, thanks to Tina Papazotos for your help with all the orders and for your expertise on cloning and PCR (even though the CRISPR-dCas9 part of my project never came to fruition), thanks to Felipe Perez, Maria Orozco Hidalgo, Paige Allard and Euan Joly-Smith for the good atmosphere in the lab. Finally, a special thanks to Saba Mesgari, those writing sessions with you were not only delightful, but also productive in a way that allowed me to achieve my goals in time.

Another thanks to Sandy Nandagopal for his advices with the Notch experiments.

RÉSUMÉ

L'étude de la signalisation cellulaire est de première importance pour l'approfondissement des connaissances fondamentales en biologie des systèmes, mais aussi pour le développement de nouveaux traitements dans le cas de maladies où les voies de signalisation sont déréglées. Il est maintenant acquis que les cellules ont la capacité d'utiliser la dynamique afin d'encoder les signaux en provenance de leur environnement. C'est-à-dire que la façon dont la concentration des protéines de signalisation varie dans le temps influence l'expression des gènes en aval et donc le destin de la cellule.

Pour étudier la dynamique de signalisation cellulaire, il faut recourir à des méthodes qui permettent de stimuler en fréquence les voies de signalisation avec une haute résolution temporelle tout en permettant idéalement une analyse multiplexée. Parmi les techniques couramment utilisées, on retrouve les systèmes microfluidiques sur puce ou encore les systèmes optogénétiques. Toutefois, l'étude de la dynamique de signalisation cellulaire représente toujours un défi pour les chercheurs en raison de la complexité liée à la perturbation dynamique des voies de signalisation. Il se trouve qu'une récente technologie en microfluidique ouverte aurait le potentiel de faciliter et d'accélérer les recherches sur la dynamique de communication des cellules. Il s'agit des afficheurs microfluidiques, soient des dispositifs qui, à l'aide de canaux verticaux, injectent et aspirent des fluides sur une surface ouverte afin de créer différents motifs d'écoulement, et ce, avec une grande précision spatiale et temporelle.

L'objectif du présent travail était de caractériser les performances des afficheurs microfluidiques pour la stimulation dynamique et l'analyse de voies de signalisations cellulaires. D'abord, les techniques de design et de fabrication des afficheurs microfluidiques ont été reprises pour la conception d'un dispositif adapté à l'utilisation en culture cellulaire. La configuration retenue est celle de type fleur, où les injections se répartissent en cercle autour d'une ouverture d'aspiration commune pour former des écoulements en forme de pétales. Un compromis a été atteint pour limiter les forces de cisaillement au niveau des cellules, obtenir plus d'une centaine de cellules sous les zones traitées et réduire les temps de transition des injections jusqu'à environ 7s.

Le projet est ensuite passé à l'étape de l'utilisation de l'afficheur microfluidique en culture cellulaire. Le système a été validé en effectuant des tests de marquage de cellules avec le fluorophore Hoechst 33258. La précision spatiale et temporelle de la livraison de réactifs aux

cellules a été vérifiée expérimentalement, permettant de constater le bon fonctionnement de l'afficheur conçu et des protocoles expérimentaux développés. Des expériences ont aussi démontré que la viabilité cellulaire n'était pas affectée par l'utilisation de l'afficheur sur les cellules. En effet, la viabilité est maintenue entre 94 % et 97 %, semblable au contrôle négatif (96,93 %), pour des durées d'utilisation de 30 min, 1 h et 1 h 30, et ce, dans la plage usuelle des paramètres d'utilisation de l'afficheur.

Finalement, la technologie des afficheurs a été mise à l'essai pour activer dynamiquement la voie de signalisation cellulaire Notch. D'abord, une solution d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) a été utilisée pour activer le récepteur Notch1 de cellules exprimant en aval la citrine, un gène rapporteur fluorescent. En utilisant l'afficheur, il a été possible d'activer la voie Notch selon 6 différents temps d'activation au sein de la même expérience et de démontrer que le niveau d'activation Notch est proportionnel au temps d'activation par EDTA. Ensuite, l'afficheur a été utilisé pour envoyer des séries de pulses d'activation aux cellules afin d'étudier la réponse en fréquence de la voie Notch au niveau de l'expression des gènes d'intérêt Hes1 et Hey1. Les résultats, bien que préliminaires, démontrent que les afficheurs microfluidiques sont bel et bien efficaces pour étudier la dynamique d'une voie de signalisation.

Ce projet pave la voie à de futures recherches utilisant les afficheurs microfluidiques pour la caractérisation de la réponse en fréquence de la voie Notch, et éventuellement d'autres voies de signalisation. Les travaux présentés ont permis de faire la transition de la technologie des afficheurs microfluidiques à leur utilisation en culture cellulaire et la création de protocoles pour les expériences en biologie cellulaire.

ABSTRACT

Due to the important and ubiquitous role of cell signaling in biology, its study is not only essential to improve fundamental knowledge, but also for the development of new drugs targeting deregulated signaling pathways in various diseases. It has emerged that cells have the ability to use dynamic properties to encode signals coming from their environment. That is to say, the way the concentration of signaling molecules varies through time impact downstream gene expression and cell fate.

In order to study dynamics in cell signaling efficiently, techniques allowing to probe the cells with a high temporal resolution and in a multiplexed fashion are required. Among those techniques, there are some already successfully used such as microfluidic on-chip devices and optogenetics. However, the study of cell signaling dynamics remains a constant challenge for researchers due to the complexity of making targeted dynamic perturbations in signaling pathways. A recent technology in the field of open-space microfluidic has the potential to facilitate and accelerate research on cell dynamics, namely: the chemical microfluidic displays. These devices control the flow of a reagent over an open surface with the help of vertical channels coming out of a flat probe head. By adjusting the ratio of injection and aspiration of each aperture, it allows the confinement of fluids in various patterns with a high spatial and temporal resolution.

The main objective of the present work was to characterize the performances of the microfluidic display for the dynamic stimulation and multiplexed analysis of cell signaling pathways. First, a device of this type has been designed to be suited for use in cell culture, following fabrication techniques previously developed. The chosen configuration is that of the flower type, where the injections are distributed in a circle around a common aspiration aperture, thus forming petal shapes flows. A compromise has been reached in the design to limit the shear stress on the cells, to obtain more than a hundred cells under the treated areas, and to reduce the transition times of the injections down to approximately 7 s.

The next step in the project was to transition to the use of the microfluidic display in cell culture. The system has been validated by cell staining experiments using Hoechst 33258 fluorophore. The precision of spatial and temporal resolution for reagent delivery to the cells has also been experimentally verified, allowing to see the proper functioning of the display and the experimental protocols. Experiments have also shown that cell viability is not affected by the microfluidic

display operated over the cells. Indeed, cell viability was maintained between 94 % and 97 %, a level similar to the negative control (96,93 %), for use time of 30 min, 1 h and 1 h 30, and that under usual conditions of the display.

Finally, the microfluidic display technology has been used to dynamically stimulate the Notch signaling pathway in cells. First of all, an ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution was used to activate the Notch1 receptor in cells expressing a citrine, a downstream fluorescent reporter. The Notch pathway was activated with 6 different EDTA activation time during the same experiment using the display, thus showing that the level of Notch activation is proportional to the activation time. Next, the display has been used to send series of activation pulses to cells in order to measure the Notch frequency response in the downstream gene expression of Hes1 and Hey1. The results, even though preliminary, show the microfluidic display efficiency to study cell signaling dynamics.

This project paves the way for future researches using microfluidic display to study the Notch pathway frequency response, and eventually other interesting signaling pathway. The work presented has allowed the transition of the microfluidic displays to their use in cell culture, in addition of the creation of adapted protocols in cell biology.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
ACKNOWLEDGMENTS.....	V
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT	VIII
TABLE DES MATIÈRES	X
LISTE DES FIGURES.....	XIV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXII
LISTE DES ANNEXES.....	XXV
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Contexte	1
1.2 Objectifs de recherche	3
1.3 Organisation du mémoire	3
1.4 Contributions de l'auteur.....	4
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	5
2.1 Biologie des systèmes et biologie synthétique.....	5
2.2 Phénomènes dynamiques dans la signalisation cellulaire	6
2.3 Voie de signalisation Notch	9
2.3.1 Fondation moléculaire.....	9
2.3.2 Propriétés dynamiques	10
2.4 Importance de l'étude de la dynamique de signalisation en pharmacologie.....	12
2.5 Techniques pour étudier l'encodage dynamique dans la signalisation cellulaire	14
2.5.1 Optogénétique	15

2.5.2 Microfluidique classique	17
2.6 Microfluidique ouverte.....	19
2.6.1 Le changement de paradigme.....	19
2.6.2 Du dipôle aux multipôles microfluidiques	22
CHAPITRE 3 CONCEPTION D'UN AFFICHEUR MICROFLUIDIQUE ADAPTÉ À LA CULTURE CELLULAIRE.....	25
3.1 Prise en main de la technologie.....	25
3.1.1 Fabrication et utilisation des afficheurs microfluidiques	25
3.1.2 Premiers essais	26
3.2 Choix de la configuration de l'afficheur	27
3.2.1 Les <i>Pixelated Chemical Display</i> et leur utilisation en fréquence.....	27
3.2.2 Description analytique de la configuration fleur.....	32
3.2.3 La configuration fleur en fréquence	33
3.3 Optimisation du dispositif pour l'utilisation en culture cellulaire.....	36
3.3.1 Choix du nombre de pétales	38
3.3.2 Aire des pétales et cisaillement	38
3.3.3 Choix des dimensions r et G	41
3.3.4 Vérification du nombre de Reynolds	41
3.3.5 Fabrication du dispositif.....	42
3.4 Validation expérimentale de l'afficheur.....	43
3.4.1 Résolution spatiale	43
3.4.2 Résolution temporelle	45
CHAPITRE 4 VALIDATION DU DISPOSITIF EN CULTURE CELLULAIRE.....	46
4.1 Approche méthodologique	46
4.1.1 Culture cellulaire	46

4.1.2 Montage expérimental.....	46
4.1.3 Stérilité	47
4.1.4 Bulles : un problème de gaz en milieu aqueux.....	47
4.2 Livraison de réactif au noyau cellulaire	50
4.2.1 Méthodologie	50
4.2.2 Précision du contrôle spatial	50
4.2.3 Contrôle dose inter-pétales.....	51
4.2.4 Livraison de réactif en fréquence	53
4.3 Viabilité cellulaire	54
4.3.1 Méthodologie	55
4.3.2 Résultats	56
CHAPITRE 5 ÉTUDE DE LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH.....	59
5.1 Activation de la voie Notch avec l'afficheur microfluidique.....	59
5.1.1 Méthodologie	59
5.1.2 Résultats	62
5.2 Quantification de la réponse en fréquence de la voie Notch.....	67
5.2.1 Méthodologie	67
5.2.2 Résultats escomptés.....	70
5.2.3 Résultats	71
CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE	77
6.1 Synthèse des travaux	77
6.1.1 Retour sur les objectifs.....	77
6.2 Comparaison des afficheurs microfluidiques aux autres techniques d'étude de la dynamique des voies de signalisation cellulaire	79
CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	81

7.1	Recommandations	81
7.2	Contributions et ouverture.....	83
RÉFÉRENCES.....		84
ANNEXES		95

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Schéma de quelques voies de signalisation clés chez les cellules mammifères. Reproduite de [36] sous la licence CC BY-SA 3.0.....	7
Figure 2.2 Schéma simplifié des propriétés dynamiques de la voie Ras-ERK selon l'activation par NGF (en bleu) ou par EGF (en orange). Les cellules encodent les signaux extracellulaires dans la dynamique d'activation de ERK, cette dynamique est ensuite décodée pour produire des réponses cellulaires spécifiques. Reproduction permise de [1] sous la licence CC BY 4.0.....	8
Figure 2.3 Schéma de la voie de signalisation Notch. Quand le ligand lie son récepteur Notch, celui-ci subit une série de modifications (métalloprotéase et γ -secretase) qui mènent au relâchement du NICD dans le cytoplasme. Reproduit de [51] avec la permission de <i>Company of Biologists</i>	10
Figure 2.4 Encodage dynamique du récepteur Notch1. Les ligands Dll1 et Dll4 activent l'expression de gènes différents, respectivement Hes1 et Hey1/L, et ce, en passant par le même récepteur Notch grâce à l'encodage dynamique de l'information. Reproduit de [13] avec permission sous licence CC BY-NC-ND 4.0.....	11
Figure 2.5 Dynamique de p53 liée à l'inhibition de l'oncogène MDMX. Pendant la phase I, l'induction de dommages à l'ADN (radiation UV) a un effet synergique qui augmente la mort cellulaire, tandis que l'induction de dommages à l'ADN pendant la phase II inhibe la mort cellulaire. Reproduit de [22] avec la permission de AAAS.	13
Figure 2.6 Exemples de systèmes optogénétiques permettant l'association et la dissociation de complexes protéiques d'intérêt (« POI » de <i>Protein of Interest</i>) à différentes longueurs d'onde. Reproduit de [59] avec la permission de Elsevier.	16
Figure 2.7 Optogénétique appliquée à l'étude de la voie Ras-ERK. (A) Schéma de l'activation de la voie (Ras) par le recrutement de la protéine catalyseur (SOS) à la membrane cellulaire sous un signal lumineux. (B) Utilisation du système pour retrouver la réponse fréquentielle complète de cellules, il s'agit dans ce cas d'un filtre passe-bas de second ordre. Figures reproduites de [66] avec la permission de Elsevier.	17

Figure 2.8 Quelques exemples de dispositifs en microfluidique classique pour l'étude de la dynamique des voies de signalisation cellulaire. (A) Système à une valve et un canal utilisé pour étudier la bande passante de la voie hyperosmolaire chez la levure <i>S. Cerevisiae</i> , reproduit légalement de [73], Copyright 2008 National Academy of Sciences. (B) Système à cinq valves et cinq canaux utilisé pour étudier la dynamique du FT Msn2 chez la levure, reproduit de [74] dans le cadre d'une licence CC BY-NC-SA. (C) Circuit microfluidique comprenant 1500 chambres de culture programmables indépendantes, reproduit de [77] dans le cadre d'une licence CC BY-NC.....	19
Figure 2.9 Exemples de technologies pionnières en microfluidique ouverte. (A) Système de livraison de réactif à deux phases, reproduit de [83] avec la permission de Springer Nature. (B) La « chemistrode », reproduit de [84] conformément aux conditions de PNAS, Copyright 2008 National Academy of Sciences. (C) Schéma de fonctionnement de la MFP, reproduit de [85] avec la permission de Springer Nature.....	21
Figure 2.10 Quadrupôle microfluidique basé sur la théorie multipolaire. (A) Lignes de champ d'un quadrupôle électrostatique 2D. (B), (C) et (D) Schéma multi-vue d'un quadrupôle microfluidique. (E) Démonstration du déplacement dans le quadrupôle microfluidique avec des billes fluorescentes en solution. Figures reproduites de [95] avec la permission de Springer Nature.....	22
Figure 2.11 Du dipôle microfluidique aux PCDs. Visualisation expérimentale de l'écoulement en fluorescence pour différents types d'afficheurs microfluidiques, solution éthylique de fluorescéine en vert et de rhodamine en rouge. (A) Dipôle microfluidique. (B) rMFM en configuration fleur. (C) tMFM à 12 canaux. (D) PCD à 144 pixels fabriqué par impression 3D et (E) visualisation du PCD en opération avec 4 groupes de pixels, les ouvertures au centre des pixels sont les injections et les coins des pixels les aspirations. (A)-(C) Barre d'échelle 500 µm, reproduites de [23] dans la cadre de la licence CC BY 4.0, (D)-(E) Barre d'échelle 1 mm, reproduites de [24] en accord avec la licence PNAS.....	24
Figure 3.1 PCD 6x6. (A) Dispositif assemblé, chaque tube mène à une ouverture sous l'afficheur. (B) Visualisation de l'écoulement sous l'afficheur en damier (2 groupes de pixels), solution éthanol 70 % avec fluorescéine en vert et avec rhodamine en rouge, $q = 0,3 \mu\text{L/s}$, barre d'échelle = 1 mm.....	26

Figure 3.2 Schéma simplifié du montage utilisé pour tester l'envoi de pulses de réactif avec le PCD. Tests avec solution d'éthanol 70 % et de fluorescéine, le média environnant est aussi de l'éthanol 70 %, le débit des pompes-seringues est continuellement ajusté selon le nombre de valves ouvertes et chaque valve contrôle une pulsation. Le même système peut être utilisé pour n fréquences avec n valves. Aspirations non-montrées.	27
Figure 3.3 Pulsations de réactif avec un PCD 6x6. Les deux groupes de pixels, c'est-à-dire les deux RC, sont disposés en damier (comme à la figure 3.1 B), Période = 120 s, RC 1 = 25 %, RC 2 = 50 %, $q = 0,3 \mu\text{L/s}$, barre d'échelle = 1 mm.....	28
Figure 3.4 Courbes d'intensité de fluorescence dans les pixels pulsés en fréquence pour l'expérience montrée à la figure 3.3. Période = 120 s, les temps montrés à la figure 3.3, $t = 0$ s à $t = 140$ s, correspondent ici à $t = 100$ s jusqu'à $t = 240$ s respectivement, unité arbitraire (U. A.) en ordonnée, définition des variables t_{ON} : temps de transition d'ouverture, A_{pp} : amplitude pic-à-pic du signal de fluorescence et LMH : Largeur à mi-hauteur. RC 25 % : $t_{ON} = 32$ s, $A_{pp} = 18,21$ U. A. et LMH=36,5s. RC 50% : $t_{ON} = 54$ s, $A_{pp} = 19,64$ U. A. et LMH = 64 s.	29
Figure 3.5 Courbes d'intensité de fluorescence dans les pixels pour d'autres conditions fréquentielles. (A) Période = 60 s, $q = 0,3 \mu\text{L/s}$, Rapport cyclique 25 % : $t_{ON} = 18$ s, $A_{p-p} = 20,27$ U. A. et LMH = 27 s, Rapport cyclique 50 % : $t_{ON} = 31$ s, $A_{p-p} = 26,66$ U. A. et LMH = 32 s. (B) Période = 10 s, $q = 0,3 \mu\text{L/s}$, aplatissement du signal (voir Annexe A.1 pour les résultats bruts).	31
Figure 3.6 Du dipôle à la fleur par transformation conforme $z \rightarrow z^n$. Représentation des lignes de courant de l'écoulement, ratio constant : $\alpha = 2,5$. (A) Dipôle avec aspiration centrée en $z = 0$ et injection située en $z = 1$. (B) Résultat de la transformation $z \rightarrow z^2$ sur le dipôle en A). (C) Résultat de la transformation $z \rightarrow z^6$ sur le dipôle en A).....	33
Figure 3.7 Afficheur microfluidique de type fleur. (A) Schéma simplifié du montage expérimental pour la configuration fleur. (B) Afficheur de type fleur à 10 pétales assemblé.	34

Figure 3.8 Contrôle de la taille des pétales d'un afficheur fleur à 10 pétales. En maintenant la symétrie pendant la fermeture des pétales, cela permet d'éviter leur courbure. Avec $q_{inj} = 0,5 \mu\text{L/s}$ et $\alpha = 1,5$. Barre d'échelle = 1 mm	35
Figure 3.9 Visualisation à l'échelle des lignes de courant sous l'afficheur fleur à 6 pétales selon r et α.	39
Figure 3.10 Forces de cisaillement sous un afficheur à 6 pétales, selon différents débits d'injection. Avec $\alpha = 1,5$, $G = 100 \mu\text{m}$ et $r = 1 \text{ mm}$. Pour $q_{inj} = 0,1 \mu\text{L/s}$, on a donc $Q_{asp} = 0,9 \mu\text{L/s}$ et pour $q_{inj} = 0,5 \mu\text{L/s}$ on a $Q_{asp} = 4,5 \mu\text{L/s}$	40
Figure 3.11 Aire d'un pétales nécessaire pour contenir 100 cellules (diamètre 40 μm) selon le pourcentage de confluence de la culture cellulaire.	40
Figure 3.12 Nombre de Reynolds sous l'afficheur à 6 pétales avec les paramètres de design finaux $G = 100 \mu\text{m}$, $r = 1,15 \text{ mm}$ et $\alpha = 1,5$.	42
Figure 3.13 Afficheur de type fleur à 6 pétales optimisé pour les expériences avec cellules. (A) Modélisation CATIA. (B) Dispositif assemblé et disposé dans un Petri prêt à l'utilisation au microscope	43
Figure 3.14 Pulsations de réactif avec l'afficheur fleur 6 pétales. Période = 30 s, RC1 25 %, RC2 50 % et RC3 75 %, $q_{inj} = 1 \mu\text{L/s}$, $\alpha = 1,5$, solution aqueuse avec fluorescéine sel de sodium, barre d'échelle = 500 μm	44
Figure 3.15 Temps de transition t_{on} expérimental selon q_{inj} et α. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur plusieurs lectures de temps (3 à 14) et pour différents pétales. Mesures sur des expériences imagées à 1 image par seconde (incertitude sur $t_{on} = 1 \text{ s}$).....	45
Figure 4.1 Montage expérimental pour l'utilisation de l'afficheur microfluidique.	47
Figure 4.2 Exemples d'apparition de bulles pendant les expériences. (A) Déformation de l'écoulement dans les pétales, visualisation avec fluorescéine en solution. (B) Impact des bulles sur les cellules lors d'une expérience de marquage Hoechst 33258 (voir section 4.2). Barres d'échelle = 500 μm	48
Figure 4.3 Empreintes de l'écoulement sous l'afficheur par marquage des noyaux cellulaires avec Hoechst 33258 à 2 mg/mL. Application 20 min, $q = 0,4 \mu\text{L/s}$ et $\alpha = 1,5$. (A) Expérience	

#1, sans champ clair, nombre de cellules moyen par pétales = 219. **(B)** Expérience #2, avec champ clair pour la visualisation des cellules complètes, nombre de cellules moyen par pétales = 275. Barres d'échelle = 500 μ m.....51

Figure 4.4 Contrôle de vérification de dose inter-pétales. **(A)** Empreinte laissée par l'afficheur microfluidique par l'application de 2 μ g/mL Hoechst 22358 pendant 20 min à 0,4 μ L/s et α = 1,3, Barre d'échelle = 500 μ m, contraste et luminosité ajustée pour visualisation. **(B)** Intensité de fluorescence moyenne de n cellules selon chaque pétales pour l'expérience montrée en A), données normalisées par la moyenne d'intensité des six pétales, les barres d'erreur représentent l'erreur type. **(C)** Résultats du test de comparaison des moyennes des échantillons (T-student à seuil 5 %) entre chaque pétales de l'expérience montrée en A). Différence Non-Significative (ns) ou Significative (s). **(D)** Distributions normalisées par la moyenne des valeurs d'intensité de fluorescence des cellules dans les pétales (triplicata; 6 pétales par expérience). La normalisation effectuée $I' = I - I_{\max} - \min(I)$ permet de normaliser les limites de chaque distribution autour de 0 afin de pouvoir inclure les données des 3 expériences différentes dans le même groupe de données et ainsi augmenter la taille de l'échantillon (18 pétales au total). Centrer autour de 0 permet également une meilleure visualisation de la variance (l'écart de la moyenne). Contrôle : distribution normalisée par la moyenne des valeurs d'intensité de fluorescence moyenne de 18 zones aléatoires de taille semblable, prise dans 3 cultures cellulaires à traitement uniforme. **n.s.** : Aucune différence statistiquement significative entre les variances (Test de Fischer d'égalité de deux variances: p-value = 0,9642).52

Figure 4.5 Livraison fréquentielle de doses de marqueur fluorophore Hoechst selon différents rapports cycliques. **(A)** Fréquences appliquées à chacun des pétales pendant l'expérience. **(B)** Visualisation des cellules marquées à différentes intensités, nombre de cellules moyen par pétales = 168 ± 21 . **(C)** Intensité de fluorescence moyenne dans les cellules de chaque pétales, les barres d'erreur représentent l'erreur type. **(D)** L'intensité de fluorescence moyenne est proportionnelle au rapport cyclique, donc à la dose reçue en fréquence, tendance linéaire : $I = 0,0079RC + 0,2377$54

Figure 4.6 Plan d'une expérience de vérification de la viabilité cellulaire. Pour chaque expérience, un débit q identique est fixé pour les six pétales. L'afficheur microfluidique est

placé sur les cellules et les pétales sont ouverts en duplicata pendant les temps indiqués sur le graphique, soit 90 min, 60 min et 30 min. Après 90 min, l'afficheur est retiré et les cellules sont laissées à incuber à 37 °C pendant 45 min. La dernière étape est le marquage AnnexinV-FITC/PI et l'imagerie en microscopie de fluorescence. Cette expérience montre aussi la possibilité de faire des duplicatas intra-expérience, dans ce cas afin d'augmenter le nombre de cellules par condition et éliminer les biais de répartition physique des cellules dans le puits.

56

Figure 4.7 Visualisation des cellules C2C12 mortes et apoptotiques dans un contrôle positif.

Cellules incubées pendant 1 h 30 dans du DMEM à 5 % éthanol (méthodologie d'induction de l'apoptose tirée de [107]). Le contrôle positif a permis d'ajuster les concentrations d'AnnexinV et PI pour optimiser le marquage des cellules.....56

Figure 4.8 Résultats d'expériences de vérification de la viabilité cellulaire pour des débits d'injection de 0,5 µL/s et 1 µL/s. Pour chaque cas, on a : **À gauche**, la carte du niveau de cisaillement théorique sous l'afficheur (rappel : $G = 100 \mu\text{m}$ et $r = 1,15 \text{ mm}$) lorsque les six pétales sont ouverts, avec $\alpha = 1,5$. **À droite**, les cellules sous l'afficheur imagées en fluorescence après le 90 min d'expérience, les duplicatas de pétales sont mis en évidence; 90 min (orange), 60 min (bleu) et 30 min (violet). Barres d'échelle = 500 μm57

Figure 4.9 Viabilité cellulaire expérimentale. Mesurée pour des débits d'injection de 0,5 $\mu\text{L/s}$ et 1 $\mu\text{L/s}$ et pour 3 différents temps d'injection, avec $\alpha = 1,5$. Pour le contrôle négatif, les cellules sont restées 1h30 dans l'incubateur du microscope sans contact avec l'afficheur microfluidique. Les barres d'erreur représentent l'écart-type du résultat de 2 expériences (duplicata).....58

Figure 5.1 Représentation de la lignée cellulaire NECD-GAL4 utilisée. Figure reproduite de [13] dans le cadre de la licence CC BY-NC-ND 4.060

Figure 5.2 Plan des temps d'injection pour l'expérience d'activation Notch par 10 mM EDTA. L'attribution des conditions aux pétales est encore une fois faite dans un souci de symétrie radiale. La fin des activations à $T = 20 \text{ min}$ correspond au début de l'imagerie des cellules en fluorescence (temps 0 à la figure 5.3 et 5.4).61

Figure 5.3 Résultats d'imagerie de fluorescence en temps réel suivant l'expérience d'activation Notch par EDTA. Quelques cellules sont montrées pour chaque durée d'activation par 10 mM EDTA. L'intensité de fluorescence (en jaune) représente la concentration de citrine dans le noyau des cellules, « C- » est le contrôle négatif où il n'y a eu aucune activation EDTA, les activations étaient toutes arrêtées simultanément à 0 h et une image par heure est présentée.....63

Figure 5.4 Mesure du gène rapporteur citrine suivant l'expérience d'activation Notch par EDTA. Pour chaque temps d'activation; À gauche, traces d'intensité de fluorescence totale, À droite, taux d'augmentation de fluorescence totale. « C - » est le contrôle négatif. Les courbes d'intensité sont normalisées par leur valeur initiale pour mettre en évidence l'augmentation de fluorescence totale (I/I_0). Les courbes du taux d'augmentation sont obtenues à partir des traces d'intensité brutes et normalisées avec la valeur maximale entre toutes les conditions. Les barres d'erreur représentent l'erreur type sur $n = 20$ cellules par condition.....65

Figure 5.5 Taux d'augmentation de fluorescence selon le temps d'activation de la voie Notch (fold change : $I_f - I_0$). Les barres d'erreur représentent la propagation de l'erreur type sur la soustraction $I_f - I_0$ 66

Figure 5.6 Ressources pour l'étude de la voie Notch. (A) Lignée C2C12 avec récepteur Notch1 tronqué, reproduit de [13] dans le cadre de la licence CC BY-NC-ND 4.0. **(B)** Schéma des deux étapes formant le protocole HCR in situ, reproduit de [112] avec permission de *Company of Biologists*.....69

Figure 5.7 Résultats expérimentaux de Nandagopal et al. montrant la dynamique sous-jacente des gènes Hes1 et Hey1 lors de l'activation de la voie Notch à différents temps. Figure reproduite de [13] avec permission dans le cadre de la licence CC BY-NC-ND 4.0. 70

Figure 5.8 Exemple de résultats HCR-FISH tiré du contrôle manuel d'activation Notch. Le contrôle manuel est réalisé sans l'afficheur microfluidique. Les mêmes positions sont imagées dans 2 canaux différents (**Gauche**: Hes1 et **Droite**: Hey1), Barre d'échelle = 50 μ m (même échelle pour les quatre images).72

Figure 5.9 Quantification des gènes Hes1 et Hey1 pour le contrôle d'activation manuel. (A) Niveaux de Hes1 et Hey1 par condition, « n » est le nombre de cellules imagées par groupe,

les mêmes cellules sont imagées pour Hes1 et Hey1. **(B)** Mêmes résultats qu'en A), mais visuellement séparés. **À gauche;** Hes1, * : différence statistique avec le contrôle négatif (Test de Student: $p\text{-value}_{30\text{min}} = 1,54 \times 10^{-15}$, $p\text{-value}_{1\text{h}} = 6,72 \times 10^{-16}$, $p\text{-value}_{4\text{h}} = 0,0005$), \otimes : différence statistique avec les groupes 30 min et 1 h (Test de Student entre groupe 30 min et 4 h: $p\text{-value} = 8,69 \times 10^{-5}$). **À droite;** Hey1, * : différence statistique avec le contrôle négatif (Test de Student : $p\text{-value}_{30\text{min}} = 0,0084$, $p\text{-value}_{1\text{h}} = 5,86 \times 10^{-6}$, $p\text{-value}_{4\text{h}} = 5,51 \times 10^{-24}$), \otimes : différence statistique avec les groupes 30 min et 1 h (Test de Student entre groupe 30 min et 4 h: $p\text{-value} = 3,53 \times 10^{-21}$).....73

Figure 5.10 Quantification de la réponse en fréquence de la voie Notch. (A) Fréquences d'activation utilisées pendant les quatre heures de l'expérience. **(B)** Niveaux de Hes1 et Hey1 pour les fréquences testées. **En haut;** Hes1, * : niveau de Hes1 plus faible en F1 qu'en F2/F3/F4 (Test de Student: $p\text{-value}_{F1-F2} = 0,0343$, $p\text{-value}_{F1-F3} = 0,0244$, $p\text{-value}_{F1-F4} = 0,0026$), **n.s.** : niveaux de Hes1 similaires pour F2/F3/F4 ($p\text{-value}_{F2-F3} = 0,3871$, $p\text{-value}_{F2-F4} = 0,2407$, $p\text{-value}_{F3-F4} = 0,9539$), \otimes : différence statistique avec F2/F3/F4 ($p\text{-value}_{F5-F3} = 0,0031$), \odot : niveau de Hes1 de F6 similaire à F2/F3/F4 et statistiquement différent de F5 ($p\text{-value}_{F5-F6} = 0,0049$). **En bas;** Hey1, **n.s.** : niveaux de Hey1 similaires pour F2/F3/F4 ($p\text{-value}_{F2-F3} = 0,0294$, $p\text{-value}_{F2-F4} = 0,6861$, $p\text{-value}_{F3-F4} = 0,0827$), **n.s.** : niveaux de Hey1 similaires pour F5/F6 ($p\text{-value}_{F5-F6} = 0,5225$) et, * : statistiquement différents des autres ($p\text{-value}_{F6-F1} = 9,94 \times 10^{-12}$, $p\text{-value}_{F6-F2} = 1,57 \times 10^{-7}$, $p\text{-value}_{F6-F3} = 0,0014$, $p\text{-value}_{F6-F4} = 4,17 \times 10^{-6}$), nombre de cellules par condition : F1 = 49, F2 = 46, F3 = 68, F4 = 47, F5 = 59, F6 = 33, Contrôle - = 77.74

Figure 5.11 Analyse du ratio des gènes Hey1 et Hes1 dans chaque cellule selon les conditions de fréquence testées. (A) Ratio des gènes Hey1/Hes1 selon les fréquences d'activation (voir aussi Figure 5.10 A), **n.s.** : pas de différence statistique entre les distributions F5 et F6 (Test de Student : $p\text{-value}_{F5-F6} = 0,9919$) et, * : elles sont statistiquement différentes de F1/F2/F3/F4 (Test de Student, exemple pour F6 : $p\text{-value}_{F6-F1} = 3,46 \times 10^{-2}$, $p\text{-value}_{F6-F2} = 2,08 \times 10^{-3}$, $p\text{-value}_{F6-F3} = 0,0015$, $p\text{-value}_{F6-F4} = 1,99 \times 10^{-3}$), **(B)** Graphique de ratio entre Hes1 et Hey1, la diagonale représente un ratio de 1, chaque point correspond à la lecture des ARNm dans une cellule.76

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Acide mycophénolique
ARNm	Acide ribonucléique messager
α	Ratio du débit aspiration et débit injection
CAO	Conception assistée par ordinateur
CHO	Cellules d'ovaires de hamster chinois; <i>Chinese Hamster Ovary cells</i>
C2C12	Lignée cellulaire de myoblastes de souris
DAPT	N-[2S-(3,5-difluorophenyl)acetyl]-L-alanyl-2-phenyl-1,1-dimethylethyl ester glycine
dHCR	<i>digital</i> HCR, voir HCR
DMD	Matrice de micro-miroirs; <i>Digital Micromirror Device</i>
DMEM	Milieu minimum essentiel de Eagle modifié Dulbecco; <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ECD	Domaine extracellulaire du récepteur Notch; <i>Extracellular Domain</i>
EDTA	Éthylène diamine tétra-acétique
EGF	Facteur de croissance épidermique; <i>Epidermal Growth Factor</i>
ERK	Kinase à regulation extracellulaire; <i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>
FBS	Sérum de veau foetal; <i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
FISH	Hybridation in situ en fluorescence; <i>Fluorescence in Situ Hybridization</i>
FT	Facteur de transcription
G	Hauteur de l'espacement sous l'afficheur; <i>Gap</i>
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HCR	Réaction en chaîne d'hybridation; <i>Hybridization Chain Reaction</i>

HFC	Confinement du flot hydrodynamique; <i>Hydrodynamic Flow Confinement</i>
LED	Diode électroluminescente; <i>Light-Emitting Diode</i>
LMH	Largeur à mi-hauteur; <i>Full width at half maximum (FWHM)</i>
MAP	Protéine kinase activée par mitogène; <i>Mitogen-Activated Protein</i>
MFM	Multipôles microfluidique; <i>Microfluidic Multipole</i>
MFP	Sonde microfluidique; <i>Microfluidic Probe</i>
NF-κB	Facteur nucléaire κB; <i>Nuclear Factor κB</i>
NGF	Facteur de croissance nerveuse; <i>Nerve Growth Factor</i>
NICD	Domaine Notch intracellulaire; <i>Notch Intracellular Domain</i>
PBS	Tampon phosphate salin; <i>Phosphate-buffered saline</i>
PCD	<i>Pixelated Chemical Display</i>
Pe	Nombre de Péclet
Phy-PIF	Facteur d'interaction phytochrome; <i>Phytochrome-Phytochrome Interaction Factor</i>
PI	Iodure de propidium; <i>Propidium Iodide</i>
POI	Protéine d'intérêt; <i>Protein of interest</i>
PS	Phosphatidylsérine
r	Rayon de la fleur, centre aspiration à centre injection
RC	Rapport cyclique; <i>Duty cycle</i>
Re	Nombre de Reynolds
rMFM	<i>rotationally-symmetric</i> MFM, voir MFM
RT-qPCR	Réaction en chaîne par polymérase quantitative; <i>Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
smFISH	<i>single molecule</i> FISH, voir FISH
tMFM	<i>translationally-symmetric</i> MFM, voir MFM
TNF	Facteur de nécrose tumorale; <i>Tumour Necrosis Factor</i>

UAS	Séquence d'activation en amont; <i>Upstream Activation Sequence</i>
UV	Ultraviolet

LISTE DES ANNEXES

Annexe A Suppléments au chapitre 3	95
Annexe B Suppléments au chapitre 4	104

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Contexte

La biologie des systèmes, l'étude des voies de signalisation cellulaire, nous ramène au fondement de la vie et à la compréhension du vivant. Résultat de milliards d'années d'évolution, les voies de signalisation intracellulaires sont très complexes. Elles regroupent un grand nombre de mécanismes permettant de traiter les signaux environnants et d'engendrer une réponse conséquente de la cellule. Du point de vue de l'ingénierie, on peut voir la cellule comme un système qui prend en entrée des signaux de son environnement immédiat et qui sélectionne les programmes géniques adéquats en sortie. Ainsi, la cellule possède en amont un système pour « encoder » l'information extracellulaire en activant précisément certaines voies de signalisation et un système en aval pour « décoder » la signalisation interne et enclencher les modifications phénotypiques et/ou dans l'expression des gènes [1]. Il a été découvert qu'une des façons utilisées par les cellules, eucaryotes et procaryotes, pour encoder les signaux reçus implique la dynamique des molécules de signalisation (facteur de transcription, kinases et autres) [2], [3]. C'est donc dire que les motifs d'activation temporelle de ces molécules influencent la réponse cellulaire. Cela a été observé dans plusieurs contextes. Par exemple, la voie de signalisation Ras-Erk est connue pour utiliser un encodage dynamique afin de différencier les stimulations de EGF (*Epidermal Growth Factor*) et de NGF (*Nerve Growth Factor*) [1], [4], [5]. Un autre exemple classique est le gène suppresseur de tumeur p53, dont la dynamique d'activation permet notamment de distinguer le type de rayonnement que la cellule reçoit, entre gamma et UV, et d'adapter le destin de la cellule en conséquence [6], [7].

La voie de signalisation Notch présente également des propriétés dynamiques [8]–[10]. Celle-ci constitue un cas particulièrement intéressant, car elle est répandue chez tous les animaux multicellulaires et joue un rôle crucial dans le processus de développement et de régulation des tissus vivants [11], [12]. Plus récemment, il a aussi été observé que la voie Notch utilisait un encodage dynamique pour différencier les ligands d'activation : un même récepteur (Notch1) s'active en continu s'il est lié par un certain ligand (Dll1), mais s'active plutôt en pulsation lorsque lié par un autre ligand (Dll4), ce qui engendre l'expression de gènes différents, ainsi que des réponses cellulaires opposées dans les deux cas. [13]. La voie de signalisation Notch a été choisie

comme objet d'étude dans le présent travail, car sa réponse en fréquence complète reste toujours à caractériser précisément et parce qu'il était possible et pertinent de se référer aux précédents travaux de Nandagopal et al. sur la dynamique du système Notch [13].

Dans une perspective biomédicale, il est aussi crucial d'approfondir nos connaissances sur ces voies de communication, puisque le dérèglement de celles-ci est lié à de nombreux problèmes de santé. Cela est notamment observé dans plusieurs cancers [14] et plusieurs maladies métaboliques [15]. En particulier, la dérégulation de la voie Notch est associée à plusieurs maladies et certains cancers comme la leucémie à cellules T [16], [17]. Les voies de signalisation sont en effet depuis longtemps ciblées pour la découverte de nouveaux traitements pharmaceutiques [18], [19]. De surcroît, la considération des phénomènes d'encodage et décodage dynamique au sein des voies de signalisation a le potentiel de mener au développement de nouveaux traitements thérapeutiques [20]–[22]. Il est donc crucial d'étudier la dynamique de signalisation, non seulement pour l'élargissement des connaissances scientifiques fondamentales, mais aussi pour de futures applications en pharmacologie.

L'étude de la dynamique de signalisation implique généralement des systèmes synthétiques permettant le contrôle sur l'activation temporelle d'un composant spécifique de la voie. Plusieurs techniques peuvent être utilisées, du simple pipetage manuel à l'utilisation de circuits microfluidiques, en passant par l'optogénétique. Cependant, les recherches toujours plus poussées requièrent des technologies de plus en plus efficaces : à haut débit d'analyse et avec un contrôle spatio-temporel précis. C'est là qu'entre en ligne de compte la microfluidique ouverte. Traditionnellement, les systèmes microfluidiques sont désignés comme étant « fermé », car les fluides sont contraints dans les canaux d'un circuit. La microfluidique ouverte désigne quant à elle une nouvelle génération de dispositifs où le concept de canal fermé est aboli et les fluides sont contrôlés dans un espace ouvert. Mon groupe de recherche à Polytechnique a récemment développé de tels dispositifs, appelés afficheurs microfluidiques, qui permettent un contrôle spatial et temporel précis de l'écoulement de fluides sur une surface [23], [24]. Les afficheurs microfluidiques présentent plusieurs avantages, comme une compatibilité avec les techniques de stimulation chimique des cellules, la capacité de tester plusieurs conditions simultanément et, par définition de la microfluidique ouverte, un accès plus direct à l'échantillon de cellules. Ainsi, l'hypothèse du présent travail est qu'en substituant la surface d'application des afficheurs

microfluidiques pour une culture cellulaire en plat de Petri, ceux-ci auraient le potentiel de devenir un outil efficace pour l'étude de la dynamique des voies de signalisation cellulaire.

Le présent manuscrit expose les travaux de recherches que j'ai effectués lors de ma maîtrise en génie biomédical (M.Sc.A.) dans le laboratoire de microfluidique pour l'oncologie (μ FO Lab) de Pr. Thomas Gervais (Département de génie physique, Polytechnique Montréal). De plus, j'ai réalisé le volet biologie de mes expériences sous la co-direction de Pr. Laurent Potvin-Trottier (Département de biologie, Université Concordia).

1.2 Objectifs de recherche

L'objectif principal de ce mémoire est de caractériser les performances des afficheurs microfluidiques pour la stimulation dynamique et l'analyse multiplexée de voies de signalisations cellulaires. J'ai divisé l'atteinte de cet objectif en 3 sous-objectifs :

- I. Concevoir un afficheur microfluidique pour le contrôle spatial et temporel de réactifs en culture cellulaire.
- II. Caractériser et valider expérimentalement l'utilisation de l'afficheur microfluidique en culture cellulaire.
- III. Utiliser l'afficheur microfluidique pour mesurer et quantifier la réponse en fréquence de la voie de signalisation Notch au niveau du transcriptome dans des cellules mammifères.

1.3 Organisation du mémoire

Afin de présenter mes résultats, j'ai choisi de rédiger ce mémoire en tenant compte de l'ordre chronologique de mes travaux, dans le but de retracer le fil logique derrière chacun de mes choix et de mettre en lumière les défis auxquels j'ai fait face durant ma maîtrise.

Au chapitre 2, je présenterai avant tout une revue de littérature qui permettra au lecteur de situer le projet autant dans son volet biologique que microfluidique.

Le chapitre 3 sera dédié au premier sous-objectif de ma recherche. J'y détaillerai les choix de design dans la conception d'un afficheur microfluidique pour l'étude de la dynamique de signalisation cellulaire, de même que le processus d'optimisation qui a permis d'adapter la technologie des

afficheurs microfluidiques à cet effet. Le chapitre sera conclu par la validation expérimentale du dispositif conçu.

Au chapitre 4, je présenterai l'atteinte de mon deuxième sous-objectif en relatant le processus de perfectionnement des protocoles expérimentaux pour l'utilisation de l'afficheur microfluidique sur des cellules mammifères en culture. J'exposerai également les résultats de la validation du dispositif, soit en montrant la précision spatiale et temporelle dans l'envoi de réactif aux cellules et le maintien de la viabilité cellulaire suivant l'utilisation de l'afficheur dans une population de cellules.

Le chapitre 5 discutera quant à lui du troisième sous-objectif. Premièrement, j'y rapporterai les résultats d'une expérience visant à vérifier la capacité de l'afficheur à activer une voie de signalisation, la voie Notch en l'occurrence. Deuxièmement, je présenterai les résultats des expériences d'activations fréquentielles de la voie Notch, afin de démontrer comment l'afficheur microfluidique peut être utilisé pour étudier la dynamique d'une voie de signalisation.

Finalement, le chapitre 6 servira de discussion et conclusion. Dans ce chapitre, je conclurai sur l'utilité et le potentiel des afficheurs microfluidiques comme technique de stimulation dynamique pour l'étude des voies de signalisation cellulaires.

1.4 Contributions de l'auteur

La rédaction de ce mémoire est mon œuvre dans son intégralité et à défaut de mention contraire, spécifiquement aux figures incluses dans la revue de littérature et aux figures 5.1, 5.6 et 5.7, toutes les figures sont mes propres conceptions. J'ai développé et réalisé seul toutes les expériences présentées. Mes travaux reposent par ailleurs sur les récentes avancées du laboratoire en microfluidique ouverte. J'ai notamment repris certaines méthodes de conception et d'utilisation des afficheurs développées par Pierre-Alexandre Goyette, ancien étudiant au doctorat et fondateur du côté expérimental des afficheurs microfluidiques. Les fondements théoriques de mon analyse des afficheurs microfluidiques proviennent des travaux doctoraux d'Étienne Boulais. Mon apport intellectuel dans l'évolution de la technologie sera mis en exergue au long des chapitres. Pour le reste, j'ai développé mes propres protocoles expérimentaux et mes propres codes de simulations et d'analyses de résultats (excepté le code d'analyse HCR, voir chapitre 5).

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Dans ce chapitre, je situerai mon projet dans son contexte scientifique. La multidisciplinarité du projet le place à l'intersection des plus récents développements en microfluidique ouverte et des recherches fondamentales de pointe en biologie des systèmes. D'abord, je présenterai le lien entre biologie des systèmes, synthétique et l'étude des voies de signalisation cellulaire. Puis, je décrirai le rôle de la dynamique de ces voies en présentant des exemples concrets. Une sous-section sera par ailleurs réservée à la voie Notch. Je m'attarderai ensuite aux liens entre pharmacologie et dynamique cellulaire pour démontrer l'importance d'étudier cette dernière. Finalement, je survolerai les techniques d'étude de la dynamique de communication cellulaire, en présentant l'optogénétique, la microfluidique classique et enfin la microfluidique ouverte et les afficheurs.

2.1 Biologie des systèmes et biologie synthétique

Depuis son apparition au début des années 2000, la biologie des systèmes s'est imposée comme l'évolution logique de la biologie moléculaire et cellulaire dans la quête de la caractérisation des mécanismes de la vie [25]. C'est grâce aux avancées de l'époque en génomique et en bio-informatique, notamment avec le Projet Génome Humain, que cette branche de la biologie a pu se concrétiser [26]. De façon générale, l'approche systémique s'oppose à l'approche réductionniste qui prédominait alors en génomique et vise plutôt à expliquer les phénomènes moléculaires complexes en tenant compte de l'ensemble des réactions et comportements qui se produisent dans le système. Par exemple, on s'intéressera plutôt aux réseaux régulateurs de l'expression des gènes en entier, plutôt qu'à un ou deux gènes à la fois [3]. L'étude d'un système biologique passe généralement par (A) une perturbation (chimique, biologique ou génétique) de celui-ci, (B) une acquisition de la réponse du système grâce aux informations fournies par les gènes et protéines, puis (C) la création d'un modèle mathématique pour décrire le système [26]. L'étude et la modélisation des voies de signalisation cellulaire et des réseaux de communication chez les cellules sont donc fondamentales à l'approche systémique moléculaire.

Par ailleurs, la biologie synthétique est une science inhérente à la biologie des systèmes [28]. Elle permet de concrétiser les expérimentations et amasser des résultats servant à répondre aux questions et hypothèses posées par la biologie des systèmes. Pour ce faire, des circuits géniques synthétiques sont conçus afin de réaliser des fonctions spécifiques dans le système cellulaire [29].

Dans le cadre de l'étude des voies de signalisation cellulaire, de tels circuits sont utilisés pour perturber et analyser spécifiquement certains réseaux de communication naturels, par exemple en modifiant des protéines de signalisation spécifiques dans le système d'intérêt [30].

2.2 Phénomènes dynamiques dans la signalisation cellulaire

La signalisation cellulaire joue un rôle essentiel et primordial en biologie. Elle comprend de nombreux mécanismes qui permettent aux cellules d'interpréter les informations en provenance de leur environnement et de répondre en conséquence. La cellule peut réagir à des stimuli physiques, par exemple une pression mécanique ou un changement de température, mais aussi surtout à des stimuli chimiques, comme des nutriments en solution ou des petites molécules peptidiques. Pour interagir avec le milieu extracellulaire, la cellule possède des protéines réceptrices transmembranaires qui, lorsque liées par leur ligand spécifique, déclenchent une cascade de signalisation protéique qui mène à la réponse cellulaire, c'est-à-dire une suite de protéines de signalisation qui forment une chaîne d'activation [31]. Ultimement, l'effet peut être dirigé directement à la fonction protéique pour une réponse rapide, par exemple pour contrôler la motilité de la cellule [32], [33]. En revanche, la plupart du temps, la cascade de signalisation impliquera en bout de ligne des facteurs de transcription (FT), soit des protéines qui régulent l'expression des gènes. Un stimulus extracellulaire mène donc à l'expression ou la suppression de gènes spécifiques, ce qui influence directement la synthèse des protéines et décide du destin de la cellule.

Les voies de signalisation ne sont pas des chemins linéaires; elles interagissent entre elles, se recoupent dans leurs fonctions et font aussi preuve de redondance [2], [33]–[35]. En effet, une même molécule de signalisation peut être partagée par différentes voies de signalisation et s'activer en réponse à plusieurs entrées d'informations différentes, mais mener la cellule à des destins bien différents. Tracer des liens de causalité entre les composants d'une voie et leur fonction est donc un défi constant pour les chercheurs.

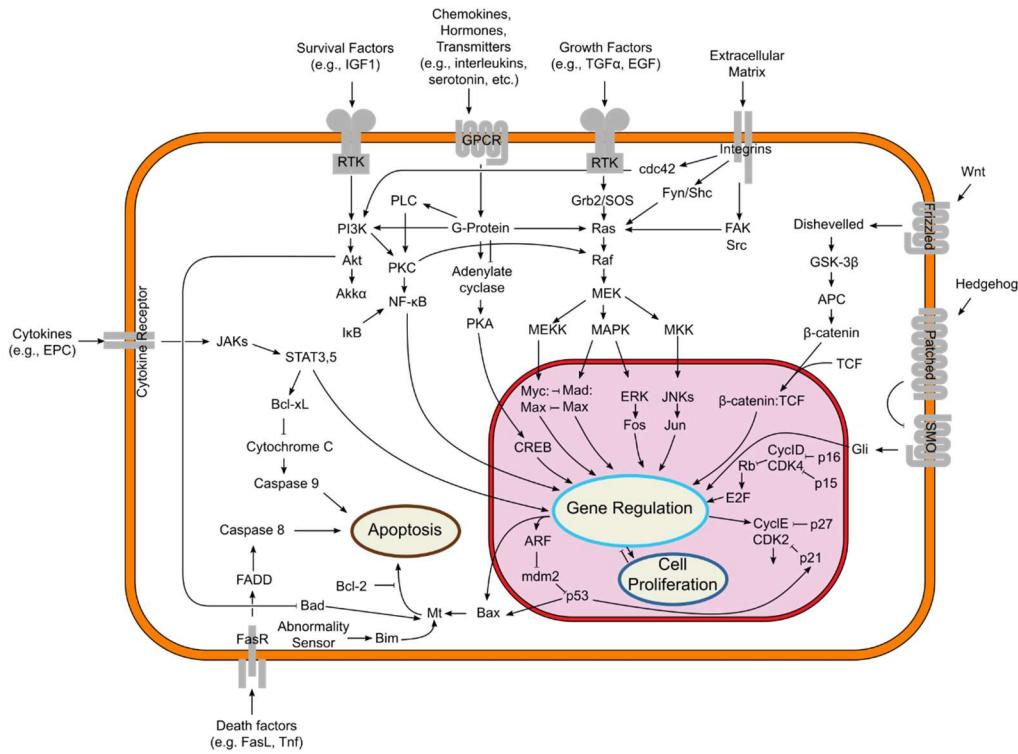


Figure 2.1 Schéma de quelques voies de signalisation clés chez les cellules mammifères.

Reproduite de [36] sous la licence CC BY-SA 3.0.

Par ailleurs, les cellules sont constamment inondées de nouvelles informations, dont beaucoup d'interactions moléculaires stochastiques non pertinentes. Elles ont donc évolué pour discriminer les signaux importants du bruit environnant, ce faisant, développant des techniques d'encodage et de décodage de l'information très efficaces [1]. Il est apparu qu'une des façons trouvées par les cellules pour optimiser la transmission d'informations et la spécificité des interactions entre les molécules signalisatrices dans certaines voies de signalisation cellulaire est l'utilisation d'un encodage dynamique [3], [6]. C'est-à-dire que les cellules peuvent encoder les signaux extracellulaires dans la fréquence de l'activation intra-cellulaire, et ce, plutôt que simplement dans la concentration des protéines de signalisation (amplitude du signal) [1], [2], [37], [38]. Cela a été observé autant chez les bactéries [39], [40], que chez les cellules mammifères [4]–[7], [41]–[43], en passant par les levures [37], [44]–[46]. Chez la bactérie *Bacillus subtilis* par exemple, un signal énergétique constant d'acide mycophénolique (AMP) se traduit par une activation pulsée en fréquence de la protéine de signalisation σ^B , plutôt qu'une activation continue [39]. Qui plus est, comme le démontrent les exemples suivants, la dynamique de signalisation est directement liée à des réponses cellulaires spécifiques.

Regardons d'abord le cas de la protéine p53, un suppresseur de tumeur qui protège la stabilité du génome en régulant l'arrêt de la division cellulaire, l'apoptose et la sénescence en réponse à des stress liés à la perte d'intégrité de l'ADN [47]. La molécule p53 encode dans sa dynamique d'activation le type de rayonnement reçue par la cellule, entre UV et gamma [1]. Sous les rayons gammas, l'activité de p53 oscille en fréquence ce qui mène à l'arrêt de la division cellulaire. Sous l'irradiation UV, c'est plutôt un pulse d'activation de p53 qui est observé, suivi de l'apoptose de la cellule [6], [7].

Un autre exemple classique est la dynamique des protéines ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) dans la voie Ras-ERK, une cascade de signalisation MAP kinase (*Mitogen-Activated Protein Kinases*). Dans les cellules précurseurs de neurone du rat, il a été observé qu'en présence de EGF (*Epidermal Growth Factor*), ERK s'active de façon transitoire et pulsée, ce qui mène à la prolifération de la cellule, tandis que stimulée par NGF (*Nerve Growth Factor*), ERK est activée de façon continue et la cellule entame sa différenciation (voir Figure 2.2) [1], [4], [5].

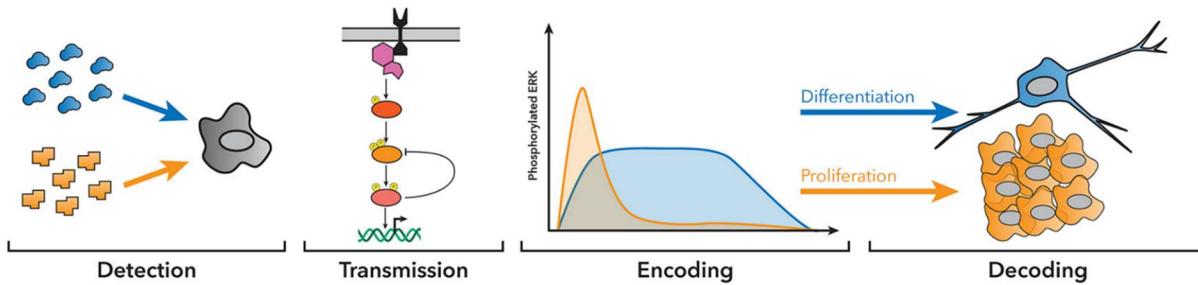


Figure 2.2 Schéma simplifié des propriétés dynamiques de la voie Ras-ERK selon l'activation par NGF (en bleu) ou par EGF (en orange). Les cellules encodent les signaux extracellulaires dans la dynamique d'activation de ERK, cette dynamique est ensuite décodée pour produire des réponses cellulaires spécifiques. Reproduction permise de [1] sous la licence CC BY 4.0.

Mentionnons aussi brièvement le facteur de transcription nucléaire kappa B (« NF-κB » de *Nuclear Factor κB*) qui fait partie des voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire et inflammatoire. Celui-ci a démontré des motifs d'activation oscillatoires lorsque stimulé par le facteur de nécrose tumorale alpha (« TNFα » de *Tumour Necrosis Factor*) [41], [42], et que la dynamique de NF-κB était assez précise pour distinguer plusieurs doses d'activation à TNFα [43].

Finalement, une autre voie très intéressante est la signalisation Notch. Celle-ci sera détaillée dans la prochaine section comme elle est directement liée à mes travaux expérimentaux.

2.3 Voie de signalisation Notch

2.3.1 Fondation moléculaire

La voie Notch permet la communication entre deux, ou plusieurs, cellules par contact direct. Elle est fondamentale dans le développement et la régulation des cellules animales [11], [12]. Pour fins d'exemples rapides, la voie Notch est cruciale pour les fonctions neuronales [8], [48], essentielle pour la prolifération et différentiation des cellules cardiaques pendant le développement [49] et de première importance pour la différenciation et l'activation des cellules T de l'immunité [50]. Contrairement à beaucoup de voies de signalisation cellulaires, la voie Notch apparaît plutôt directe. En effet, il n'y a dans celle-ci aucune protéine de communication intermédiaire entre la membrane et le noyau de la cellule, autrement dit aucune amplification du signal. D'abord, pour que la signalisation Notch soit activée, il faut que le ligand d'une cellule expéditrice de signal se lie au récepteur transmembranaire Notch d'une cellule réceptrice. Chez les mammifères, la voie Notch peut s'activer grâce à 5 différents ligands transmembranaires : Dll1, Dll3, Dll4, Jag1 et Jag2. Du côté des récepteurs, on en compte 4 : Notch1 à Notch4 [12]. Par conséquent, lorsqu'un de ces ligands entre en contact avec un récepteur, cela déclenche le clivage du récepteur. Le récepteur transmembranaire est d'abord clivé par des métalloprotéases, puis au niveau de la membrane cellulaire par la γ -secretase. Ce qui a pour effet de relâcher le domaine intracellulaire (« NICD » de *Notch Intracellular Domain*) dans le cytoplasme. Une fois libéré, le NICD est acheminé au noyau, là où il s'associe à une protéine de liaison à l'ADN, la CSL/RBPJ, pour activer la transcription des gènes d'intérêt (voir Figure 2.3) [12], [51].

La simplicité moléculaire de la voie Notch est d'ailleurs sujet à questionnements chez les chercheurs, car effectivement, comment un si petit nombre de récepteurs et de ligands peut se traduire en de si nombreuses et différentes fonctions et réponses cellulaires ? Sous son apparence élémentaire se cache effectivement une étonnante complexité.

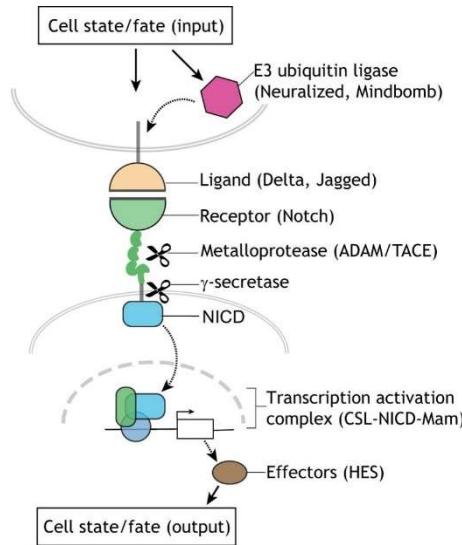


Figure 2.3 Schéma de la voie de signalisation Notch. Quand le ligand lie son récepteur Notch, celui-ci subit une série de modifications (métalloprotéase et γ -secretase) qui mènent au relâchement du NICD dans le cytoplasme. Reproduit de [51] avec la permission de *Company of Biologists*.

2.3.2 Propriétés dynamiques

La voie Notch est connue depuis quelque temps pour ses propriétés oscillatoires [8]–[10]. Cela est observé chez les mammifères dans les cellules progénitrices neurales où certains facteurs de transcriptions sont exprimés par oscillations temporelles [8], [52]. C'est le cas de Hes1, un FT répresseur qui est exprimé à la suite de l'activation de la voie Notch. L'oscillation de Hes1 est alors cruciale pour réguler la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices [9]. Également, pendant le développement embryonnaire des vertébrés, une boucle de rétroaction négative active la voie Notch de façon cyclique afin de réguler ce qui est communément appelé « l'horloge de segmentation » lors de la somitogenèse [10], [53].

Plus récemment, il a été découvert que le récepteur Notch1 implique une dynamique d'activation pour distinguer le ligand qui s'y lie et transmettre l'information adéquate au noyau [13]. Effectivement, les chercheurs ont démontré que la liaison des ligands Dll1 et Dll4 au récepteur Notch1 induisait des dynamiques d'activation bien distinctes. Lorsque lié par Dll4, la voie Notch des cellules réceptrices, exposant le récepteur Notch1, est activée de façon continue et constante dans le temps, tandis que de son côté, l'activation des cellules réceptrices liées par Dll1 prend plutôt la forme d'impulsions discrètes. Par la suite, en analysant l'expression des gènes suivant différentes durées d'activation de la voie Notch, les chercheurs ont trouvé trois gènes particulièrement

sensibles aux différences dans la dynamique d'activation de Notch1, soit Hes1, Hey1 et HeyL. Ils ont constaté que le gène Hes1 était fortement exprimé sous la forme d'une impulsion, autant suite à un court pulse d'activation Notch (5 - 30 min) qu'à une longue activation continue de 6 h. D'un autre côté, l'expression de Hey1 et HeyL suit plutôt la durée de l'activation Notch, menant alors à une accumulation continue des gènes dans la cellule, tant que la voie Notch est activée. Ainsi, le décodage de la dynamique de la voie Notch mène à l'expression de gènes distincts et, conséquemment, à des destins cellulaires distincts. De fait, en étudiant la myogenèse dans le développement des embryons de poussin, il est apparu que l'activation pulsatile de la voie Notch, causée par Dll1, entraîne la différenciation des cellules musculaires, tandis qu'une activation soutenue de la voie Notch, causée par Dll4, inhibe le processus de myogenèse (voir Figure 2.4) [13], [54].

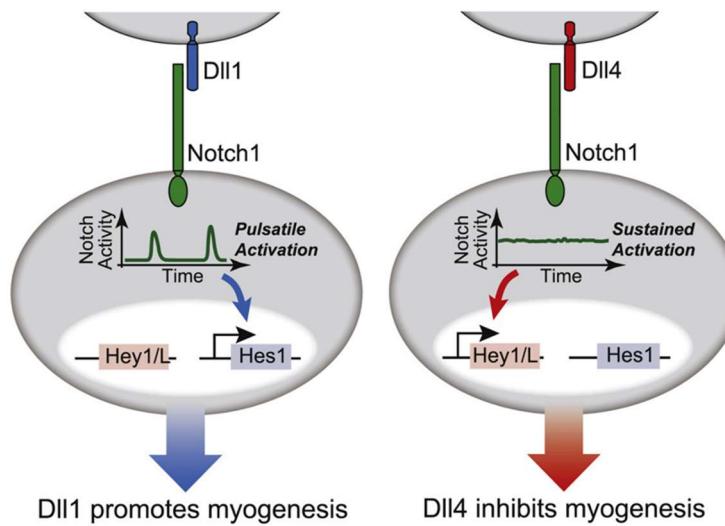


Figure 2.4 Encodage dynamique du récepteur Notch1. Les ligands Dll1 et Dll4 activent l'expression de gènes différents, respectivement Hes1 et Hey1/L, et ce, en passant par le même récepteur Notch grâce à l'encodage dynamique de l'information. Reproduit de [13] avec permission sous licence CC BY-NC-ND 4.0.

Ainsi, ce qui est singulier dans le cas de Notch1 et très démonstratif de l'importance de la dynamique des voies de signalisation cellulaire, c'est qu'un seul et même récepteur encode dans sa dynamique d'activation deux programmes géniques bien distincts et, ultimement, deux destins cellulaires complètement opposés. Plusieurs questions restent toutefois à répondre concernant la dynamique de Notch. Par exemple, quelle est la fréquence de coupure du système qui différencie

le régime Hes1 du régime Hey1 ? Quelle est la fréquence de résonance qui maximise Hes1 ? Ou encore quel est le plus court temps d'activation pouvant être décodé par la cellule ? Comme nous le verrons dans la prochaine sous-section, les réponses à ces questions sont importantes, autant en biologie fondamentale qu'en biomédical.

2.4 Importance de l'étude de la dynamique de signalisation en pharmacologie

Les voies de signalisation sont cruciales pour le maintien des tissus vivants et le bon fonctionnement des organismes. Par conséquent, des dérèglements dans la signalisation interne des cellules sont impliqués dans diverses maladies. Qui plus est, la plupart des voies de signalisation connues pour utiliser un encodage dynamique ont été associées à des maladies inflammatoires et au cancer. C'est le cas des voies présentées précédemment aux sections 2.2 et 2.3.

Revenons d'abord sur la voie Notch, dont la dérégulation a été observée dans de multiples maladies, comme la leucémie à cellules T, le syndrome d'Alagille ou encore une microangiopathie cérébrale nommée syndrome CADASIL [16]. Le rôle de la voie Notch dans le cancer présente une intéressante dualité où il joue un rôle oncogénique dans certaines tumeurs (leucémie à cellules T), mais un rôle suppresseur de tumeur dans d'autres (carcinome épidermoïde) [17]. Il y a ainsi plusieurs efforts en recherche pour cibler la voie Notch à des fins thérapeutiques, dont plusieurs essais cliniques. Deux approches sont généralement utilisées pour cela, soit l'utilisation d'anticorps visant à bloquer un récepteur Notch ou ligand spécifique, soit l'utilisation d'inhibiteurs de γ -secretase afin d'inhiber la production de NICD [16]. Dans les deux cas, on vise simplement à bloquer l'activation de la voie, sans considération de la dynamique.

Regardons ensuite la voie Ras-ERK, largement étudiée dans les recherches de traitement contre le cancer. Effectivement, les mutations au sein de cette voie favorisent les signaux de prolifération des cellules et seraient responsable d'une grande variété de cancers [14]. Plus particulièrement, la dynamique de signalisation chez les cellules cancéreuses est complètement chamboulée : les activations pulsées ne sont plus reconnues. En raison d'un ralentissement anormal de la cinétique interne, elles sont plutôt décodées comme des activations continues et la cellule devient pathologique [55]. L'étude de dynamique de la voie Ras-ERK s'est donc révélée centrale pour de potentiels traitements thérapeutiques [55], [56].

J'ai aussi présenté précédemment la dynamique oscillatoire du facteur NF-κB, un médiateur de l'immunité. Sans surprise, NF-κB démontre une activité irrégulière dans plusieurs maladies inflammatoires, métaboliques et même le cancer [15]. Des recherches ont d'ailleurs souligné l'importance de considérer conjointement la dynamique intrinsèque de NF-κB avec la pharmacocinétique intracellulaire pour l'optimisation de traitements anti-cancers [20].

On constate donc que la dynamique de signalisation serait une cible d'action efficace pour obtenir un effet thérapeutique. Effectivement, là où les médicaments actuels se contentent d'activer ou inhiber complètement un mécanisme de signalisation cellulaire spécifique, il serait optimal selon certains de cibler spécifiquement la dynamique et la synchronisation des voies, propriétés fondamentales de la fonction cellulaire. À long terme, cela permettrait le développement de co-traitements synchronisés afin de maximiser l'effet bénéfique du traitement et limiter les effets secondaires [20], [21]. À titre d'exemple, cela a été bien démontré expérimentalement par le lien entre la dynamique du suppresseur de tumeur p53 et l'inhibition de l'oncogène MDMX dans des cellules cancéreuses. Il a en effet été observé que le retrait effectif de MDMX engendre l'activation de p53 en deux phases : d'abord un important pulse d'activation, suivi de plusieurs oscillations à plus basse amplitude. Le plus intéressant ici est que l'induction de dommages à l'ADN juste après l'inhibition de MDMX, soit pendant la première phase dynamique, a entraîné un effet synergique causant la mort cellulaire. D'un autre côté, combiner les dommages à l'ADN plus tard, soit pendant la deuxième phase dynamique de p53, a plutôt inhibé la mort cellulaire (voir Figure 2.5) [22].

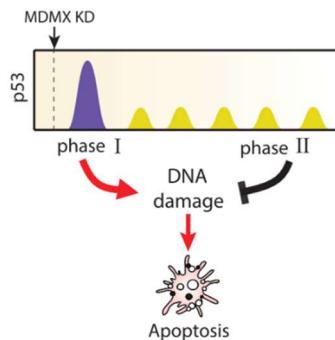


Figure 2.5 Dynamique de p53 liée à l'inhibition de l'oncogène MDMX. Pendant la phase I, l'induction de dommages à l'ADN (radiation UV) a un effet synergique qui augmente la mort cellulaire, tandis que l'induction de dommages à l'ADN pendant la phase II inhibe la mort cellulaire. Reproduit de [22] avec la permission de AAAS.

2.5 Techniques pour étudier l'encodage dynamique dans la signalisation cellulaire

Tel que présenté dans les sections précédentes, le phénomène d'encodage dynamique est omniprésent en biologie cellulaire et sa compréhension est de première importance. Plusieurs études ont bien caractérisé l'encodage dynamique des cellules dans différents contextes, comme pour p53 en réponse au stress cellulaire [6], la voie Ras-ERK sous EGF ou NGF [4] ou le facteur NF- κ B et TNF [43]. En effet, pour étudier l'encodage dynamique, il suffit d'observer et quantifier la dynamique des molécules de signalisation à différents stimuli (par ex. la dynamique de ERK suivant une stimulation par EGF ou NGF). Cependant, l'étude du décodage reste toujours un défi pour les chercheurs. Dans le cas du décodage, on s'intéresse au côté fonctionnel du problème et on regarde comment la cellule interprète différents motifs d'activation dynamique. Pour y arriver, il s'agit de perturber dynamiquement la voie de signalisation à certains endroits précis et d'observer la réponse cellulaire, soit au niveau phénotypique ou au niveau de l'expression des gènes [57]. Il est toutefois ardu d'établir des liens de causalité forts entre la dynamique et la réponse d'une cellule. De plus, comme les cellules ne sont pas nécessairement synchronisées entre elles, l'étude d'une population de cellules n'est pas un bon indicateur du comportement des cellules individuelles. C'est pourquoi les chercheurs sont toujours à la recherche de méthodes efficaces, à haut débit de rendement pour stimuler précisément les voies de signalisation et permettant d'analyser chaque cellule individuellement [1].

Comme les systèmes cellulaires répondent naturellement à plusieurs types de stimuli (par ex. molécule effectrice, température, pH, radiations électromagnétiques), il existe plusieurs moyens possibles permettant la stimulation spécifique de voies de signalisation cellulaire. La plupart du temps, cela passe par la conception d'un système synthétique donnant plein contrôle à l'utilisateur sur la dynamique d'activation. De surcroît, les outils de stimulation et d'étude de la dynamique cellulaire doivent permettre une grande précision spatiale et temporelle.

On dénote deux grandes familles de systèmes d'activation, soit les systèmes à stimulation chimique et ceux à stimulation optique. Les systèmes à stimulation chimique utilisent des médiateurs d'activation pour contrôler les protéines de signalisation et impliquent la manipulation de fluides pour changer l'environnement de la culture cellulaire; du simple pipetage aux systèmes microfluidiques complexes. De l'autre côté, les systèmes optiques se servent de protéines

photosensibles et de signaux de lumière pour contrôler les fonctions moléculaires; c'est le domaine de l'optogénétique.

Dans les prochaines sous-sections, je décrirai les solutions proposées jusqu'à présent pour ce genre d'étude, soit en optogénétique (sous-section 2.5.1) ou en microfluidique classique par stimulation chimique (sous-section 2.5.2).

2.5.1 Optogénétique

L'utilisation de protéines photosensibles pour l'étude de cellules mammifères a débuté avec la découverte des protéines de la famille des opsines au début des années 2000 [58]. Les opsines sont des protéines transmembranaires que l'on retrouve naturellement chez plusieurs organismes des microbes aux mammifères. Historiquement, elles ont été largement utilisées comme interrupteur moléculaire en neuroscience pour contrôler l'activation de neurones sous l'effet de la lumière bleue [58]. Aujourd'hui, l'optogénétique ne se restreint plus qu'à la neuroscience et est largement utilisée en biologie synthétique. On s'en sert effectivement pour 1) la régulation directe de l'expression de gènes, 2) le contrôle de fonctions protéiques ou 3) le contrôle de la compartmentalisation intracellulaire [59]. Souvent, des protéines photo-activables non-opsines sont employées, encore une fois sous forme d'interrupteur moléculaire. Contrairement aux opsines, ces autres protéines ne sont pas nécessairement transmembranaires. Elles peuvent donc être utilisées à plusieurs effets et agir directement dans le cytoplasme ou dans le noyau cellulaire. Une fois excitée, la protéine photosensible subit un changement de conformation et peut alors réagir selon plusieurs mécanismes d'activation, notamment par l'association/dissociation avec une autre protéine (formant homodimères, hétérodimères ou autres oligomères), par la révélation/camouflage d'un domaine d'activation ou par activation directe d'une enzyme [59], [60]. De plus, un important avantage de cette méthode optique est sa grande réversibilité. Par exemple, le système Phy-PIF (*Phytochrome-Phytochrome Interaction Factor*) permet l'association de deux protéines avec la lumière rouge et la dissociation des mêmes protéines par l'illumination infra-rouge, et ce, avec des temps caractéristiques d'association/dissociation très rapides d'à peine quelques secondes [61]. Le système Phy-PIF n'est qu'une méthode parmi un large répertoire d'outils moléculaires en optogénétique pouvant être utilisé selon les besoins des chercheurs (voir Figure 2.6).

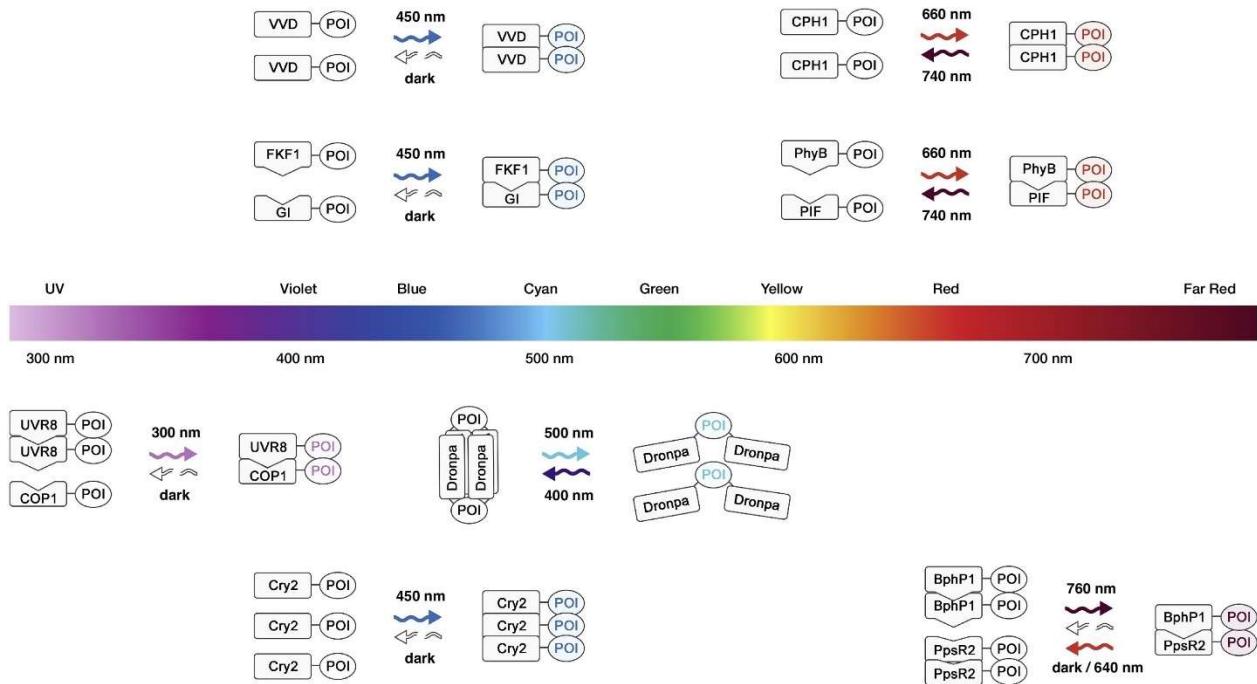


Figure 2.6 Exemples de systèmes optogénétiques permettant l’association et la dissociation de complexes protéiques d’intérêt (« POI » de *Protein of Interest*) à différentes longueurs d’onde. Reproduit de [59] avec la permission de Elsevier.

Par définition, l’optogénétique présente une très haute résolution spatiale et temporelle, comme la technologie repose sur le contrôle de la lumière. Par exemple, des systèmes d’activation en parallèle ont été développés en utilisant des matrices de micro-miroirs (« DMD » de *Digital Micromirror Device*) ou des matrices de micro-LED (diode électroluminescente ou *Light-Emitting Diode*) [62]. C’est le cas d’une matrice de micro-LED 64 x 64, dont l’intensité et la fréquence en chaque point (20 μm diamètre) sont contrôlées individuellement avec une résolution de l’ordre de la nanoseconde, et qui a été appliquée sur des cellules neuronales en culture pour démontrer les capacités du système à déclencher des réponses électrophysiologiques très précisément [63].

Ainsi, l’optogénétique s’est révélé être un outil très puissant dans l’étude de la dynamique cellulaire [1], [64], [65]. Notamment, le système optogénétique Phy-PIF a été utilisé pour activer en amont la voie Ras-ERK avec différentes fréquences et des pulses allant de 1 min à plusieurs heures. Cela a permis aux chercheurs de caractériser précisément la réponse fréquentielle du système ERK et démontrer que la voie agit comme un filtre passe-bas (voir Figure 2.7) [66]. C’est aussi grâce à cette méthode que les perturbations dynamiques ERK, présentées en 2.4, ont été révélées chez les

cellules cancéreuses humaines [55]. Récemment, la voie Notch a également été étudiée par optogénétique. Cette fois-ci dans des embryons de drosophile exprimant des récepteurs Notch synthétiques modifiés pour inhiber l'activation sous la lumière bleue. En testant différents temps de photo-activation, l'étude a pu démontrer les liens entre la dynamique de Notch et le comportement des cellules uniques dans la différenciation tissulaire [67].

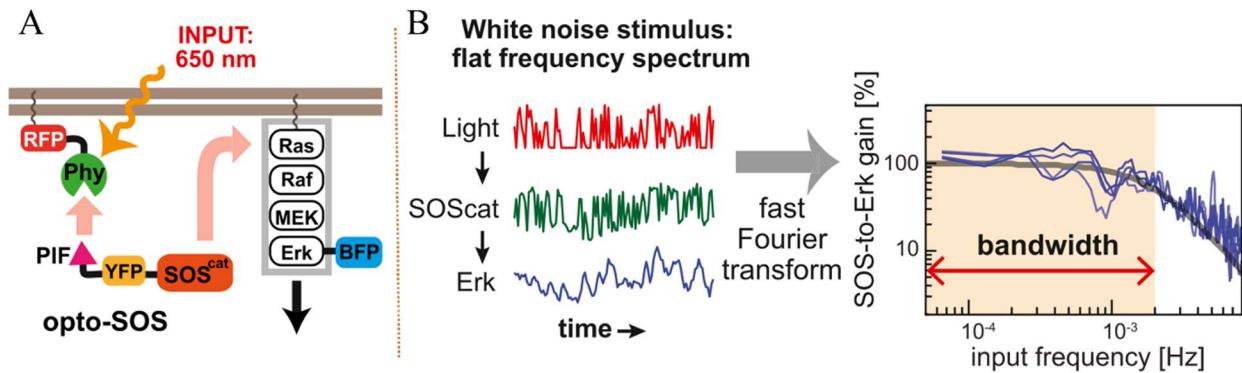


Figure 2.7 Optogénétique appliquée à l'étude de la voie Ras-ERK. (A) Schéma de l'activation de la voie (Ras) par le recrutement de la protéine catalyseur (SOS) à la membrane cellulaire sous un signal lumineux. **(B)** Utilisation du système pour retrouver la réponse fréquentielle complète de cellules, il s'agit dans ce cas d'un filtre passe-bas de second ordre. Figures reproduites de [66] avec la permission de Elsevier.

2.5.2 Microfluidique classique

Le domaine de la microfluidique englobe toute science ou technologie qui permet de manipuler de très petits volumes de fluides, soit de l'ordre du nanolitre, et ce, dans des micro-canaux allant jusqu'à quelques centaines de micromètres [68]. À cette échelle, les forces de surface dominent, les temps de réaction sont accélérés et des économies de réactifs sont possibles. Par affinité, l'avènement de cette science a mené à de nombreuses applications en sciences de la vie. Par exemple pour le criblage à haut-débit en pharmacologie [69], pour des tests immunologiques s'inscrivant dans le mouvement de diagnostic « au chevet du patient » (*Point-of-Care diagnostics*) [70] ou encore en recherche fondamentale en biologie du développement [71]. Habituellement réalisées de façon manuelle à la pipette ou automatique à l'aide de robots pipeteurs, les circuits microfluidiques ont permis de simplifier de nombreuses manipulations en laboratoire et

d'automatiser des protocoles expérimentaux jusqu'alors difficilement réalisables, notamment avec l'arrivée des circuits capillaires [72].

En ce qui concerne l'étude des voies de signalisation cellulaire, de simples circuits microfluidiques à une pompe ont longtemps été utilisés pour contrôler la livraison de molécules aux cellules [1]. Le contrôle temporel précis des débits, que permet la microfluidique, a par la suite été exploité dans plusieurs recherches sur la dynamique cellulaire, autant pour étudier l'encodage que le décodage dynamique. À cet effet, des cellules sont généralement cultivées dans des puces microfluidiques à complexité variable : des valves aux entrées servent à changer rapidement l'environnement cellulaire pour l'envoi de signaux pulsatoires et le tout est placé sur un microscope pour imager les cellules en temps réel. Dans sa forme élémentaire, un dispositif du genre à un seul canal et une valve a servi à explorer la réponse en fréquence de plusieurs voies chez la levure, et ce, avec une impressionnante précision temporelle atteignant 2 pulses distincts par seconde (voir Figure 2.8 A) [44], [73]. Toutefois, pour ce genre d'étude, il est avantageux de pouvoir tester plusieurs conditions, c'est-à-dire plusieurs fréquences d'activation, simultanément. Ainsi, une puce à 2 chambres de détection indépendantes a été utilisée pour étudier la synchronicité du signal oscillatoire Notch dans des tissus embryonnaires [53], un dispositif à cinq canaux différents et cinq valves a permis le contrôle de la dynamique du FT Msn2 chez la levure (voir Figure 2.8 B) [74] et un autre module à quatre chambres de détection distinctes a été utilisé et placé en parallèle afin de tester 16 conditions dynamiques à la fois pour étudier l'activation ERK [5]. De plus, un système microfluidique à 96 micro-chambres de culture indépendantes a été conçu [75] et testé notamment pour l'étude de la dynamique de NF-κB [76]. Récemment, ce genre de puce multiplexée a été amené à un niveau supérieur par Zhang et al., qui ont présenté un dispositif à 1500 chambres de culture programmables et indépendantes pour étudier la dynamique cellulaire (voir Figure 2.8 C) [77]. Celui-ci permet de suivre environ 30 000 cellules individuelles pendant 1 semaine tout en contrôlant précisément la dynamique de livraison de réactifs et nutriments aux cellules. Cette dernière étude est un exemple frappant du potentiel de la microfluidique classique.

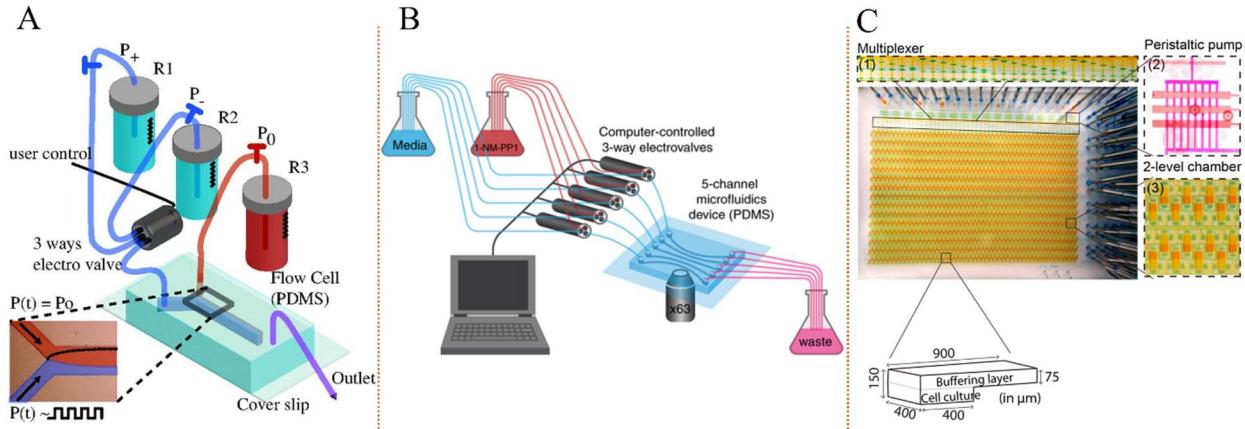


Figure 2.8 Quelques exemples de dispositifs en microfluidique classique pour l'étude de la dynamique des voies de signalisation cellulaire. (A) Système à une valve et un canal utilisé pour étudier la bande passante de la voie hyperosmolaire chez la levure *S. Cerevisiae*, reproduit légalement de [73], Copyright 2008 National Academy of Sciences. **(B)** Système à cinq valves et cinq canaux utilisé pour étudier la dynamique du FT Msn2 chez la levure, reproduit de [74] dans le cadre d'une licence CC BY-NC-SA. **(C)** Circuit microfluidique comprenant 1500 chambres de culture programmables indépendantes, reproduit de [77] dans le cadre d'une licence CC BY-NC.

2.6 Microfluidique ouverte

2.6.1 Le changement de paradigme

La microfluidique traditionnelle est qualifiée de « fermée » puisque le fluide est contraint entre les parois des canaux du circuit, par exemple dans un canal à section rectangulaire. Malgré tous ces avantages, la microfluidique classique comporte toutefois un important défi pour l'étude d'échantillons biologiques : ceux-ci doivent être insérés à l'intérieur du dispositif à canaux et cela tend à complexifier les systèmes de façon importante [78]. Comme l'étude de la biologie des cellules ex-vivo est très avantageuse et riche en informations, plusieurs équipes de recherche ont choisi de contourner ce problème en « ouvrant » leur système [79]. Soit simplement en retirant la paroi supérieure des canaux pour y accéder à l'aide d'une pipette [80], ou carrément en abolissant le concept de canal et en acheminant le dispositif microfluidique à l'échantillon, plutôt que l'inverse. Parmi les technologies pionnières de la microfluidique ouverte, on a d'abord une nanopipette basée sur le principe de microscopie à conductance ionique qui permet la livraison de molécules à l'échelle d'une cellule unique (100 - 150 nm) [81]. Toujours en microfluidique à très

petite échelle, il y a eu la technologie FluidFM. Celle-ci utilise le principe de positionnement d'un microscope à force atomique en intégrant à l'extrémité amovible un canal permettant une livraison locale de fluide (une cellule à la fois) [82]. Dans le même genre de technologie de scan de surface, un système à deux phases a été développé afin de faciliter la livraison de réactif sur une surface de cellules mammifères en culture (voir Figure 2.9 A). L'idée est d'introduire une phase, le réactif voulu, dans l'autre phase, le média cellulaire déjà présent, afin d'empêcher le mélange et confiner le réactif à la zone d'application voulue [83]. Un autre concept intéressant qui a été développé est la « chemistrode » (voir Figure 2.9 B). Il s'agit d'une sonde microfluidique multiphasé qui permet d'interroger une surface (par exemple une cellule ou un tissu biologique) à l'aide d'une série de gouttelettes aqueuses. Les gouttelettes recueillent l'information chimique de la surface et sont aspirées par un deuxième canal pour se faire analyser [84].

Parmi toutes les avancées en microfluidique ouverte, une technologie est sortie du lot en raison de son potentiel et sa simplicité d'approche. Il s'agit de la sonde microfluidique (abrégée « MFP » de l'anglais *Microfluidic Probe*) (voir Figure 2.9 C). Celle-ci se place parallèlement à une surface en immersion dans un média environnant (p. ex. de l'eau), tout en conservant une distance (nommée « *G* » pour *gap*) entre la tête de la sonde et la surface à traiter. La sonde microfluidique est amovible et a aussi été conçue comme outil de scan de surface. Sur la tête de la sonde débouchent deux micro-canaux proches l'un de l'autre, dont un sera utilisé pour injecter un réactif et l'autre pour aspirer. Si le débit d'aspiration est suffisamment supérieur au débit d'injection, le liquide injecté est alors confiné à une zone bien précise sur la surface. On définit d'ailleurs le paramètre α comme le ratio des débits d'aspiration et d'injection ($\alpha = q_{asp}/q_{inj}$). Une valeur de α suffisamment supérieure à 1 permet donc ce que l'on désigne; un confinement hydrodynamique (« *HFC* » pour *Hydrodynamic Flow Confinement*) [85]. Plus précisément, le fonctionnement de la sonde microfluidique s'explique par la célèbre approximation des écoulements en cellule de Hele-Shaw. Dans le cas particulier d'un écoulement entre deux plaques parallèles séparées par une infime hauteur ($G \rightarrow 0$), on considère un écoulement de Stokes (faible nombre de Reynolds : $Re < 1$) qui peut être caractérisé entièrement par une analyse quasi-2D [86].

Le concept de la MFP a par la suite été amélioré [87] et décliné en plusieurs variations. C'est le cas d'une pipette multi-fonctions qui se sert du confinement hydrodynamique pour la manipulation et livraison de réactif à des cellules mammifères [88] et aussi d'une sonde qui crée un confinement thermique en chauffant localement le fluide d'injection [89].

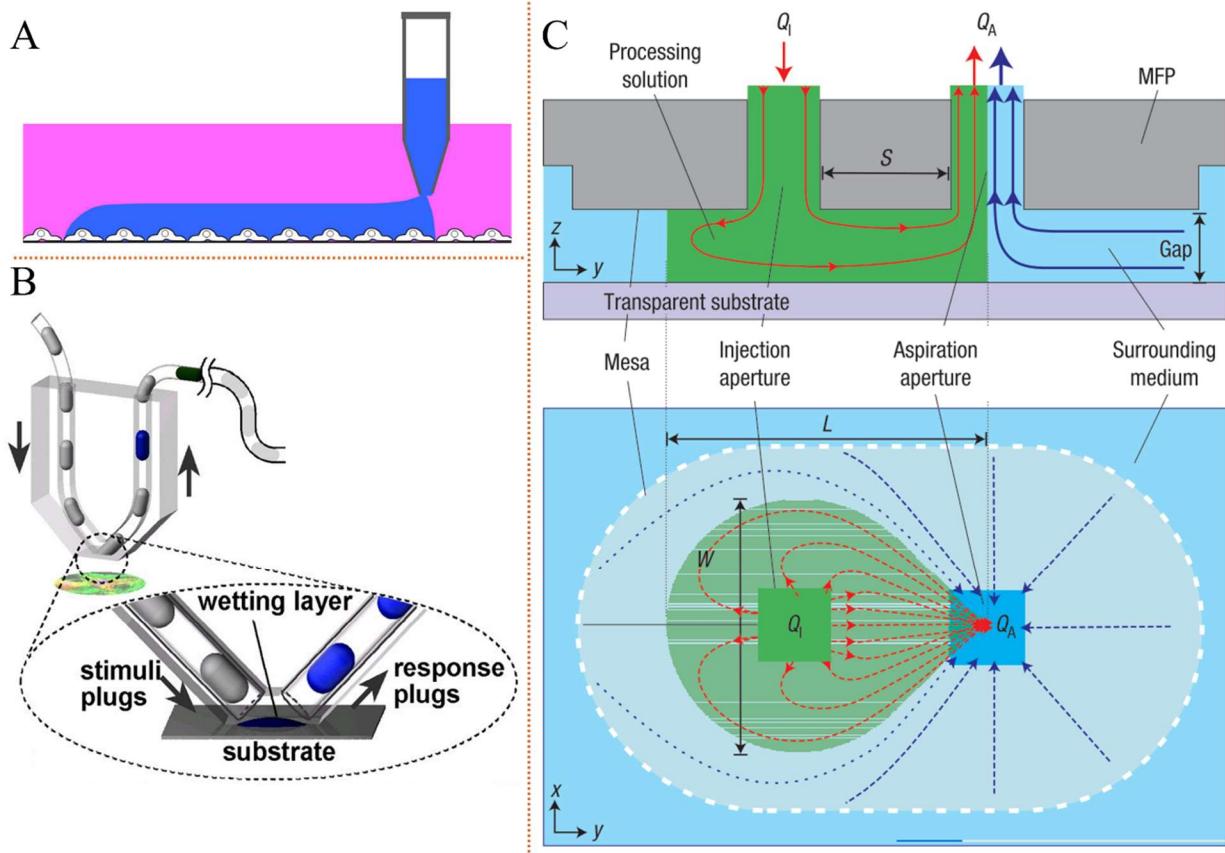


Figure 2.9 Exemples de technologies pionnières en microfluidique ouverte. (A) Système de livraison de réactif à deux phases, reproduit de [83] avec la permission de Springer Nature. **(B)** La « chemistroke », reproduit de [84] conformément aux conditions de PNAS, Copyright 2008 National Academy of Sciences. **(C)** Schéma de fonctionnement de la MFP, reproduit de [85] avec la permission de Springer Nature.

La sonde microfluidique trouve plusieurs applications en science de la vie [90]. En plus des cas mentionnés plus haut, qui ont tous une portée en biologie, des chercheurs se sont servis de la sonde microfluidique pour perfuser des tranches de tissu cérébral [91] et pour faire de l'immunohistochimie [92]. À ma connaissance toutefois, aucun dispositif de microfluidique ouverte n'a été utilisé pour étudier la dynamique des voies de signalisation cellulaire à ce jour.

2.6.2 Du dipôle aux multipôles microfluidiques

Tandis que des chercheurs s'affairaient à expérimenter la MFP sous toutes ses formes, certains se sont penchés sur une caractérisation analytique, numérique et une modélisation mathématique précise des phénomènes d'écoulements et de transport ayant lieu dans la sonde microfluidique [93], [94]. Il s'avère qu'il existe une analogie quasi-parfaite entre l'étude de ces écoulements Hele-Shaw en 2D et la physique électromagnétique, supportée autant par la théorie que par l'expérimental [86], [95]. Sous cet angle d'analyse, les canaux d'injection et d'aspiration de la MFP sont des pôles et forment ensemble un dipôle microfluidique. Ainsi, le champ des vitesses du fluide se décrit de la même façon qu'un champ électrostatique : les lignes du champ correspondent aux lignes de courant du fluide. Cette caractérisation a lancé le début de la microfluidique multipolaire. D'abord, le quadrupôle microfluidique a été conçu et caractérisé (voir Figure 2.10) [95]. On a aussi vu l'apparition du confinement hydrostatique hiérarchique, c'est-à-dire un dipôle fluidique confiné au sein d'un autre dipôle (notamment dans le but de changer de réactif d'injection plus rapidement) [96]. Plus récemment, un dipôle et quadrupôle ont été conçus avec électrodes intégrées afin d'electro-perméabiliser une membrane cellulaire et transfecter une cellule précise dans une culture [97].

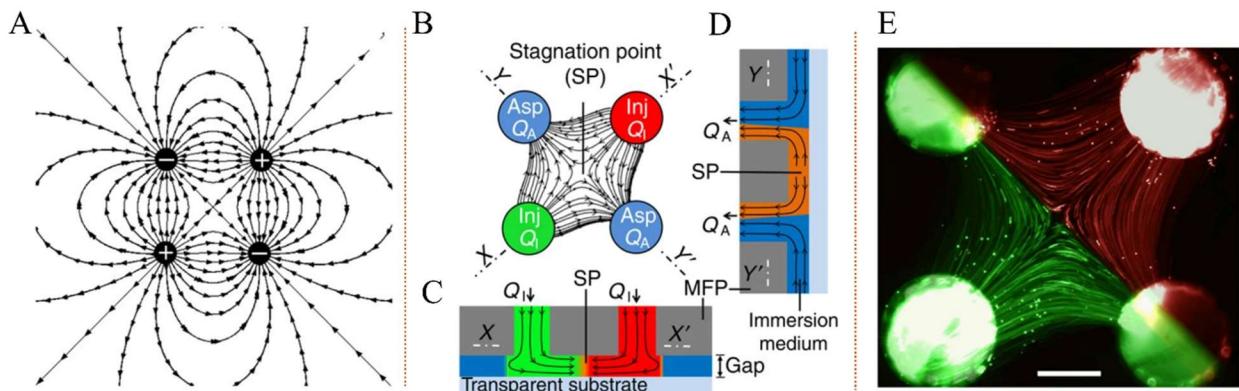


Figure 2.10 Quadrupôle microfluidique basé sur la théorie multipolaire. (A) Lignes de champ d'un quadrupôle électrostatique 2D. (B), (C) et (D) Schéma multi-vue d'un quadrupôle microfluidique. (E) Démonstration du déplacement dans le quadrupôle microfluidique avec des billes fluorescentes en solution. Figures reproduites de [95] avec la permission de Springer Nature.

Cependant, la théorie derrière les multipôles microfluidiques (« MFM » de l'anglais *Microfluidic Multipole*) s'est véritablement concrétisée avec les travaux de mon équipe de recherche à

Polytechnique, soit le laboratoire de Pr. Thomas Gervais. Les étudiants qui m'ont précédé se sont appliqués à formaliser l'expression analytique du profil d'advection-diffusion 2D dans les sondes microfluidiques, en commençant par le cas le plus simple du dipôle microfluidique [23], [98]. Ils ont ensuite généralisé leur modèle à plus de deux ouvertures (pôles) afin de concevoir et expérimenter des MFM de toutes configurations (voir Figure 2.11) [23]. Ceux-ci sont classés en deux catégories : les rMFM (*rotationally-symmetric MFM*) et les tMFM (*translationally-symmetric MFM*). Les rMFM sont aussi désignés comme des afficheurs de configuration « fleur » en raison des formes de pétales qui sont formées par les injections (voir Figure 2.11 B). Dans ce cas, les ouvertures d'injections sont situées le long de la circonference de la fleur et l'ouverture centrale est un drain d'aspiration partagé. La théorie développée pour le passage du dipôle microfluidique à la configuration fleur sera abordée plus en détail au chapitre 3, comme elle est de première importance pour la suite de mon projet. Les tMFM sont quant à eux constitués d'un quadrillage d'ouvertures permettant de varier les motifs d'écoulement (voir Figure 2.11 C). Ces sondes microfluidiques multipolaires sont fabriquées par impression 3D de type stéréolithographie (voir Figure 2.11 D) [99]. Les processus de fabrication seront aussi détaillés au chapitre 3.

Augmenter le nombre de canaux à la tête de la sonde microfluidique présente plusieurs avantages. D'abord, cela permet d'éviter d'avoir à scanner la surface d'intérêt. En effet, plusieurs cinétiques de réactions en biologie sont très lentes, ce qui réduit considérablement la capacité de la MFP à traiter une grande surface. Avec les MFM à plusieurs canaux, la sonde reste immobile et on peut tester plusieurs conditions simultanément. Par ailleurs, cette idée avait déjà été testée, simplement en positionnant plusieurs dipôles en parallèle sous une même sonde pour étudier un tissu par immunohistochimie [100]. Mentionnons aussi qu'outre la possibilité de tester de multiples conditions à la fois, certains chercheurs ont plutôt trouvé une utilité de mélange aux MFM; une aspiration partagée entre l'injection de deux réactants différents, forçant alors une réaction chimique locale [101]. L'idéal d'utilisation des MFM reste toutefois de pouvoir tester un grand nombre de conditions en une expérience afin de réduire la quantité de manipulation de fluide en recherche. Un des résultats importants de l'équipe a été la découverte des multipôles polygonaux, où en circonscrivant une ouverture d'injection au centre de trois ouvertures d'aspiration ou plus, on confine alors le fluide d'injection dans le polygone formé en reliant les aspirations. En répétant cette unité de confinement plusieurs fois, l'afficheur microfluidique pixelisé a été créé (« PCD » de l'anglais *Pixelated Chemical Display*, clin d'œil aux écrans LCD). Ainsi, un PCD de 144 pixels

a été conçu et testé, promettant de faciliter et d'accélérer considérablement la recherche nécessitant le traitement de surface biologique (voir Figure 2.11 E) [24]. Pour poursuivre l'analogie des écrans, on désignera tout type de MFM comme un afficheur microfluidique.

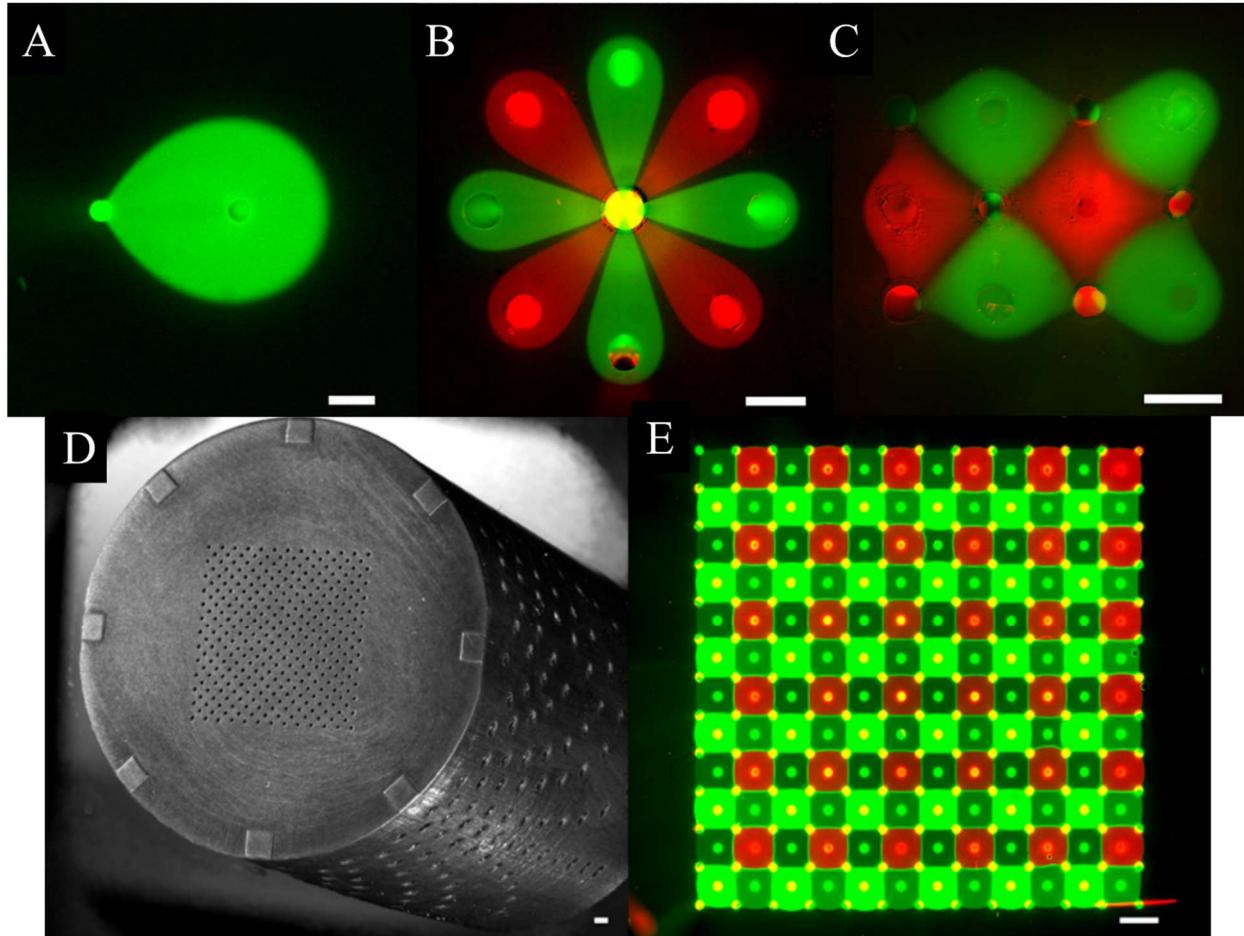


Figure 2.11 Du dipôle microfluidique aux PCDs. Visualisation expérimentale de l'écoulement en fluorescence pour différents types d'afficheurs microfluidiques, solution éthylique de fluorescéine en vert et de rhodamine en rouge. **(A)** Dipôle microfluidique. **(B)** rMFM en configuration fleur. **(C)** tMFM à 12 canaux. **(D)** PCD à 144 pixels fabriqué par impression 3D et **(E)** visualisation du PCD en opération avec 4 groupes de pixels, les ouvertures au centre des pixels sont les injections et les coins des pixels les aspirations. **(A)-(C)** Barre d'échelle 500 μm , reproduites de [23] dans le cadre de la licence CC BY 4.0, **(D)-(E)** Barre d'échelle 1 mm, reproduites de [24] en accord avec la licence PNAS.

CHAPITRE 3 CONCEPTION D'UN AFFICHEUR MICROFLUIDIQUE ADAPTÉ À LA CULTURE CELLULAIRE

Dans ce chapitre, je présenterai en détails mon processus de design et de fabrication d'un afficheur microfluidique destiné à l'étude de la dynamique des voies de signalisation cellulaire. Pour cela, j'élaborerai d'abord plus spécifiquement sur comment la technologie a été développée au sein de mon laboratoire. Je décrirai la théorie sous-jacente, de même que les processus de fabrication et d'opération du dispositif qui sont utilisés. Je présenterai ensuite mes choix de design, jusqu'à l'optimisation et la conception de l'afficheur microfluidique qui sera utilisé pour les expériences prévues en biologie cellulaire.

3.1 Prise en main de la technologie

Les afficheurs microfluidiques forment une technologie très récente dans le laboratoire de Pr. Thomas Gervais. Les analyses théoriques multipolaires qui ont mené à leur développement, ainsi que la description expérimentale de la technologie ont fait l'objet d'une publication détaillée dans la revue *Nature Communications* en 2019 [23]. Mon projet de maîtrise repose donc sur une base de compétences dans mon groupe de recherche et constitue, en quelque sorte, une branche parallèle au développement brut des afficheurs, dans le but de trouver une niche d'application à cette technologie en biologie des systèmes. La première étape de mes travaux a été de m'approprier la technologie développée dans le laboratoire, c'est-à-dire les techniques de design, de fabrication et d'utilisation des afficheurs.

3.1.1 Fabrication et utilisation des afficheurs microfluidiques

La fabrication des afficheurs microfluidiques développés par mon laboratoire repose sur l'impression 3D par stéréolithographie. Comme il s'agit d'une jeune technologie toujours en développement, on favorise de la sorte un prototypage rapide, sans toutefois sacrifier sur la performance [99]. Les afficheurs sont donc entièrement modélisés par CAO (conception assistée par ordinateur), à l'aide du logiciel CATIA en l'occurrence, et imprimés par stéréolithographie (Asiga Pico 2 HD, résolution de 27µm, avec résine Pro3dure GR-1). Par la suite, après avoir assidûment nettoyé tous les canaux pour éviter les blocages, des tubes (Tygon OD 0,06'') sont assemblés au dispositif avec de la colle UV. Le processus de fabrication est décrit plus en détail par Brimmo et al. [99]. Une fois le dispositif assemblé, on peut facilement le tester en visualisant

l'écoulement sous l'afficheur en microscopie de fluorescence par injection d'une solution de fluorophore. On utilise généralement une solution d'éthanol 70 %, à 1 mg/mL fluorescéine par exemple. L'afficheur est simplement déposé sur une surface plane dans du liquide environnant et tient en place par son propre poids. La hauteur G est créée grâce à des piliers positionnés le long de la circonférence de l'afficheur (voir Figure 2.11 D). Les débits d'injections et d'aspirations sont contrôlés par un programme conçu sur LabVIEW pour interfaçer les pompes-seringues NEMESYS (Cetoni GmbH, Korbussen, Allemagne). Le cœur du programme ayant préalablement été développé, j'ai pu ajouter mes propres fonctions à l'intérieur pour les besoins de mes expériences.

3.1.2 Premiers essais

Suivant ces procédés de fabrication et d'utilisation, j'ai ainsi conçu mon premier afficheur microfluidique, un PCD 6x6 avec pixels de 1 mm^2 (voir Figure 3.1). Il s'agissait d'un premier pas symbolique pour cette technologie dans le laboratoire comme c'était la première fois qu'un tel dispositif était fabriqué et manipulé autrement que par son inventeur. Notons que dans le cas du PCD, les pixels ne sont pas nécessairement indépendants. Ils sont plutôt regroupés par condition d'injection grâce à un collecteur (aussi imprimé 3D) et reliés à la même pompe-seringue. Par exemple, le PCD à la figure 3.1 B, n'a que deux groupes d'injection (en rouge et vert), malgré ses 36 pixels. Aussi, le débit est le même pour toutes les ouvertures ($q_{\text{inj}} = q_{\text{asp}}$) et comme les ouvertures d'injection centrales sont entourées d'aspirations, le fluide reste confiné dans les pixels.

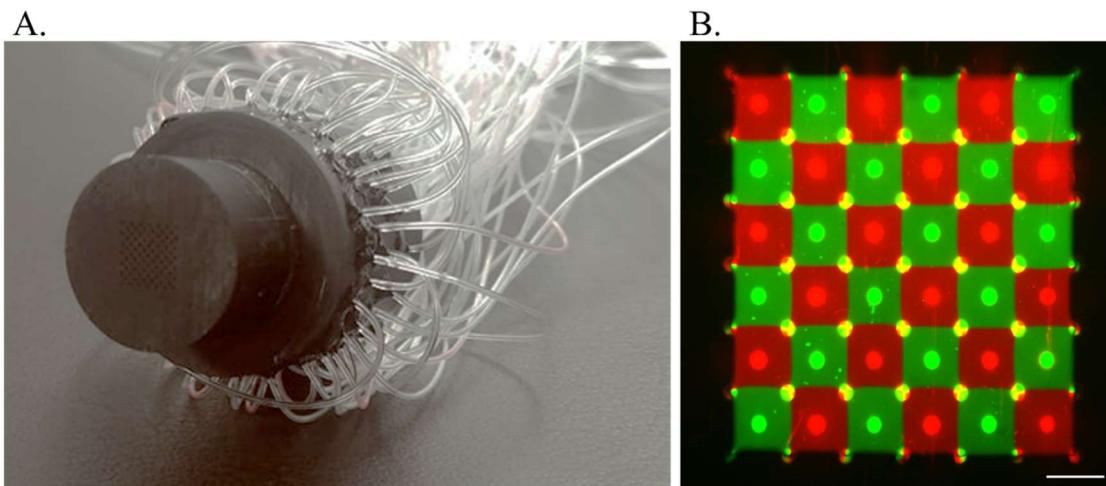


Figure 3.1 PCD 6x6. (A) Dispositif assemblé, chaque tube mène à une ouverture sous l'afficheur. (B) Visualisation de l'écoulement sous l'afficheur en damier (2 groupes de pixels), solution éthanol 70 % avec fluorescéine en vert et avec rhodamine en rouge, $q = 0,3 \mu\text{L/s}$, barre d'échelle = 1 mm.

3.2 Choix de la configuration de l'afficheur

Comme discuté à la section 2.6.2, les afficheurs MFM se divisent en deux grandes catégories : les rMFM, soit la configuration fleur, et les tMFM, dont font partie les PCD. Pour l'étude de la dynamique des voies de signalisation cellulaire, il faudra que l'afficheur puisse envoyer des impulsions de réactif en fréquence et qu'il reste simple d'utilisation pour ne pas compliquer inutilement les expériences en biologie. Regardons alors comment les deux configurations se comparent.

3.2.1 Les *Pixelated Chemical Display* et leur utilisation en fréquence

Les PCD ont été développés dans le but de simplifier la manipulation de fluides. Ils sont faits pour être reconfigurables et permettre éventuellement une haute parallélisation des conditions testées. J'ai d'abord cherché à démontrer la faisabilité de la pulsation de réactifs avec les PCD. La particularité de l'utilisation du PCD en fréquence est que pour conserver la stabilité des pixels, il faut continuellement injecter du fluide de même viscosité dans chacune des ouvertures. Pour pulser un réactif dans les pixels, on doit donc recourir à un système de valves qui alterne entre le réactif d'intérêt et un fluide neutre. J'ai donc conçu un système utilisant seulement deux pompes-seringues et n valves, où n représente le nombre de fréquences (ou groupes de pixels). Les impulsions de réactif sont contrôlées par les valves et le débit des seringues est ajusté en temps réel selon l'état d'ouverture des valves, le tout automatisé en LabVIEW (voir Figure 3.2).

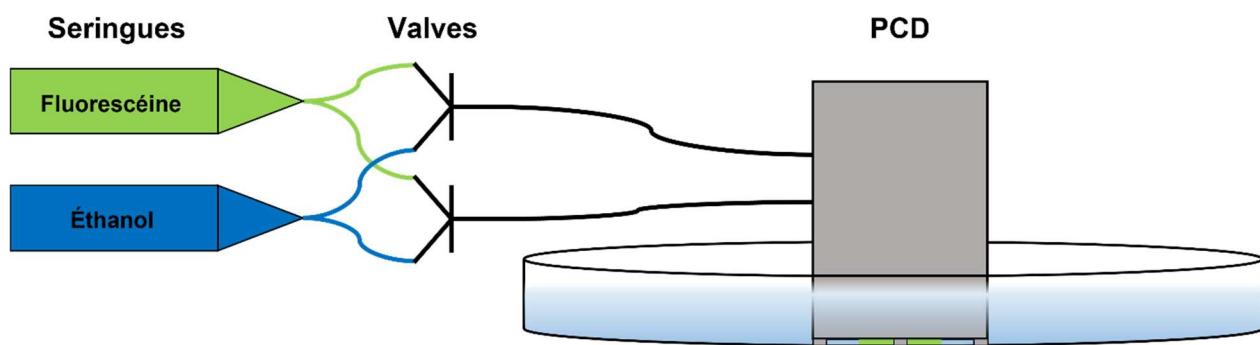


Figure 3.2 Schéma simplifié du montage utilisé pour tester l'envoi de pulses de réactif avec le PCD. Tests avec solution d'éthanol 70 % et de fluorescéine, le média environnant est aussi de l'éthanol 70 %, le débit des pompes-seringues est continuellement ajusté selon le nombre de valves ouvertes et chaque valve contrôle une pulsation. Le même système peut être utilisé pour n fréquences avec n valves. Aspirations non-montrées.

Avec l'afficheur PCD 6x6 précédemment conçu et mon système expérimental (voir Figure 3.2), j'ai testé l'utilisation du PCD en fréquence. La figure 3.3 ci-dessous présente le résultat obtenu pour l'injection de deux fréquences en damier, ou plus correctement d'une même fréquence (Période = 120 s), mais avec deux rapports cycliques (RC ou *Duty Cycle* en anglais) différents (25 % et 50 %).

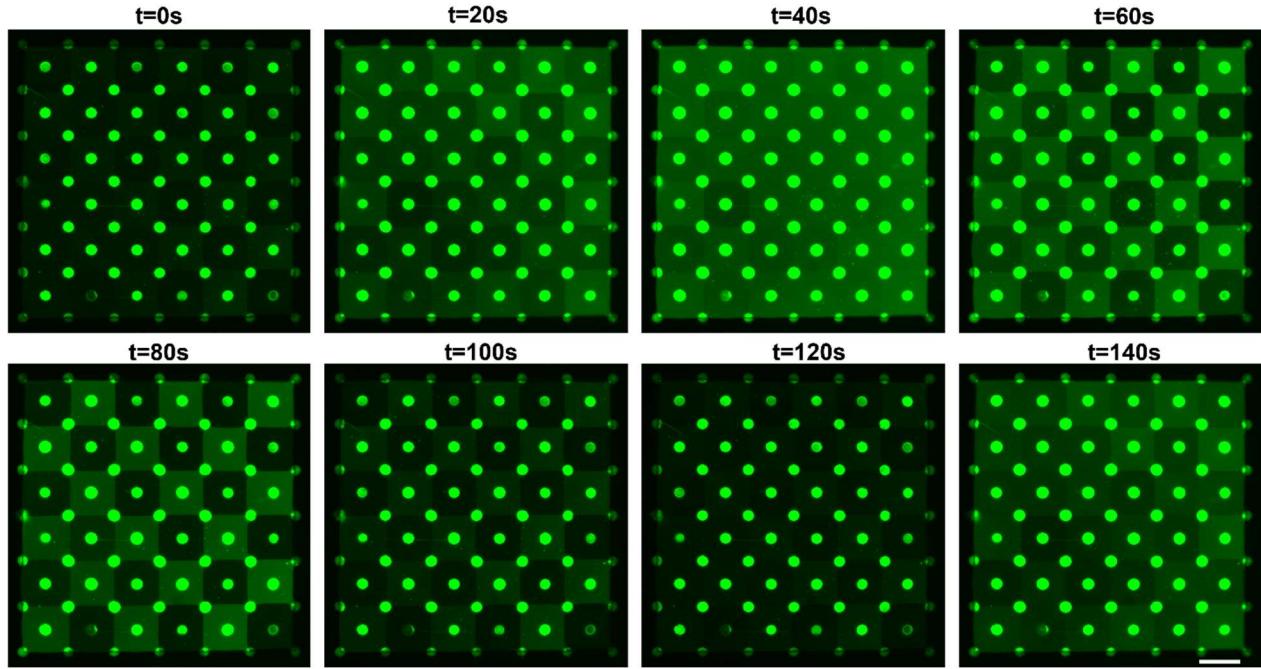


Figure 3.3 Pulsations de réactif avec un PCD 6x6. Les deux groupes de pixels, c'est-à-dire les deux RC, sont disposés en damier (comme à la figure 3.1 B), Période = 120 s, RC 1 = 25 %, RC 2 = 50 %, $q = 0,3 \mu\text{L/s}$, barre d'échelle = 1 mm.

Les courbes d'intensité de fluorescence dans chaque groupe de pixels ont pu être tracées afin de visualiser le comportement dynamique des pixels (voir Figure 3.4). On constate une largeur à mi-hauteur (LMH ou FWHM en anglais) de 36,5 s pour les impulsions à 25 % de rapport cyclique, soit légèrement supérieur à 30 s (25 % de 120 s). Cela donne un rapport cyclique effectif de 30 %, donc une erreur relative de 20 % par rapport à l'impulsion originale : l'impulsion s'est un peu étirée dans le temps. Cependant, on a une LMH de 64 s pour les impulsions à RC 50 %, ce qui donne un RC effectif de 53 %, donc seulement 6 % d'erreur relative par rapport au RC 50 %. On remarque également que les amplitudes pic à pic (A_{pp}) sont similaires pour les deux rapports cycliques, $A_{pp_25\%} = 18,21 \text{ A.U.}$ et $A_{pp_50\%} = 19,64 \text{ A.U.}$, ce qui indique que les deux conditions de test atteignent chacune leur valeur d'intensité de fluorescence maximale. Ainsi, avec un débit

d'injection et d'aspiration de $0,3 \mu\text{L/s}$ et une période de 120 s , les impulsions de réactifs peuvent être bien contrôlées dans les pixels. Notons toutefois que les temps de transition, soit t_{ON} le temps pour qu'un pixel passe d'un minimum d'intensité de fluorescence à un maximum d'intensité, sont relativement longs ($t_{\text{ON,25\%}} = 32 \text{ s}$ et $t_{\text{ON,50\%}} = 54 \text{ s}$).

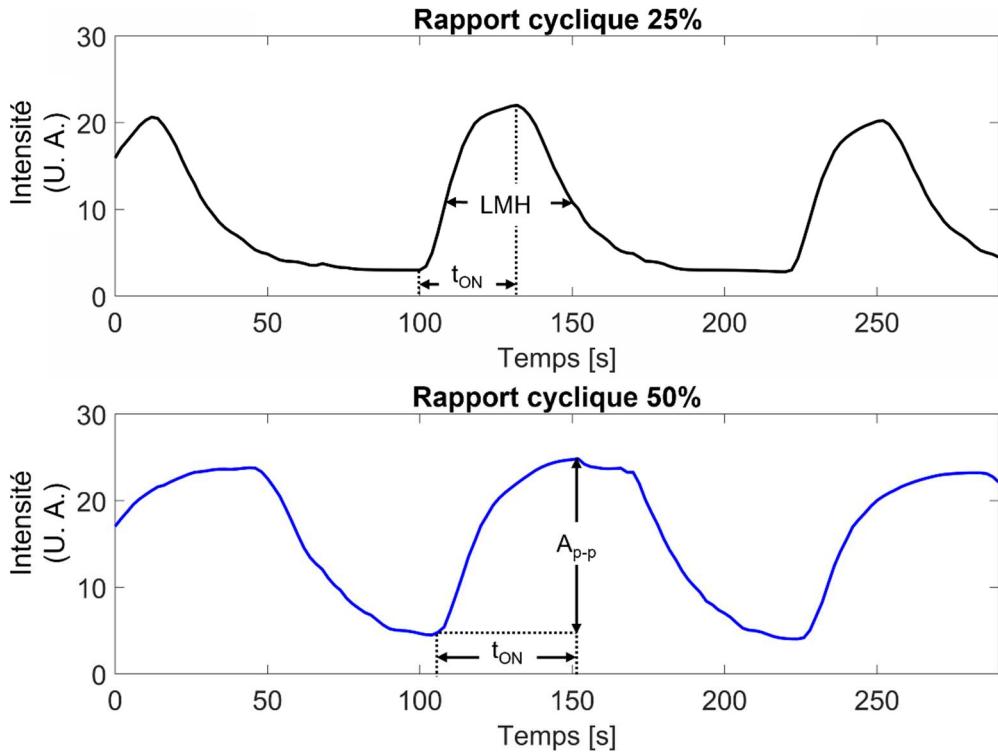


Figure 3.4 Courbes d'intensité de fluorescence dans les pixels pulsés en fréquence pour l'expérience montrée à la figure 3.3. Période = 120 s , les temps montrés à la figure 3.3, $t = 0 \text{ s}$ à $t = 140 \text{ s}$, correspondent ici à $t = 100 \text{ s}$ jusqu'à $t = 240 \text{ s}$ respectivement, unité arbitraire (U. A.) en ordonnée, définition des variables t_{ON} : temps de transition d'ouverture, A_{pp} : amplitude pic-à-pic du signal de fluorescence et LMH : Largeur à mi-hauteur. RC 25 % : $t_{\text{ON}} = 32 \text{ s}$, $A_{\text{pp}} = 18,21 \text{ U. A.}$ et $\text{LMH} = 36,5 \text{ s}$. RC 50% : $t_{\text{ON}} = 54 \text{ s}$, $A_{\text{pp}} = 19,64 \text{ U. A.}$ et $\text{LMH} = 64 \text{ s}$.

J'ai ensuite testé la résolution temporelle du système en expérimentant l'envoi de plus hautes fréquences dans les pixels de mon PCD. Les courbes d'intensité de fluorescence de deux expériences supplémentaires sont présentées à la figure 3.5, une réalisée avec une période de 60 s et une autre avec une période de 10 s . On peut tirer plusieurs conclusions de ces résultats préliminaires. Premièrement, on remarque d'entrée de jeu que les impulsions envoyées avec une période de 10 s conduisent à une dynamique indiscernable dans les pixels (voir Figure 3.5 B). Cela signifie qu'alterner trop rapidement entre le réactif (fluorescéine) et le fluide neutre (éthanol)

réulte en un mélange en aval du système. Qui plus est, un plus haut RC augmentera la concentration du réactif dans le mélange. C'est ce qu'on observe à la figure 3.5 B, où pour un RC de 50 %, l'intensité de fluorescence est \sim 16 U.A., alors que pour un RC de 75 % l'intensité de fluorescence est \sim 24 U.A.

Le même phénomène de mélange peut d'ailleurs commencer à s'observer à la figure 3.5 A. Dans cette expérience avec une période de 60 s, on constate que l' A_{pp} pour les impulsions du RC 50 % (26,66 U.A.) est plus élevée que l' A_{pp} des impulsions du RC 25 % (20,27 U.A.). Cela suggère que les pics des pulses plus courts (RC 25 %) sont adoucis par un début de mélange des fluides dans les canaux. Le réactif fluorescent est donc dilué et la valeur d'intensité maximale n'est pas atteinte. À l'inverse, dans les impulsions de RC 50 %, c'est la valeur minimale qui ne semble pas être atteinte, les minimums sont à \sim 15 U.A. tandis que pour les impulsions à RC 25 % les minimums sont à \sim 10 U.A. L'intensité de fluorescence moyenne dans les pulses plus longs est donc effectivement décalée vers le haut. Ainsi, plus les impulsions sont courtes et plus la période d'injection est petite, plus la différence entre les maximums et les minimums diminue, jusqu'à l'atteinte d'une valeur moyenne témoignant d'un parfait mélange (voir Figure 3.5 B). On constate aussi ce phénomène avec la LMH des pulses de période de 60 s à RC 25 %, celle-ci vaut 27 s, ce qui donne un RC effectif de 45 % au lieu du 25 % initial (erreur relative de 80 %), ce qui montre l'élargissement de l'impulsion de réactif.

Ce phénomène de mélange est causé par ce que l'on appelle la dispersion de Taylor [102]. Il s'agit du principe en microfluidique selon lequel le cisaillement du fluide qui avance dans le canal augmente la diffusion du réactif. C'est donc la dispersion de Taylor qui limite la résolution temporelle du système PCD en fréquence, mais également le contrôle de la dose envoyée (perte de précision avec la dilution du réactif). Dans mon système, le problème est que les valves sont situées au niveau des seringues et donc les fluides ont toute la longueur de tube partant des seringues jusqu'au PCD pour se mélanger. Afin de réduire l'effet de la dispersion de Taylor, on peut donc réduire la distance entre les valves et le PCD, mais aussi réduire le rayon des canaux ou encore augmenter le débit [102], [103].

Ces expériences préliminaires démontrent qu'il est possible d'utiliser les PCD pour l'envoi d'impulsions de réactif. Toutefois, le système tel qu'utilisé présentement dans le laboratoire n'est pas idéal en raison des limitations sur la résolution temporelle causée par la dispersion de Taylor.

Tant que les valves ne seront pas intégrées directement sur le dispositif, la diffusion viendra nuire à la résolution temporelle et au contrôle de la dose de réactif envoyée.

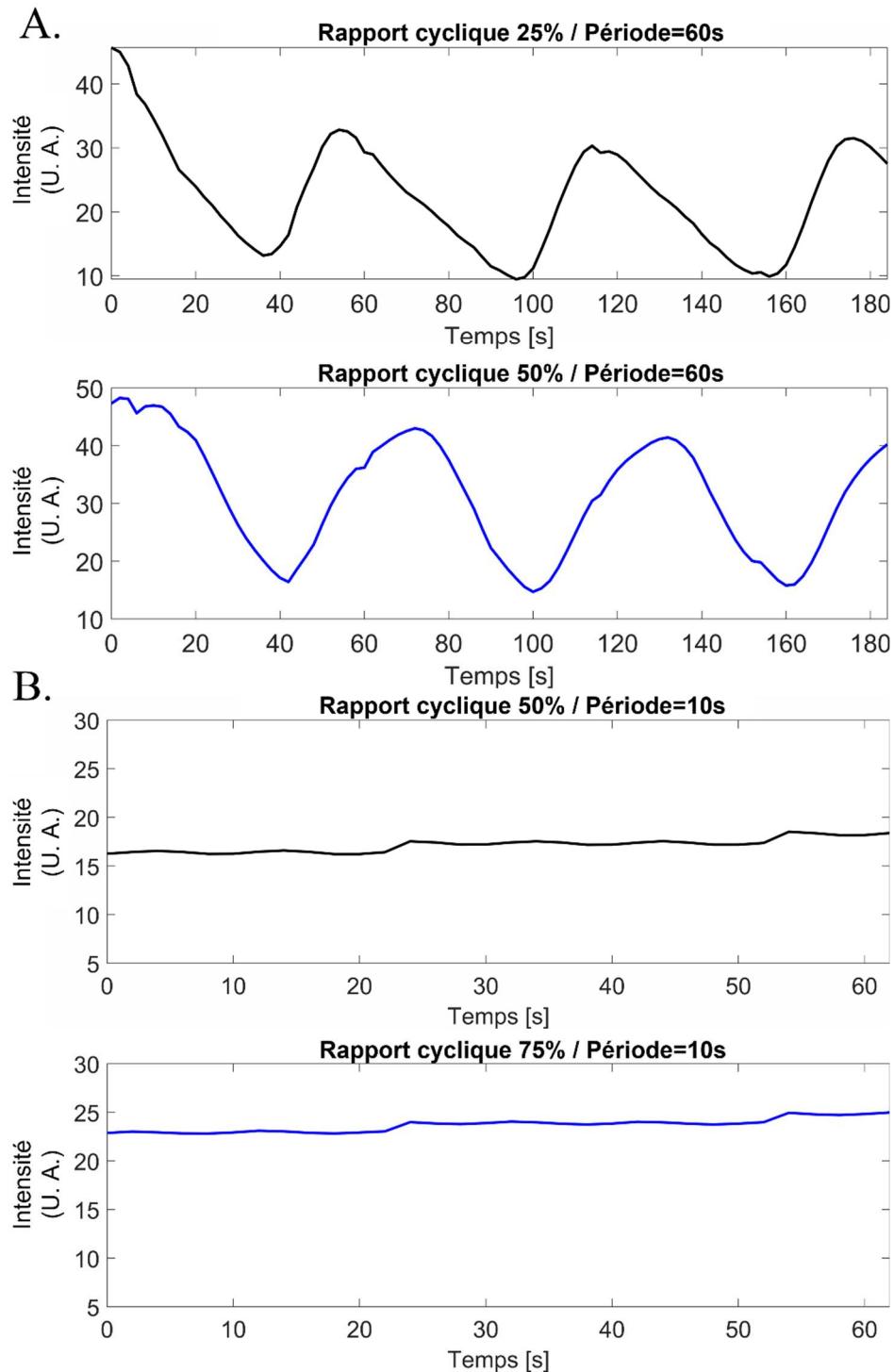


Figure 3.5 Courbes d'intensité de fluorescence dans les pixels pour d'autres conditions fréquentielles. (A) Période = 60 s, $q = 0,3 \mu\text{L/s}$, Rapport cyclique 25 % : $t_{\text{ON}} = 18 \text{ s}$, $A_{\text{p-p}} = 20,27$

U. A. et LMH = 27 s, Rapport cyclique 50 % : $t_{ON} = 31$ s, $A_{p-p} = 26,66$ U. A. et LMH = 32 s. (B) Période = 10 s, $q = 0,3 \mu\text{L/s}$, aplatissement du signal (voir Annexe A.1 pour les résultats bruts).

Les prochaines sous-sections feront le point sur la configuration de type fleur afin de conclure sur la meilleure configuration d'afficheur à adopter pour les expériences de stimulation fréquentielle.

3.2.2 Description analytique de la configuration fleur

Comme présenté précédemment à la figure 2.11 B, la configuration fleur répartit les injections en symétrie radiale autour d'une aspiration partagée par tous les pétales. Pour bien comprendre cette configuration d'afficheur, il est nécessaire de s'attarder avant tout sur les principes physiques théoriques fondateurs du type d'afficheur fleur.

L'idée présentée par Goyette et al. (2019) a été de décrire la solution analytique de l'équation d'advection-diffusion d'un dipôle microfluidique dans le plan complexe et d'appliquer des transformations conformes pour créer d'autres configurations à solution valide [23]. En effet, il est utile de représenter les écoulements 2D Hele-Shaw par une fonction potentielle complexe : $\Phi = \phi + i\psi$, où la partie réelle ϕ représente le potentiel de vitesse et la partie imaginaire ψ décrit les lignes de courant de l'écoulement. Soit le plan complexe \mathbb{C} avec les nombres complexes $z = x + iy$. En appliquant le principe de superposition des potentiels, on peut alors représenter tout écoulement à m ouvertures, en approximation sources points, par :

$$\Phi = \sum_{n=0}^m q_n \ln(z - z_n)$$

Où chaque $n^{\text{ième}}$ ouverture a un débit q_n et une position z_n dans le plan. On peut ainsi représenter le dipôle microfluidique par :

$$\Phi = q_{inj} \ln(z - d) - q_{asp} \ln(z) = \ln(z - d) - \alpha \ln(z)$$

Où l'aspiration est centrée en $z = 0$ et l'injection est située à $z = d$ (voir Figure 3.6 A). On trouve ensuite la disposition fleur à n pétales en utilisant une transformation conforme de type puissance, soit $f(z) = z^n$, ce qui effectue n symétries radiales autour de l'origine (voir Figure 3.6 B-C). Pour faire cette transformation, il suffit de réaliser le changement de variable $z \rightarrow z^n$ dans l'équation d'écoulement potentiel du dipôle. On obtient alors :

$$\Phi = q_{inj} \ln(z^n - d) - q_{asp} \ln(z^n) = q_{inj} \ln(z^n - d) - nq_{asp} \ln(z)$$

Par inspection, le débit total d'aspiration de l'ouverture centrale de la fleur est donc $Q_{asp} = nq_{asp}$. Ainsi, pour une fleur à n ouvertures, les débits d'aspiration et d'injection sont reliés par :

$$Q_{asp} = nq_{asp} \times \frac{q_{inj}}{q_{inj}} = n \alpha q_{inj}$$

Cette relation est de première importance dans le contrôle expérimental des écoulements sous l'afficheur de type fleur (voir sous-section suivante). On remarquera également à la figure 3.6 ci-dessous, que pour α constant, l'ajout d'injections a pour effet de compresser l'écoulement du simple dipôle n fois dans un $n^{\text{ième}}$ ($1/n$) du plan complexe.

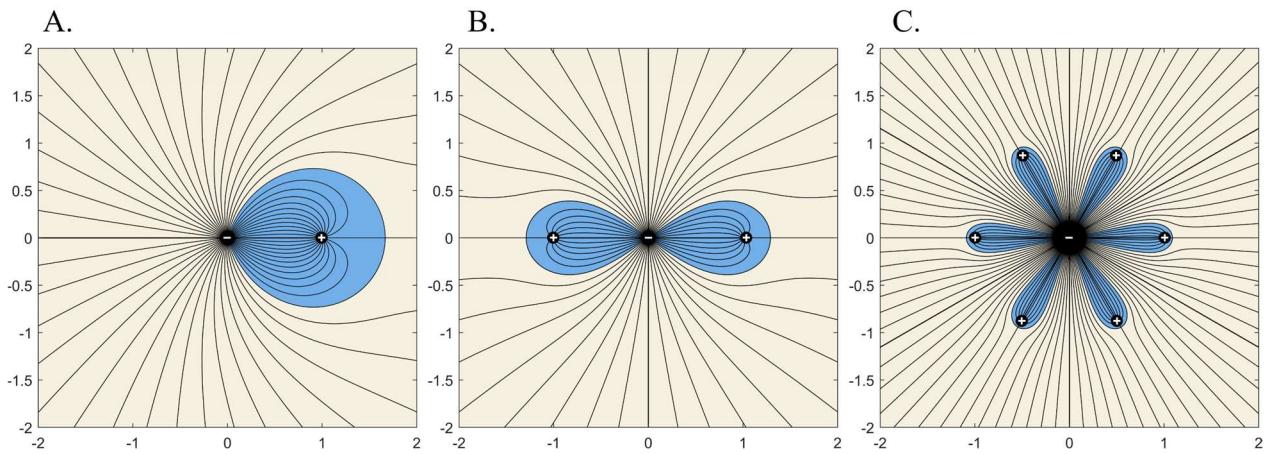


Figure 3.6 Du dipôle à la fleur par transformation conforme $z \rightarrow z^n$. Représentation des lignes de courant de l'écoulement, ratio constant : $\alpha = 2,5$. **(A)** Dipôle avec aspiration centrale en $z = 0$ et injection située en $z = 1$. **(B)** Résultat de la transformation $z \rightarrow z^2$ sur le dipôle en A). **(C)** Résultat de la transformation $z \rightarrow z^6$ sur le dipôle en A).

3.2.3 La configuration fleur en fréquence

Cette configuration d'afficheur a quant à elle déjà été utilisée pour des pulsations en fréquence, si bien qu'elle a été précédemment désignée comme un « stroboscope chimique » [23]. À l'inverse des PCD, aucun système de valves n'est requis pour utiliser la configuration fleur en fréquence. Le système expérimental comporte simplement une pompe-seringue par injection et une pompe-seringue d'aspiration pour l'aspiration centrale (voir Figure 3.7 A). Cela diminue grandement le nombre de tubes reliés au dispositif et facilite son assemblage. J'ai donc conçu un afficheur de type fleur à 10 pétales pour tester son fonctionnement en fréquence (voir Figure 3.7 B).

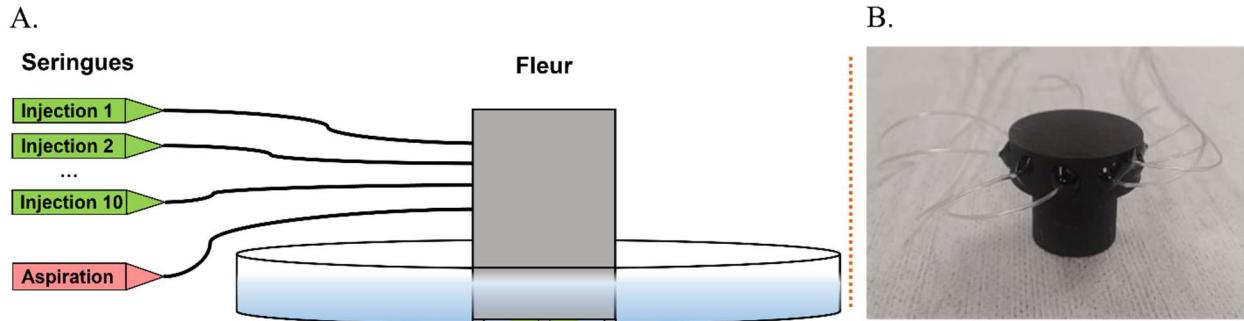


Figure 3.7 Afficheur microfluidique de type fleur. (A) Schéma simplifié du montage expérimental pour la configuration fleur. (B) Afficheur de type fleur à 10 pétales assemblé.

Pour envoyer des impulsions de réactif avec l'afficheur fleur, il suffit de contrôler directement les pompes-seringues avec le programme LabVIEW. En revanche, le principal défi dans l'utilisation de la configuration fleur est d'assurer la stabilité des pétales et le maintien de leur taille. Effectivement, comme constaté en 3.2.2, l'ajout d'injections dans le plan d'écoulement se traduit par un amincissement de la largeur des pétales. L'équilibre des écoulements varie donc selon le nombre de pétales ouverts. Par exemple, si une injection se ferme, les autres pétales s'élargissent. La stratégie précédemment développée dans le laboratoire était donc d'ajuster le ratio α en temps réel selon le nombre de pétales ouverts afin que ceux-ci conservent une largeur constante pendant l'envoi d'impulsions de réactif. Pour cela on ajoute un facteur correctif empirique à la relation trouvée précédemment :

$$Q_{asp} = n \alpha q_{inj} \times f_c(n)$$

Où Q_{asp} est le débit total d'aspiration central, n est le nombre de pétales ouverts, α est le ratio des débits aspiration/injection, q_{inj} est le débit dans un pétaire unitaire (idem pour tous les pétales), f_c est un facteur de correction qui varie selon le nombre de pétales ouverts (voir Annexe A.2). En appliquant cette correction, on peut donc contrôler la taille des pétales de l'afficheur (voir Figure 3.8).

D'un autre côté, pour contrôler la stabilité des pétales, on doit porter attention à la symétrie radiale de la fleur. Lorsqu'une injection est stoppée et que la symétrie est brisée, les pétales adjacents ont tendance à courber pour combler le changement de pression ainsi causé. Afin qu'ils restent le plus droit possible pendant les expériences, on doit donc tenter de conserver une symétrie dans les fermetures/ouvertures des pétales (voir Figure 3.8).

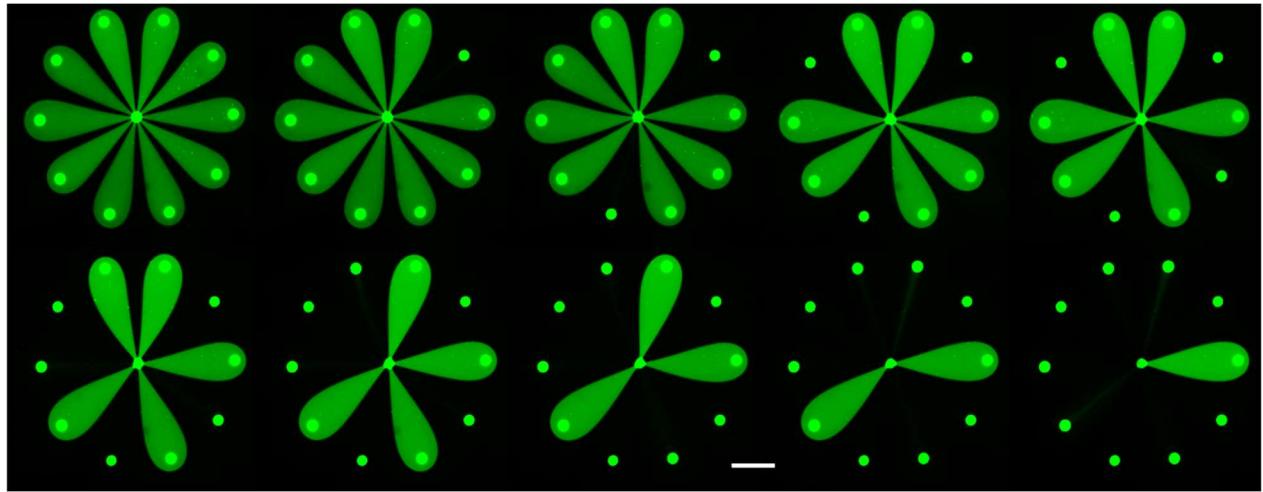


Figure 3.8 Contrôle de la taille des pétales d'un afficheur fleur à 10 pétales. En maintenant la symétrie pendant la fermeture des pétales, cela permet d'éviter leur courbure. Avec $q_{inj} = 0,5 \mu\text{L/s}$ et $\alpha = 1,5$. Barre d'échelle = 1 mm

Avec l'afficheur à 10 pétales conçu, des temps d'ouvertures t_{ON} d'un peu plus de 10 s ont pu être atteints avec un débit $q_{inj} = 1 \mu\text{L/s}$ et $\alpha = 1,5$ (voir Annexe A.3). On observe cependant des temps de fermeture des pétales, t_{OFF} , plus longs, à cause du grand rayon de la fleur (2 mm) (voir également Annexe A.3). Contrairement au PCD où la résolution temporelle est limitée par le montage expérimental, la résolution temporelle de la configuration fleur est limitée, entre autres, par ses paramètres géométriques de design. Par exemple, des temps de transition (t_{ON} et t_{OFF}) approchant la seconde ont précédemment été atteints avec un certain afficheur à 8 pétales [23].

En conclusion de cette section, c'est la configuration fleur qui a été choisie pour poursuivre mes travaux et réaliser les prochaines expériences en biologie. Après avoir testé les deux types d'afficheur (PCD et fleur), force est de constater que la configuration fleur permet une meilleure résolution temporelle et qu'elle est plus simple à utiliser expérimentalement (moins de tubes et de canaux, pas de valves requises). Elle comporte toutefois quelques inconvénients, comme une zone de traitement (pétale) de forme moins intuitive qu'un pixel carré et un débit d'aspiration considérablement plus élevé que pour le PCD, comme une seule aspiration doit compenser pour n pétales. Comme nous le verrons dans la prochaine sous-section, cela a pour effet d'augmenter les forces de cisaillement au niveau des cellules. Ces inconvénients restent toutefois aisément contournables. Après avoir fait le choix d'utiliser l'afficheur fleur, il fallait maintenant optimiser les paramètres pour son utilisation en culture cellulaire.

3.3 Optimisation du dispositif pour l'utilisation en culture cellulaire

La géométrie finale du dispositif doit respecter les contraintes et exigences de design du projet. Plus particulièrement, l'afficheur microfluidique doit permettre :

1) Une taille de pétales assez grande pour étudier un bon nombre de cellules par condition.

→ On vise une centaine de cellules par pétales, selon la confluence de la culture.

2) Des forces de cisaillement viables au niveau des cellules.

→ De grandes forces de cisaillement endommagent les membranes cellulaires et mènent à la mort des cellules. Chaque type de cellule réagit différemment au cisaillement. Il a par exemple été démontré qu'un cisaillement aussi bas que 1 Pa peut avoir un effet négatif sur la croissance des cellules épithéliales [94]. Avec cette référence, on vise donc à ne pas dépasser un cisaillement de 1 Pa.

3) Des temps de transitoires rapides.

→ Plus la résolution temporelle sur l'envoi de pulses de réactif est élevée, plus on est précis sur la dose. Des temps de transition en deçà de 10 s seront plus qu'acceptables.

Pour atteindre ces exigences, il faut optimiser les variables de design : r et G , respectivement le rayon de la fleur (centre aspiration à centre injection) et la hauteur entre l'afficheur et la surface de cellules, ainsi que les paramètres d'utilisation q_{inj} et α .

Comme discuté en 3.2.2, la configuration fleur est obtenue par transformation conforme de type puissance d'un dipôle microfluidique dans le plan complexe. D'une certaine façon, on peut voir la fleur microfluidique comme une sommation de dipôles partageant la même ouverture d'aspiration. Comme l'écoulement potentiel satisfait l'équation de Laplace 2D ($\nabla^2\phi = 0$ et $\nabla^2\psi = 0$), une équation invariante conformément, on peut donc reprendre la physique du dipôle pour analyser la physique de chaque pétales. Le profil d'advection-diffusion est lui aussi invariant conformément. Par conséquent, afin de guider le design de l'afficheur, je me suis basé sur les équations et lois d'échelles exhaustivement décrites pour le dipôle microfluidique, notamment par Safavieh et al. (2015) [94]. La transformation conforme affecte toutefois la géométrie de l'écoulement, donc

certaines relations du dipôle ne s'appliquent pas exactement pour le pétale (voir Annexe A.4). Les lois d'échelles restent malgré tout très utiles pour guider le design de l'afficheur fleur.

On a par exemple le nombre de Péclet, Pe , représentatif du dipôle (près du point de stagnation) qui est décrit par [94]:

$$Pe = \frac{q_{inj}}{8\pi DG} \frac{(\alpha - 1)^3}{\alpha}$$

Où D est le coefficient de diffusion de l'espèce en solution. Le nombre de Péclet représente le ratio des temps de diffusion et de convection. Si $Pe \gg 1$, il s'agit d'un régime convectif, tandis que si $Pe \ll 1$, il s'agit d'un régime diffusif.

Un autre paramètre à considérer est le temps de transition. Le temps caractéristique t_0 pour que le profil de diffusion du dipôle microfluidique atteigne le régime permanent a précédemment été défini comme [94]:

$$t_0 = \frac{r^2}{4DPe}$$

Si on veut minimiser le temps de transition, il faudra donc principalement réduire le rayon de la fleur et aussi augmenter le nombre de Péclet. En revanche, un haut nombre Pe implique que la vitesse du fluide augmente ($v \propto q$), ce qui augmente aussi directement les forces de cisaillement τ au niveau des cellules, comme on voit avec la relation ci-dessous [94]:

$$\tau(x, y) = \frac{6\eta}{G} \vec{v}(x, y)$$

Soit τ , la force de cisaillement décrite pour un écoulement de Hele-Shaw, où η est la viscosité du fluide et $\vec{v}(x, y)$ la vitesse en tout point (x, y) .

Finalement, afin de retrouver le champ de vitesse $\vec{v}(x, y)$ sous l'afficheur et de visualiser les écoulements théoriques, j'ai directement calculé le profil de vitesse théorique et tracé les lignes de courant sous l'afficheur en appliquant le principe de superposition des m sources dans le plan cartésien (x, y) [86]:

$$\vec{v}(x, y) = \sum_{n=0}^m \frac{q_n}{2\pi G} \frac{(x - x_n)\hat{x} + (y - y_n)\hat{y}}{(x - x_n)^2 + (y - y_n)^2}$$

Où chaque ouverture à un débit q_n et une position (x_n, y_n) .

En résumé, on a donc un problème d'optimisation comportant multiples inconnues (q_{inj} , α , G , r , Pe , t_0 , τ , ...) et 4 relations, ce qui implique une infinité de solutions. Certaines valeurs ont donc été posées en adéquation avec les contraintes matérielles et pratiques.

3.3.1 Choix du nombre de pétales

On doit premièrement fixer le nombre de pétales que contiendra l'afficheur. Évidemment un des avantages promis des afficheurs microfluidiques est de pouvoir tester un grand nombre de conditions simultanément. Or, pour l'instant, chaque condition est contrôlée par une pompe-seringue. Les pompes-seringues sont dispendieuses et en avoir trop ne concorde pas avec le désir éventuel de répandre la technologie dans les laboratoires de biologie pour aider les recherches sur la dynamique cellulaire. Dans le cas de la configuration fleur, on doit aussi considérer que plus on augmente le nombre de pétales, plus ceux-ci sont minces. Ce qui implique d'augmenter le rayon de la fleur pour obtenir une aire de pétales suffisamment grande pour traiter les cellules, au détriment de la résolution temporelle ($t_0 \propto r^2$) (voir aussi Annexe A.3). Au final, comme le présent projet se veut d'abord et avant tout une preuve de concept, le choix du nombre de pétales a été posé arbitrairement à six. Ce nombre permet d'obtenir des pétales de forme plus élargie, moins allongée et permet un dimensionnement optimal du dispositif pour l'utilisation sur cellules.

3.3.2 Aire des pétales et cisaillement

La taille des pétales varie selon le rayon de la fleur et le ratio des débits α (voir Figure 3.9). Augmenter le rayon augmente la longueur du pétales, tandis qu'augmenter α augmente sa largeur.

Dans le calcul de l'aire, on doit aussi prendre en compte le cisaillement sous l'afficheur. En effet, celui-ci est plus élevé en se rapprochant de l'ouverture centrale, comme le débit d'aspiration est plus important, les vitesses sont aussi plus grandes (voir Figure 3.10). Pour le dimensionnement de l'afficheur, j'ai donc considéré une aire efficace, soit une zone dans laquelle le cisaillement est inférieur à 1 Pa.

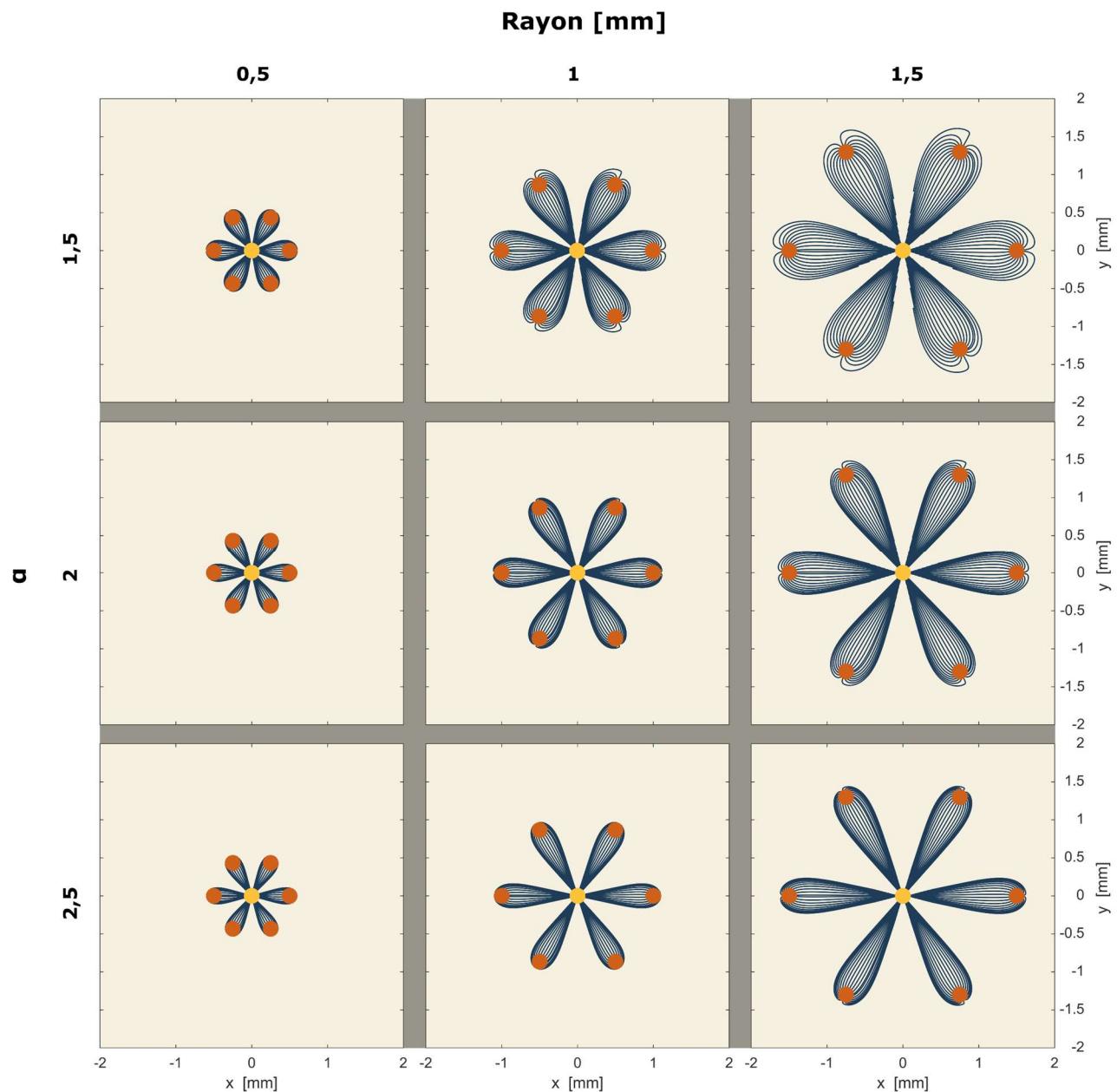


Figure 3.9 Visualisation à l'échelle des lignes de courant sous l'afficheur fleur à 6 pétales selon r et α .

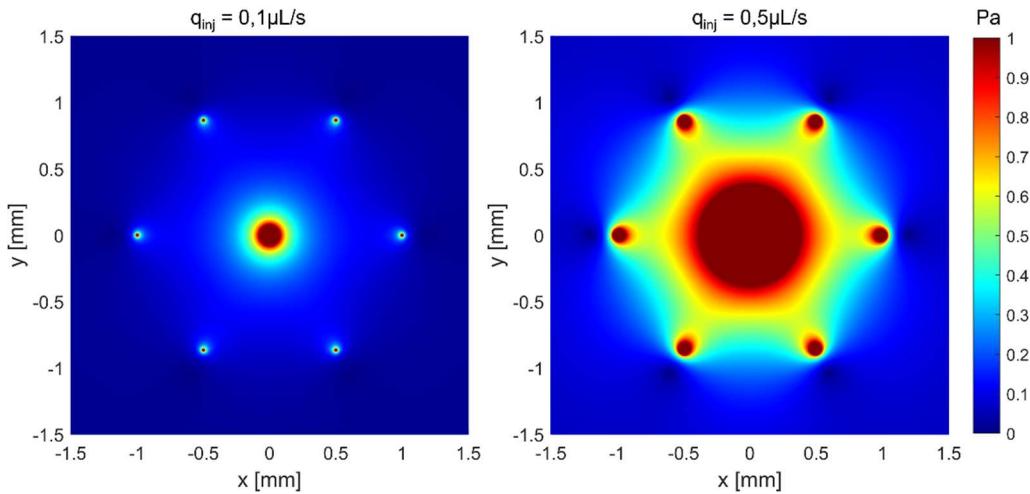


Figure 3.10 Forces de cisaillement sous un afficheur à 6 pétales, selon différents débits d'injection. Avec $\alpha = 1,5$, $G = 100 \mu\text{m}$ et $r = 1 \text{ mm}$. Pour $q_{inj} = 0,1 \mu\text{L/s}$, on a donc $Q_{asp} = 0,9 \mu\text{L/s}$ et pour $q_{inj} = 0,5 \mu\text{L/s}$ on a $Q_{asp} = 4,5 \mu\text{L/s}$.

La dernière chose à considérer est le nombre de cellules sous les pétales pendant les expériences. Ceci dépend bien sûr du type de cellule et de la confluence de la culture. En approximant le diamètre d'une cellule à $40 \mu\text{m}$ [104], [105], j'ai pu cibler une aire minimale de $0,3 \text{ mm}^2$ afin d'obtenir 100 cellules sous un pétale à environ 50 % de confluence (voir Figure 3.11). Il s'agit d'un estimé conservateur, car dans les faits, on travaillera avec des confluences supérieures à 50 %.

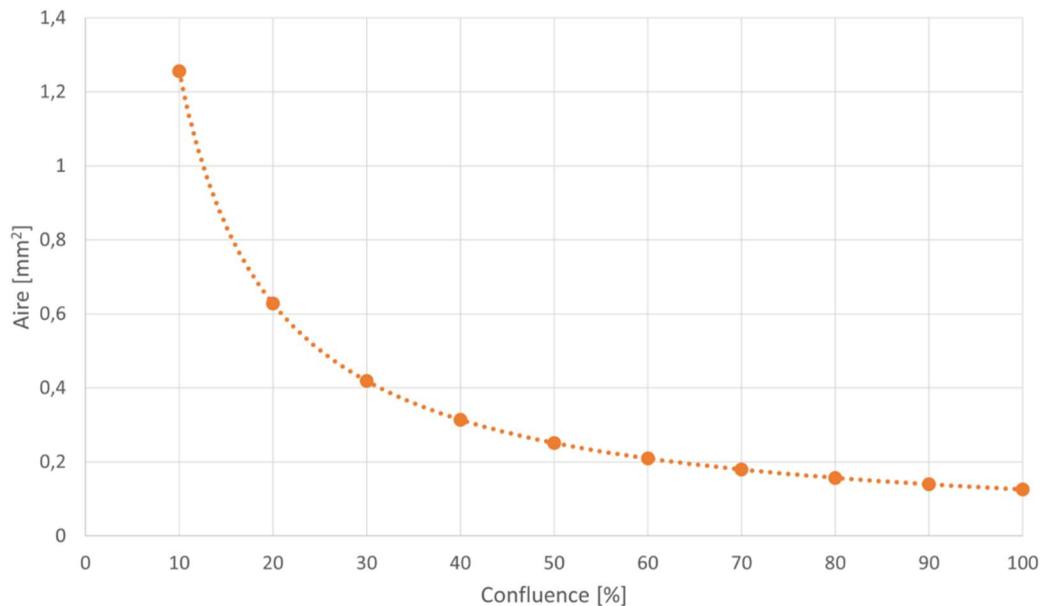


Figure 3.11 Aire d'un pétale nécessaire pour contenir 100 cellules (diamètre $40 \mu\text{m}$) selon le pourcentage de confluence de la culture cellulaire.

3.3.3 Choix des dimensions r et G

Comme on veut un petit temps t_0 , cela impose une borne inférieure au nombre de Péclet. À l'inverse, la limite du cisaillement sous la barre du 1 Pa impose une borne supérieure à Pe . On cherche donc un cas où Pe est le plus grand possible pour minimiser t_0 , et ce, sans franchir le seuil du cisaillement trop élevé.

L'idée était de fixer α ($\alpha = 2$), et ensuite de tester numériquement plusieurs combinaisons de q_{inj} , G et r pour trouver celles qui respectent les contraintes sur Pe et l'aire sous 1 Pa (Aire $> 0,3 \text{ mm}^2$). Le détail des analyses est placé en annexe pour ne pas alourdir le texte (voir Annexe A.5). Finalement, les paramètres choisis sont $G = 100 \mu\text{m}$ et $r = 1,15 \text{ mm}$, et l'utilisation de l'afficheur est trouvée optimale avec $q_{inj} = 0,4 \mu\text{L/s}$ et $\alpha = 2$.

3.3.4 Vérification du nombre de Reynolds

Le nombre de Reynolds est un paramètre très important en microfluidique. Il représente le ratio entre les forces inertielles et les forces visqueuses du fluide étudié. Il détermine donc si l'écoulement est laminaire visqueux, inertiel, ou turbulent. Il est défini par :

$$Re = \frac{\rho v L}{\eta}$$

Où ρ est la densité du fluide, v est la vitesse, L est la longueur caractéristique du système et η est la viscosité du fluide. Dans le cas du dipôle microfluidique, on a : $L = G^2/r$ [94]. On peut ainsi calculer Re pour le fluide sous l'afficheur fleur. Les analyses théoriques supposent un écoulement potentiel Hele-Shaw où le nombre de Reynolds, Re , est faible ($Re < 1$). On constate à la figure 3.12 que c'est bel et bien le cas pour les écoulements sous l'afficheur avec les paramètres de design choisi (hormis pour les surestimations numériques sous les ouvertures).

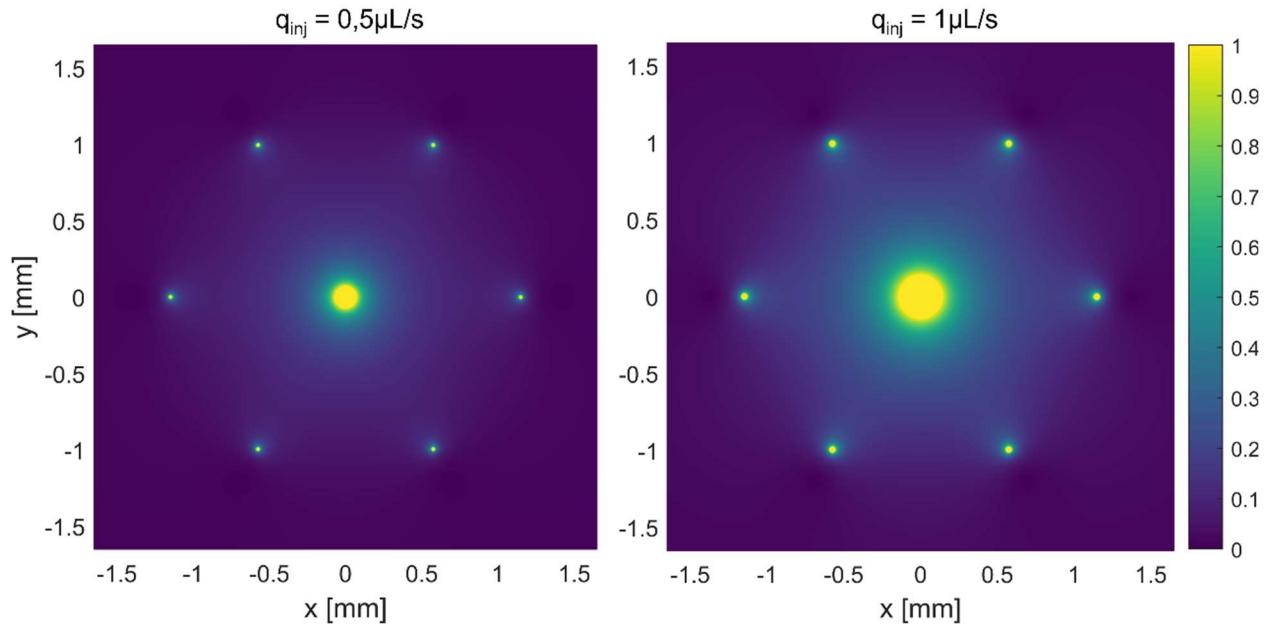


Figure 3.12 Nombre de Reynolds sous l'afficheur à 6 pétales avec les paramètres de design finaux $G = 100 \mu\text{m}$, $r = 1,15 \text{ mm}$ et $\alpha = 1,5$.

3.3.5 Fabrication du dispositif

Une fois les dimensions fixées, l'afficheur à 6 pétales a été fabriqué en suivant les méthodes mentionnées précédemment (voir section 3.1.1). Une attention particulière a été portée pour adoucir les canaux internes dans la modélisation 3D, afin de réduire les trappes d'air et donc les risques d'apparition de bulles d'air pendant les expériences (voir Figure 3.13 A). L'afficheur est conçu avec un diamètre aminci fait pour s'installer dans le puits de 14 mm d'un plat de Petri 35 mm ou d'une plaque à puits à fond de verre (voir Figure 3.13 B).

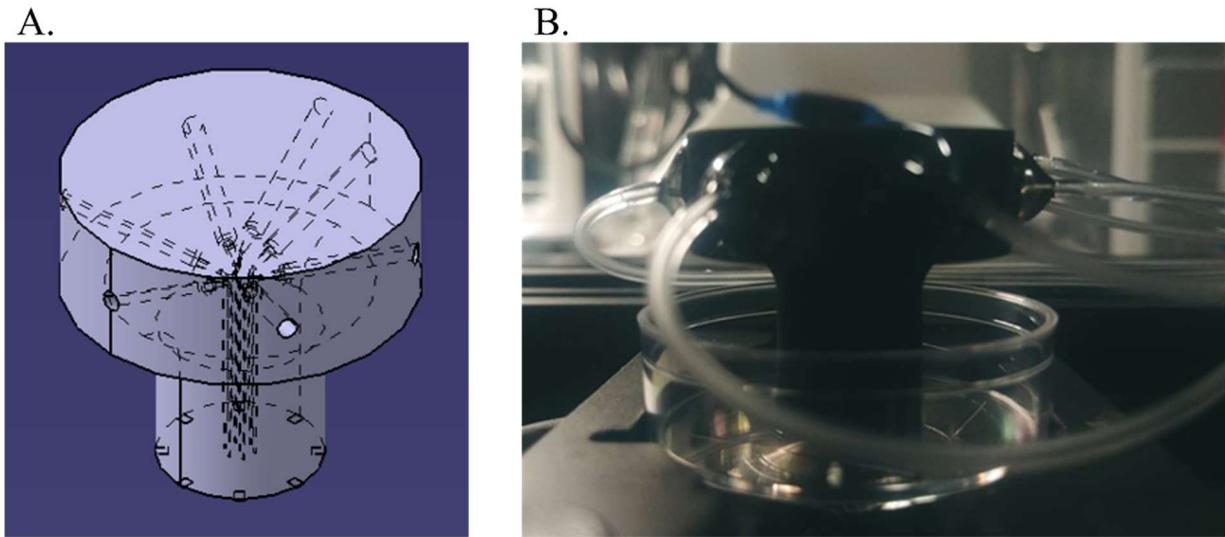


Figure 3.13 Afficheur de type fleur à 6 pétales optimisé pour les expériences avec cellules. (A) Modélisation CATIA. **(B)** Dispositif assemblé et disposé dans un Petri prêt à l'utilisation au microscope

3.4 Validation expérimentale de l'afficheur

Une fois l'afficheur à 6 pétales fabriqué, j'ai ensuite vérifié son bon fonctionnement expérimentalement. Les deux principaux paramètres à vérifier sont la résolution spatiale, soit de regarder si les pétales sont stables lorsqu'utilisés en fréquence, et la résolution temporelle, soit de vérifier la rapidité des temps de transition.

3.4.1 Résolution spatiale

Le résultat d'une expérience d'injections en fréquence avec l'afficheur est présenté à la figure 3.14. Encore une fois, une fréquence a été testée ($P = 30$ s), mais avec trois rapports cycliques différents, soit 25 %, 50 % et 75 %. Chaque condition est divisée en paire de pétales opposés, pour assurer le maintien de la symétrie et une orientation droite des pétales. On constate d'emblée que la forme des pétales est bien définie. Notons que certains pétales apparaissent plus gros et d'autres plus petits. C'est donc dire qu'il y a de légères variations entre les différents débits d'injection. Ces variations de débits peuvent par exemple être causées par les imprécisions expérimentales dans l'installation des seringues sur les pompes-seringues (serrage de la vis d'installation). Nous verrons au prochain chapitre que ces variations n'induisent pas de différence notable entre les conditions expérimentales.

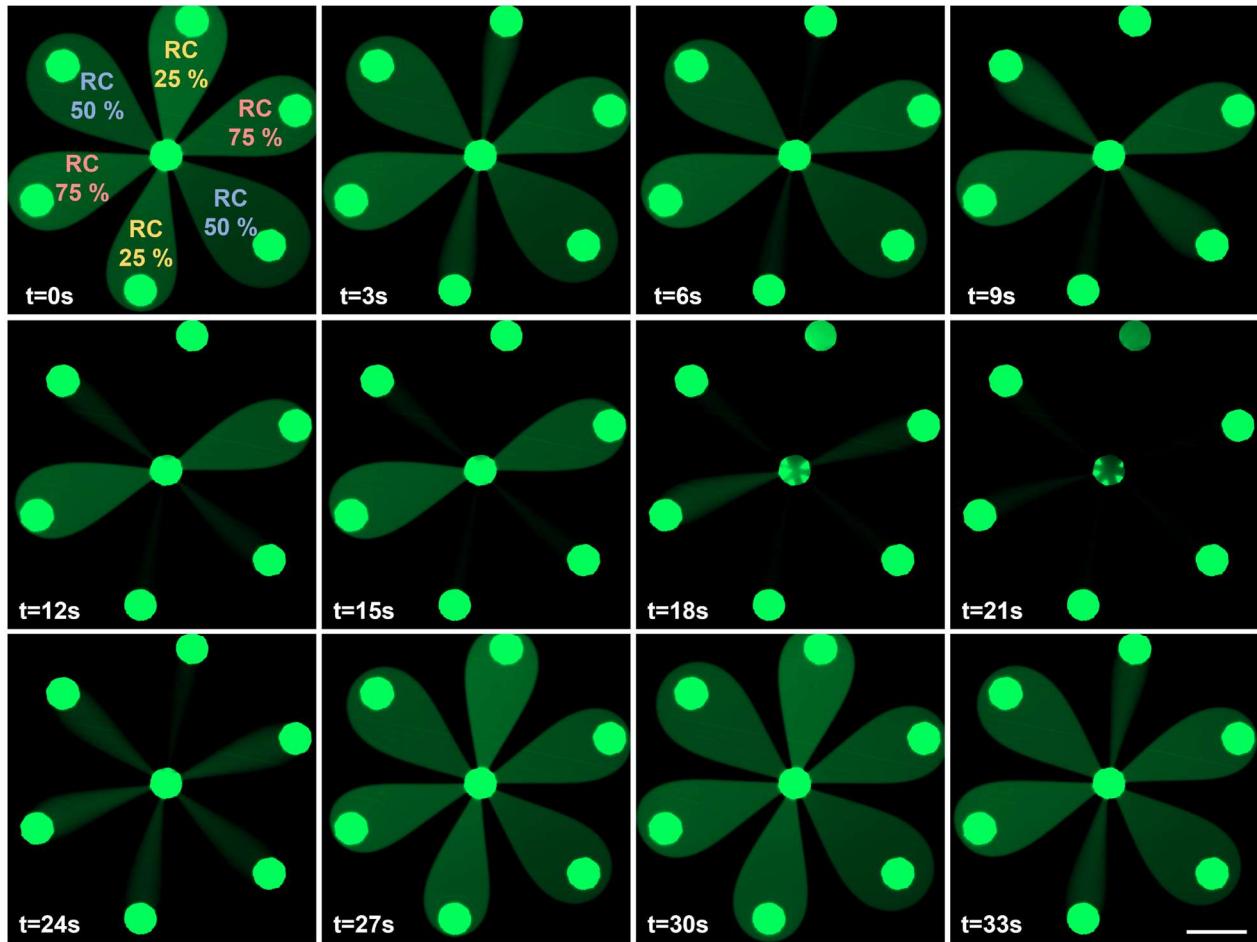


Figure 3.14 Pulsations de réactif avec l'afficheur fleur 6 pétales. Période = 30 s, RC1 25 %, RC2 50 % et RC3 75 %, $q_{inj} = 1 \mu\text{L/s}$, $\alpha = 1,5$, solution aqueuse avec fluorescéine sel de sodium, barre d'échelle = 500 μm .

3.4.2 Résolution temporelle

En observant les résultats de la figure 3.15, on voit rapidement que l'on obtient un temps d'ouverture des pétales d'environ 5 s et un temps de fermeture d'environ 6 s. Par ailleurs, comme discuté précédemment, le temps de transition est fonction de $\text{Pe}(q_{inj}, \alpha)$. J'ai donc testé différentes combinaisons de débit d'injection et d'aspiration. Comme on constate avec les résultats obtenus à la figure ci-dessous, le temps d'ouverture des pétales diminue bel et bien plus les débits augmentent. Les temps de transition restent aussi tous sous la barre des 10 s (environ 7 s pour les paramètres d'utilisation normale). On remarque aussi que, expérimentalement, la différence causée par α sur le temps de transition (entre $\alpha = 1,3$ et $\alpha = 2$) est minime. Pour la suite de mes travaux, je me suis donc permis d'utiliser $\alpha = 1,3$ avec $q_{inj} = 0,4 \mu\text{L/s}$ afin de favoriser une bonne largeur de pétale (en réduisant du même coup le cisaillement au niveau des cellules).

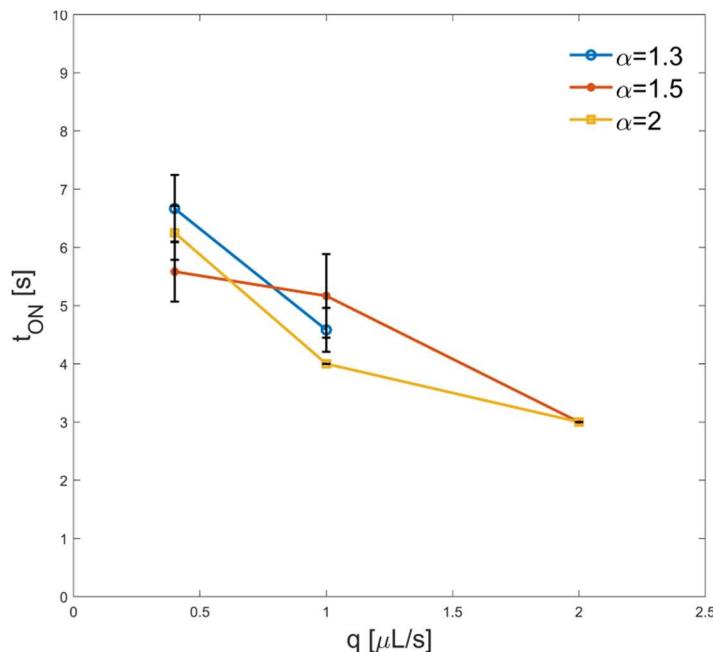


Figure 3.15 Temps de transition t_{ON} expérimental selon q_{inj} et α . Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur plusieurs lectures de temps (3 à 14) et pour différents pétales. Mesures sur des expériences imagées à 1 image par seconde (incertitude sur $t_{ON} = 1$ s).

CHAPITRE 4 VALIDATION DU DISPOSITIF EN CULTURE CELLULAIRE

Dans ce chapitre, je détaillerai mes démarches entreprises pour réaliser la transition expérimentale de l'afficheur microfluidique aux cellules en culture. Je présenterai les techniques et le montage expérimental utilisé, de même que les expérimentations qui ont permis de caractériser le bon fonctionnement de la technologie en culture cellulaire, soit la précision de la livraison spatiale et temporelle de réactif aux cellules et le maintien de la viabilité cellulaire. Je soulignerai aussi les problèmes expérimentaux créés par ce passage de la technologie au côté biologique, et présenterai les solutions trouvées pour réussir la transition.

4.1 Approche méthodologique

4.1.1 Culture cellulaire

Pour réaliser les expériences de ce chapitre, j'ai utilisé des cellules C2C12. Il s'agit d'une lignée de cellules musculaires myoblastes venant de la souris. Elles sont cultivées dans du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) à 20 % FBS (*Fetal Bovine Serum*) et les protocoles standards de culture de cellules adhérentes sont suivis.

4.1.2 Montage expérimental

Les expériences sont réalisées dans l'incubateur d'un microscope Zeiss Axio Observer. Il est très utile, voire essentiel, de pouvoir visualiser l'écoulement sous l'afficheur microfluidique en temps réel afin de pouvoir faire, au besoin, des ajustements en cours d'expérience. L'incubateur permet d'être chauffé à 37 °C pour le maintien des conditions viables des cellules. Il ne s'agit toutefois pas d'un incubateur à CO₂.

Par ailleurs, les expériences en biologie requièrent des durées plus longues, de plusieurs heures. C'est à considérer sachant que les seringues ont un volume maximal. Pour la plupart des expériences, on injecte seulement quelques millilitres globalement. Or, en configuration fleur, une quantité plus importante de liquide est aspirée, et limite la durée de l'expérience. J'ai donc mis au point un système de deux valves et deux seringues pour assurer une aspiration infinie et retirer cette limitation des expériences. Ainsi, quand la première seringue d'aspiration est remplie, la valve change le canal et la seringue se vide dans le canal à déchets. Simultanément, la deuxième seringue,

qui se vidait dans le canal à déchets jusqu'alors, se branche au canal principal avec le changement de valve et assure maintenant l'aspiration. Lorsque celle-ci est remplie, le processus recommence et ainsi de suite.

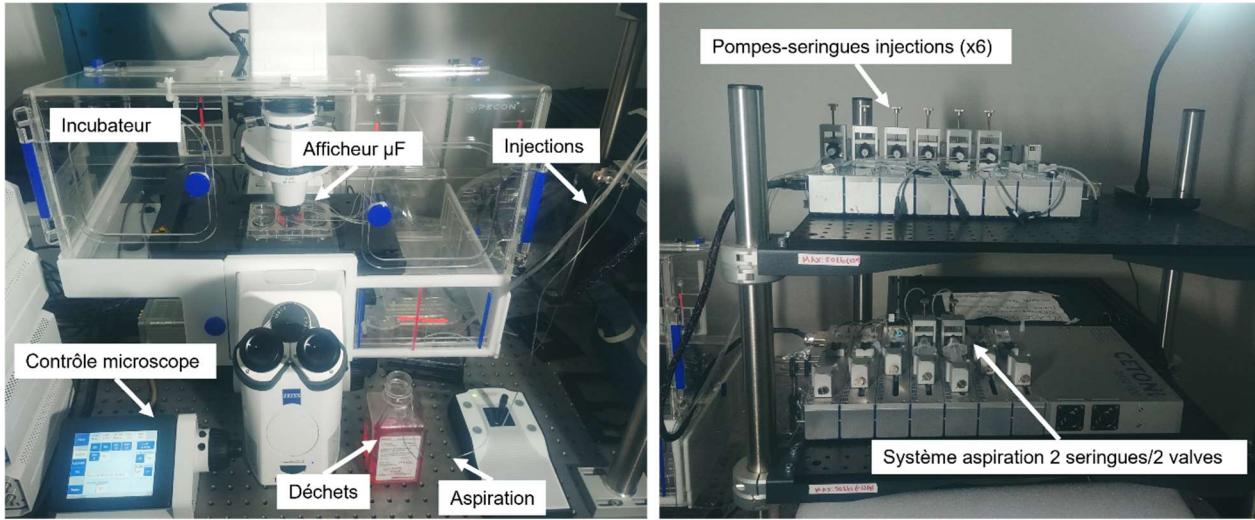


Figure 4.1 Montage expérimental pour l'utilisation de l'afficheur microfluidique.

4.1.3 Stérilité

Afin d'éviter toute contamination lors des expérimentations sur les cellules, des mesures supplémentaires doivent être mises en place. L'idéal est d'utiliser du nouveau matériel stérile pour chaque nouvelle expérience ou restérilisé par autoclave. Or, les afficheurs microfluidiques, comme ils sont présentement conçus, ne peuvent pas être mis à l'autoclave. Si la résine photosensible de l'afficheur est autoclavable, la tubulure qui y est collé ne l'est pas. Le dispositif est donc laissé à tremper dans l'éthanol 70 % quelques heures avant l'expérimentation. Toutes les surfaces, dont l'intérieur de l'incubateur, sont aussi préalablement nettoyées à l'éthanol 70 %.

4.1.4 Bulles : un problème de gaz en milieu aqueux

Le plus grand problème que j'ai eu à surmonter lors du passage des afficheurs microfluidiques en culture cellulaire a été la gestion des bulles. En microfluidique, la présence de bulles de gaz est un problème récurrent et tous les systèmes en sont affectés différemment. Certains peuvent s'accommoder de la présence de quelques bulles, tandis que le bon fonctionnement d'autres dispositifs n'en tolère aucune. C'est le cas des afficheurs microfluidiques. En effet, lorsqu'une bulle apparaît, elle reste logée dans l'espace entre la surface de traitement et le dessous de

l'afficheur. La zone d'injection est aussitôt déformée et si la bulle devient trop grosse, l'écoulement du réactif est irrémédiablement perturbé (voir Figure 4.2 A). Pis encore, l'apparition soudaine d'une bulle dans la zone d'écoulement à la sortie d'un canal engendre des forces de cisaillement qui arrachent les cellules de leur position sous l'ouverture (voir Figure 4.2 B). Il est donc primordial de limiter la présence de gaz en solution.

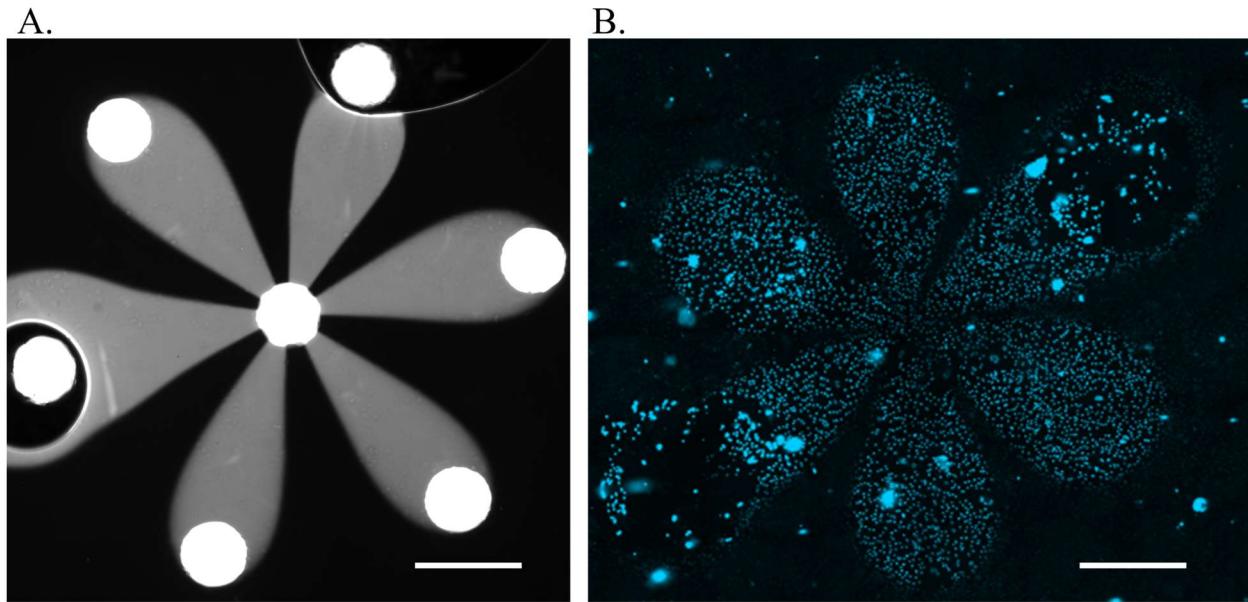


Figure 4.2 Exemples d'apparition de bulles pendant les expériences. (A) Déformation de l'écoulement dans les pétales, visualisation avec fluorescéine en solution. (B) Impact des bulles sur les cellules lors d'une expérience de marquage Hoechst 33258 (voir section 4.2). Barres d'échelle = 500 μ m.

Les techniques de base pour éliminer les bulles du système sont de pré-mouiller le système avec de l'éthanol et de bien chasser tout l'air des canaux de l'afficheur au début de l'expérience. Malgré tout, des bulles venaient perturber mes essais. Les principales différences avec mes précédentes expériences sont la température, celle-ci est maintenant de 37 °C dans l'incubateur du microscope pour maintenir les cellules dans un état viable, ainsi que les liquides. En effet, le média environnant et celui d'injection sont maintenant composés de média cellulaire, plutôt que simplement de l'éthanol ou de l'eau.

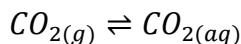
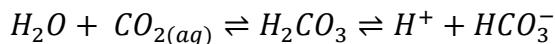
Afin de comprendre l'apparition de bulles et comment l'endiguer, il faut se référer à la loi de Henri sur la solubilité des gaz en solution aqueuse:

$$C_{sol} = H(T)p_g$$

Où C_{sol} est la concentration du gaz en solution, $H(T)$ est la constante de solubilité spécifique au gaz et qui varie avec la température T et p_g est la pression partielle du gaz dans la phase gazeuse du système [106]. Si on considère alors un système gaz-liquide à l'équilibre, des changements de température et de pression dans le système vont augmenter ou diminuer la solubilité du gaz en solution. Le système cherchera alors à se rééquilibrer par la diffusion du gaz dans le système. Plus précisément, on constate qu'une chute de pression (p_g) dans le système engendre une diminution du gaz en solution. Quant à $H(T)$, elle diminue avec l'augmentation de la température, donc la solubilité du gaz aussi. Et si la solubilité du gaz dans la phase aqueuse diminue, il y a apparition de bulles.

Avec le montage expérimental, le liquide d'injection passe de la température pièce, environ 20 °C aux pompes-seringues, à 37 °C dans l'incubateur du microscope. Cette augmentation de température est alors source de bulles. Par conséquent, il est primordial de dégazer au maximum les liquides d'injection afin d'éviter qu'il y ait suffisamment de gaz dissous en solution pour former des bulles en aval des canaux. Pour cela, il suffit de chauffer les médias à une température supérieure à 37 °C, 40 °C en l'occurrence, avant de remplir les seringues.

Si dégazer les liquides est crucial, il faut aussi limiter la présence de gaz initialement dissous. La véritable éiphanie dans mon combat contre les bulles a été dans le choix du tampon pH du média cellulaire. La très grande majorité du temps, un tampon bicarbonate (NaHCO_3) est ajouté au média cellulaire afin de maintenir un pH viable. Les cellules sont alors cultivées dans des incubateurs à 5 % CO_2 et le pH est maintenu grâce à l'équilibre chimique suivant :



Cela signifie qu'en dégazant le média initialement à l'équilibre, on retire du CO_2 du système. Ce qui, selon le principe de Le Chatelier, débalance l'équilibre de la réaction et induit la création de nouveau CO_2 ! Il faut donc éviter l'utilisation du tampon bicarbonate pour réussir à dégazer le média efficacement. Afin d'assurer le maintien du pH viable, je me suis plutôt servi du tampon HEPES (*acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique*). Celui-ci est couramment utilisé pour de longues expériences avec des cellules en dehors de l'incubateur à CO_2 .

Finalement, la méthode entreprise à chaque expérience pour éliminer les bulles est : (1) Préchauffer les médias et les seringues à 40 °C pendant 30 minutes minimum. (2) Pré-mouiller tous les canaux à l'éthanol 70 %. (3) Remplir les seringues des médias appropriés et les connecter à l'afficheur microfluidique. (4) Rincer à haut débit (5 μ L/s) pendant 5 min pour rincer l'éthanol et vider l'air du système. Le système est alors prêt à être utilisé.

4.2 Livraison de réactif au noyau cellulaire

Avec les premières expériences de l'afficheur microfluidique réalisées sur des cellules, je voulais démontrer la précision du contrôle spatial et temporel dans l'envoi de réactif aux cellules. Pour cela, j'ai réalisé des expériences de marquage cellulaire avec le fluorophore Hoechst 33258. Celui-ci est un marqueur fluorescent qui se lie à l'ADN et permet donc d'imager les noyaux des cellules. Les expériences de cette section sont donc de courtes expériences qui m'ont permis de caractériser le bon fonctionnement de l'afficheur microfluidique à 6 pétales précédemment conçu.

4.2.1 Méthodologie

La veille de l'expérimentation, les cellules C2C12 sont ensemencées dans des plats de Petri à puces de verre 1.5, préalablement enduits de fibronectine à 5 μ g/mL, pour atteindre une confluence de 90 % à 100 % au moment de l'expérience. Dans ces expériences, le liquide d'injection est constitué de DMEM, sans NaHCO₃, 25 mM HEPES, 2 mg/mL Hoechst 33258. Au moment de l'expérience, le média dans le Petri de cellules est remplacé par du DMEM 25 mM HEPES sans NaHCO₃. Après le marquage, les cellules sont imágées en fluorescence. Les noyaux cellulaires sont ensuite segmentés avec un algorithme Watershed fait sur Matlab. J'ai ensuite extrait les données comme le nombre de cellules par pétale et l'intensité de fluorescence moyenne dans les cellules. Les cellules ou autres débris saturés en fluorescence sont éliminés des analyses.

4.2.2 Précision du contrôle spatial

Dans un premier temps, mon but était de reproduire l'empreinte de l'écoulement sous l'afficheur sur les cellules en utilisant le même temps d'application dans chaque pétale. Pour cela, les 6 pétales ont été ouverts simultanément pendant 20 min. Le résultat est assez direct, comme on peut le voir à la figure 4.3. Cela démontre la précision du contrôle spatial pour l'envoi de réactif aux noyaux cellulaires sous les pétales d'injection de l'afficheur.

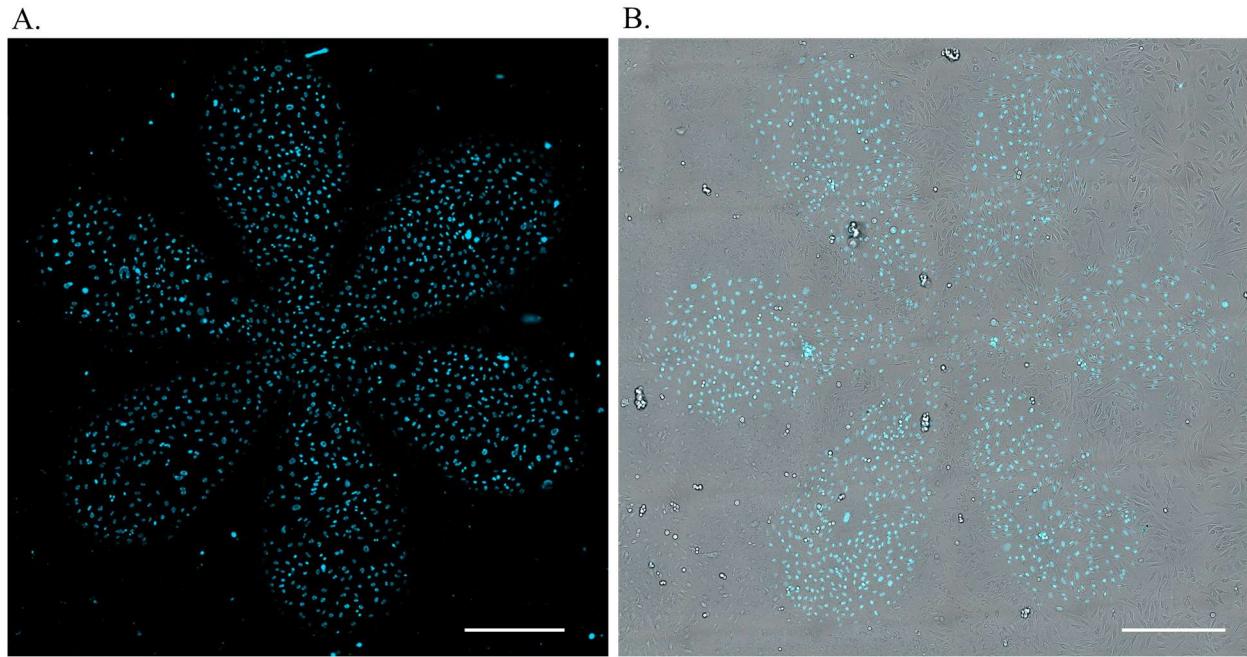


Figure 4.3 Empreintes de l'écoulement sous l'afficheur par marquage des noyaux cellulaires avec Hoechst 33258 à 2 mg/mL. Application 20 min, $q = 0,4 \mu\text{L/s}$ et $\alpha = 1,5$. **(A)** Expérience #1, sans champ clair, nombre de cellules moyen par pétales = 219. **(B)** Expérience #2, avec champ clair pour la visualisation des cellules complètes, nombre de cellules moyen par pétales = 275. Barres d'échelle = 500 μm .

4.2.3 Contrôle dose inter-pétales

Expérimentalement, il est courant d'observer quelques différences entre les pétales. Certains sont parfois un peu plus gros ou plus petits que les autres. Cela est probablement dû à des variations dans les résistances des canaux ou encore à l'installation des seringues. Toutefois, on voudra réaliser une expérience en biologie avec l'afficheur microfluidique et pouvoir comparer les 6 différentes conditions testées entre elles avec la certitude qu'aucun biais, mécanique ou autre, ne vienne influencer les résultats. On peut s'assurer que les 6 différentes conditions peuvent être comparées entre elles, s'il n'y a pas de différence au niveau des cellules après une expérience où les six pétales envoient la même dose. Ainsi, pour réaliser ce contrôle, j'ai appliqué encore une fois la même condition à chaque pétales, soit du DMEM à 2 mg/mL Hoechst pendant 20 min (voir Figure 4.4 A, B). Pour cette expérience, j'ai ensuite regardé les différences entre l'intensité de fluorescence des cellules de chaque pétales en effectuant un simple test de Student entre chaque paire de pétales (voir Figure 4.4 C). L'idée était de vérifier rapidement s'il existait une variabilité entre certains

pétales. Comme on constate, c'est bel et bien le cas entre le pétales 1 et 6, puis le pétales 3 et 6. Cela peut s'expliquer entre autres par la variabilité intrinsèque du marquage au fluorophore Hoechst. Pour vérifier cela, j'ai comparé la variabilité dans le marquage avec l'afficheur et une expérience de marquage contrôle sans l'afficheur (voir Figure 4.4 D). L'expérience de marquage a été réalisée trois fois afin d'obtenir un triplicata de données, soit 6 pétales par expérience pour un total de 18 pétales. Un triplicata a aussi été recueilli pour le contrôle. Comme on constate à la figure 4.4 D), la variance des deux distributions ne sont pas statistiquement distinctes. On conclut alors que les cellules traitées sous des pétales différents peuvent être comparés sur de mêmes bases. Plus précisément, en conditions d'utilisation normales, l'afficheur microfluidique n'induit pas de biais de variabilité entre les différents pétales.

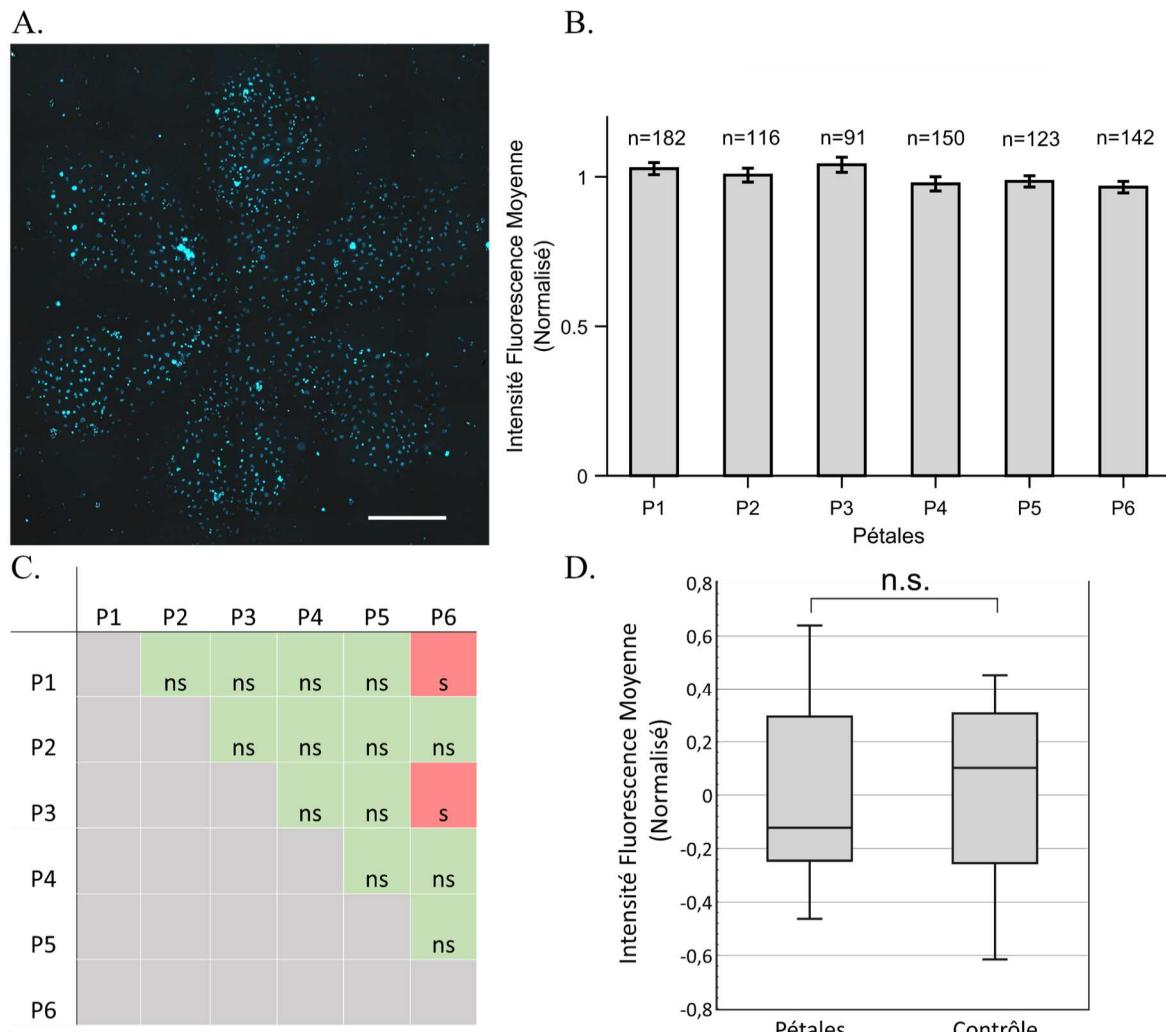


Figure 4.4 Contrôle de vérification de dose inter-pétales. (A) Empreinte laissée par l'afficheur microfluidique par l'application de 2 µg/mL Hoechst 22358 pendant 20 min à 0,4 µL/s et $\alpha = 1,3$,

Barre d'échelle = 500 µm, contraste et luminosité ajustée pour visualisation. **(B)** Intensité de fluorescence moyenne de n cellules selon chaque pétales pour l'expérience montrée en A), données normalisées par la moyenne d'intensité des six pétales, les barres d'erreur représentent l'erreur type. **(C)** Résultats du test de comparaison des moyennes des échantillons (T-student à seuil 5 %) entre chaque pétales de l'expérience montrée en A). Différence Non-Significative (ns) ou Significative (s). **(D)** Distributions normalisées par la moyenne des valeurs d'intensité de fluorescence des cellules dans les pétales (triplicata; 6 pétales par expérience). La normalisation effectuée ($I' = \frac{I - \langle I \rangle}{\max(I) - \min(I)}$) permet de normaliser les limites de chaque distribution autour de 0 afin de pouvoir inclure les données des 3 expériences différentes dans le même groupe de données et ainsi augmenter la taille de l'échantillon (18 pétales au total). Centrer autour de 0 permet également une meilleure visualisation de la variance (l'écart de la moyenne). Contrôle : distribution normalisée par la moyenne des valeurs d'intensité de fluorescence moyenne de 18 zones aléatoires de taille semblable, prise dans 3 cultures cellulaires à traitement uniforme. **n.s.** : Aucune différence statistiquement significative entre les variances (Test de Fischer d'égalité de deux variances: p-value = 0,9642).

4.2.4 Livraison de réactif en fréquence

Finalement, j'ai appliqué les mêmes méthodologies de marquage Hoechst que précédemment, mais cette fois-ci avec des fréquences d'application de réactif différentes dans chaque pétales. En vérité, la même fréquence est utilisée dans les 6 pétales (1 pulse au 3 min), mais avec des rapports cycliques (RC) qui varient entre 100 % pour le pétales 1 et 16,67 % pour le pétales 6, par bonds de 1/6 entre chaque (voir Figure 4.5 A). Chaque rapport cyclique correspond donc à une livraison de dose différente et on s'attend à ce que l'intensité de fluorescence des noyaux cellulaires soit proportionnelle à la dose. C'est ce qu'on constate à la figure 4.5 ci-dessous (voir également Annexe B.1).

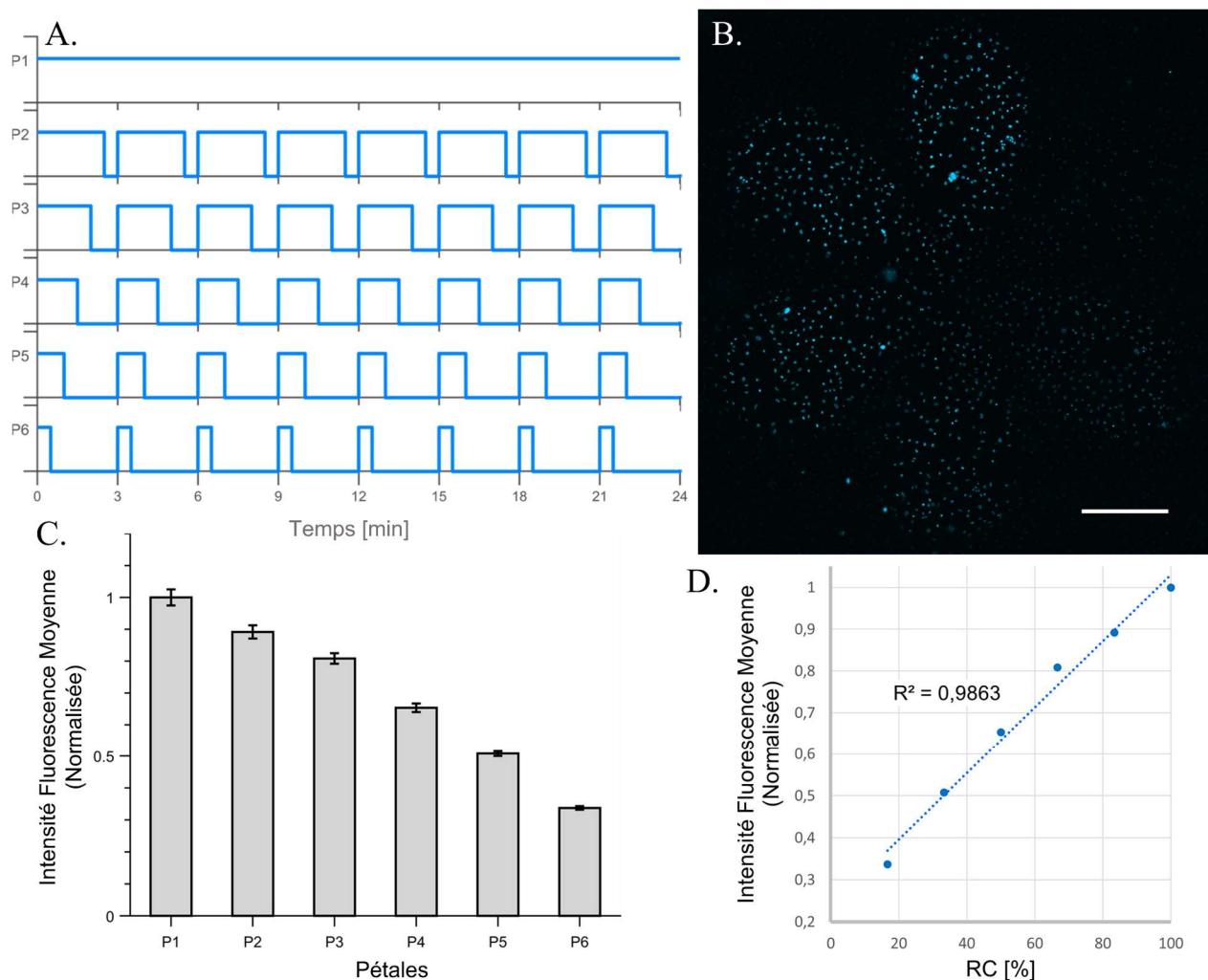


Figure 4.5 Livraison fréquentielle de doses de marqueur fluorophore Hoechst selon différents rapports cycliques. (A) Fréquences appliquées à chacun des pétales pendant l'expérience. (B) Visualisation des cellules marquées à différentes intensités, nombre de cellules moyen par pétale = 168 ± 21 . (C) Intensité de fluorescence moyenne dans les cellules de chaque pétale, les barres d'erreur représentent l'erreur type. (D) L'intensité de fluorescence moyenne est proportionnelle au rapport cyclique, donc à la dose reçue en fréquence, tendance linéaire : $I = 0,0079RC + 0,2377$.

4.3 Viabilité cellulaire

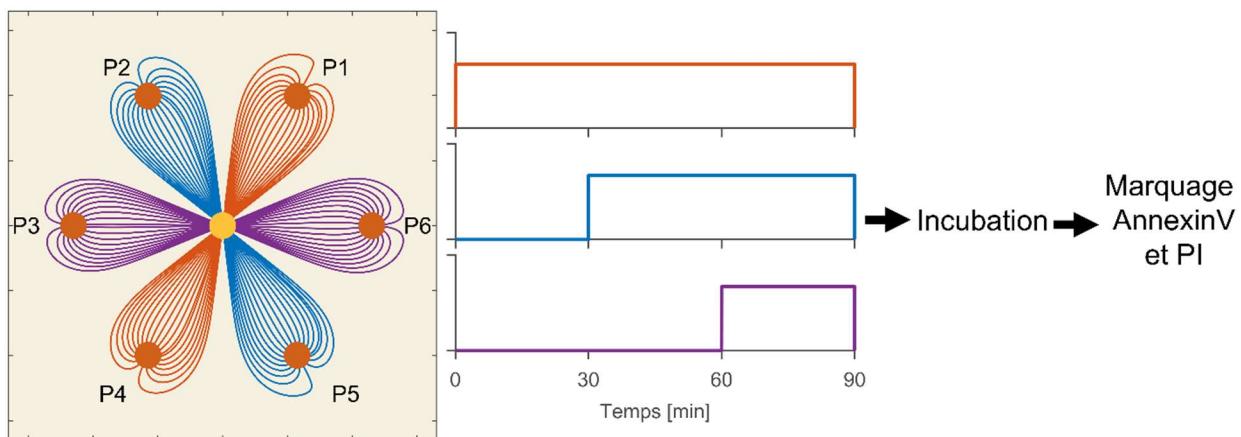
Dans un deuxième temps, j'ai voulu m'assurer que l'utilisation de l'afficheur microfluidique n'engendrait pas un stress et une mortalité surélevée dans la population de cellules étudiées. Comme mentionné au chapitre 3, l'afficheur microfluidique fait subir un stress de cisaillement aux cellules. Bien que considéré dans la théorie du design, il est important de vérifier si le cisaillement

a un impact sur la viabilité des cellules. Les tests de viabilité permettent aussi de valider le bon fonctionnement des protocoles expérimentaux.

4.3.1 Méthodologie

Afin de vérifier l'impact du cisaillement et des protocoles expérimentaux sur la viabilité cellulaire, l'idée est de soumettre les cellules à différents débits d'injection et à différents temps, puis d'effectuer un marquage pour visualiser les cellules mortes et apoptotiques (voir figure 4.4). Les cellules mortes sont détectées avec de l'iodure de propidium (« PI » de *Propidium Iodide*), qui se lie à l'ADN et marque les noyaux des cellules mortes. Afin de détecter les cellules apoptotiques, il est intéressant dans le cas présent de regarder l'apoptose précoce pour voir l'effet immédiat de l'utilisation de l'afficheur sur les cellules. J'ai donc opté pour un marquage par AnnexinV-FITC. Dans les premiers instants suivant l'initiation de l'apoptose, et ce, peu importe la cause du déclenchement de celle-ci, la cellule externalise la phosphatidylsérine (PS). Celle-ci étant initialement sur la surface interne de la membrane cellulaire, elle se retrouve sur la membrane externe. La protéine annexine V se lie avec une forte affinité aux PS, et en la conjuguant avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), on peut ainsi détecter les cellules en apoptose précoce par microscopie de fluorescence [107].

Encore une fois, la veille de l'expérimentation, les cellules C2C12 sont ensemencées dans des plats de Petri à puits de verre 1.5, préalablement enduits de fibronectine à 5 µg/mL, pour atteindre une confluence de 80 % à 90 % au moment de l'expérience. Dans ces expériences, le liquide d'injection est constitué de DMEM, sans NaHCO₃, 25 mM HEPES, 0,5 mg/mL Hoechst 33258 (afin de visualiser les cellules traitées lors de l'imagerie). Au moment de l'expérience, le média dans le Petri de cellules est remplacé par du DMEM 25 mM HEPES sans NaHCO₃. Le débit q est fixé, 0,5 µL/s pour la première expérience et 1 µL/s pour la seconde, et $\alpha = 1,5$. À la fin des activations, soit après 90 min, les cellules sont incubées pour 45 min à 37 °C. Les cellules sont marquées pour 15 min avec une solution de PI à 10 µg/mL et d'AnnexinV-FITC à raison de 20 µL de solution AnnexinV pour 100 µL de solution tampon. Finalement, les cellules sont imagées en microscopie de fluorescence, segmentées et comptées afin de calculer la viabilité cellulaire avec : nCellules vivantes/nCellules totales, où les cellules considérées vivantes ne sont ni mortes ni apoptotiques.



4.3.2 Résultats

L'analyse des images prises en fluorescence nous renseigne sur la viabilité cellulaire. On retrouve donc les cellules mortes en observant celles qui ont le noyau marqué par PI (canal rouge) et les cellules apoptotiques sont celles qui ont la membrane cellulaire marquée par AnnexinV-FITC (canal vert) (voir Figure 4.7).

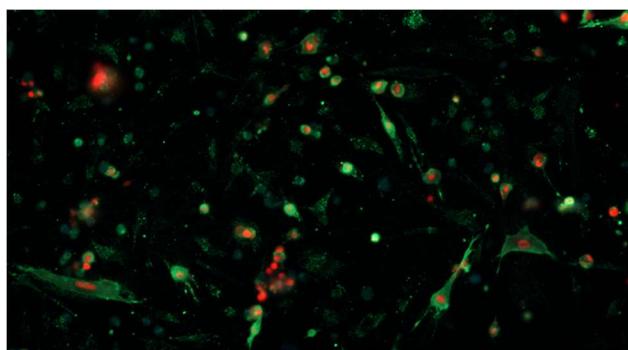


Figure 4.7 Visualisation des cellules C2C12 mortes et apoptotiques dans un contrôle positif.

Cellules incubées pendant 1 h 30 dans du DMEM à 5 % éthanol (méthodologie d'induction de

l'apoptose tirée de [107]). Le contrôle positif a permis d'ajuster les concentrations d'AnnexinV et PI pour optimiser le marquage des cellules.

Ensuite, les cellules qui étaient sous les pétales sont marquées par Hoechst 33258. Les cellules dans les pétales symétriques ayant l'intensité Hoechst (canal bleu) la plus élevée correspondent donc au temps d'application de 90 min et l'intensité la plus faible au temps d'application de 30 min (voir Figure 4.8). Un duplicata d'expérience a été réalisé pour chaque débit d'injection étudié. La figure 4.8 présente un exemple de résultat pour chaque cas, juxtaposé au cisaillement théorique sous l'afficheur lorsque tous les pétales sont ouverts. Les résultats de la segmentation des cellules dans chaque pétale et le comptage des cellules viables est présenté à la figure 4.9.

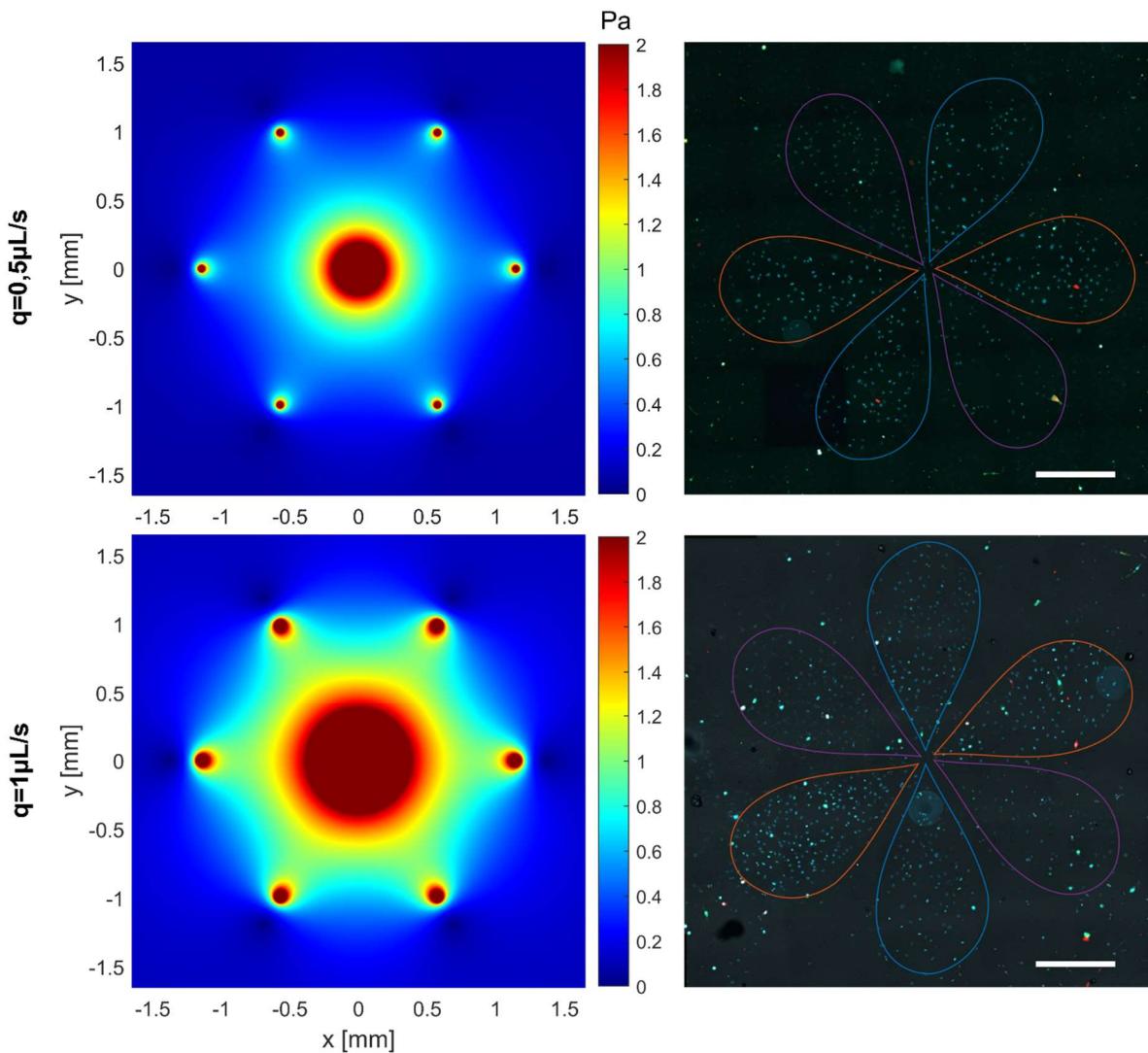


Figure 4.8 Résultats d'expériences de vérification de la viabilité cellulaire pour des débits d'injection de $0,5 \mu\text{L/s}$ et $1 \mu\text{L/s}$. Pour chaque cas, on a : À gauche, la carte du niveau de

cisaillement théorique sous l'afficheur (rappel : $G = 100 \mu\text{m}$ et $r = 1,15 \text{ mm}$) lorsque les six pétales sont ouverts, avec $\alpha = 1,5$. À droite, les cellules sous l'afficheur imagées en fluorescence après le 90 min d'expérience, les duplicates de pétales sont mis en évidence; 90 min (orange), 60 min (bleu) et 30 min (violet). Barres d'échelle = 500 μm .

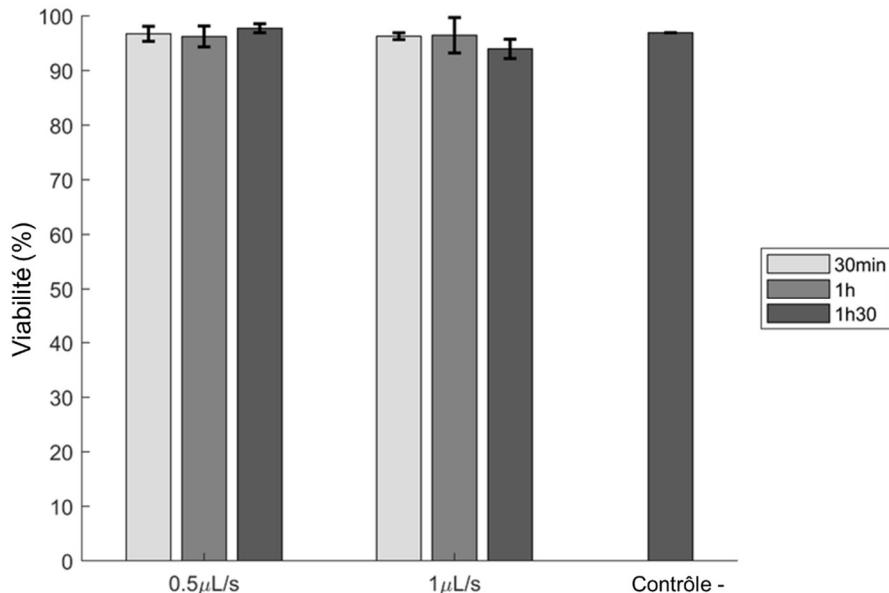


Figure 4.9 Viabilité cellulaire expérimentale. Mesurée pour des débits d'injection de 0,5 $\mu\text{L/s}$ et 1 $\mu\text{L/s}$ et pour 3 différents temps d'injection, avec $\alpha = 1,5$. Pour le contrôle négatif, les cellules sont restées 1h30 dans l'incubateur du microscope sans contact avec l'afficheur microfluidique. Les barres d'erreur représentent l'écart-type du résultat de 2 expériences (duplicata).

On constate finalement que la viabilité (nCellules vivantes/nCellules totales) est maintenue à environ 97 % dans tous les cas, ce qui est comparable au niveau de mortalité normal dans la population de cellules étudiées au microscope. En effet, la viabilité dans le contrôle négatif est de 96,93 %. On observe cependant une diminution de la viabilité à 93,95 % pour le débit d'injection de 1 $\mu\text{L/s}$ pendant 1 h 30. Or, comme discuté au chapitre 3, un débit d'environ $q = 0,5 \mu\text{L/s}$ sera utilisé pour les expériences avec l'afficheur conçu. J'ai par ailleurs constaté expérimentalement, que la combinaison $q = 0,4 \mu\text{L/s}$ et $\alpha = 1,3$ fonctionnait très bien et permettait d'élargir avantageusement les pétales. Le stress causé par l'afficheur sur les cellules et le cisaillement ne devrait donc pas être un problème (petit débit q et faible α). Ces expériences démontrent ainsi que mes protocoles d'utilisation de l'afficheur sur les cellules n'affectaient pas leur viabilité.

CHAPITRE 5 ÉTUDE DE LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH

À la suite de la conception et de la validation de l'afficheur microfluidique en culture cellulaire, j'ai voulu démontrer l'utilisation du dispositif pour activer et étudier la dynamique de signalisation cellulaire. Pour fins de preuve de concept, la voie Notch a été sélectionnée comme objet d'étude en raison de son ubiquité et de son importance dans les processus développementaux et homéostatiques [11], [12]. Également, étant donné que sa réponse en fréquence a déjà été investiguée [13], [51], j'ai pu comparer mes résultats avec la littérature, tout en cherchant à approfondir les connaissances sur la dynamique de la voie. Dans le présent chapitre, j'exposerai ainsi les résultats relatifs à mes expériences d'activation fréquentielle de la voie Notch. D'abord, je montrerai la validation du système pour activer avec succès le récepteur Notch, puis je présenterai comment le dispositif peut être utilisé pour quantifier la réponse en fréquence de la voie Notch.

5.1 Activation de la voie Notch avec l'afficheur microfluidique

Dans un premier temps, il fallait démontrer qu'il était bel et bien possible d'utiliser l'afficheur microfluidique conçu pour activer la voie Notch dans des cellules mammifères, et ce, avec différentes fréquences ou différents temps d'activation. L'objectif de cette première expérience était donc de vérifier la capacité du système à transmettre un signal dynamique d'activation chimique au récepteur Notch1 chez les cellules étudiées, tout en montrant le potentiel de l'afficheur microfluidique pour l'analyse simultanée de plusieurs conditions.

5.1.1 Méthodologie

Afin de vérifier l'activation de Notch, j'ai eu recours à des cellules CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary K1 cells*) génétiquement modifiées pour exprimer le domaine extracellulaire du récepteur Notch1 (« ECD » de *Extracellular Domain*), mais avec le facteur de transcription Gal4 en remplacement du NICD, lignée cellulaire gracieuseté de Pr. Michael Elowitz (California Institute of Technology) (voir Figure 5.1). Des séquences UAS (*Upstream Activation Sequence*) reconnues par Gal4 sont aussi intégrées dans le génome de cette lignée cellulaire, suivies du gène rapporteur Citrine (protéine fluorescente jaune). Lorsque l'activation du récepteur Notch1 relâche la protéine Gal4, celle-ci migre vers le noyau et se lie au segment UAS. Cela active alors l'expression du gène

rapporteur H2B-3xCitrine et on peut ainsi suivre l'activation de la voie Notch par imagerie de microscopie de fluorescence en temps réel.

Il a été démontré à plusieurs reprises dans la littérature qu'une solution d'éthylène diamine tétracétique (EDTA) pouvait induire l'activation du récepteur Notch, et ce, au même niveau que son ligand naturel (Dll1 par exemple) [108]–[110]. En effet, l'interaction entre le ECD du récepteur Notch et le NICD est non-covalente et est stabilisée par la présence d'ions Ca^{2+} . En l'absence de calcium et en présence de EDTA, la liaison est perturbée et le NICD du récepteur est effectivement relâché dans la cellule. Ainsi, traiter des cellules pendant 15 min avec une solution EDTA allant de 0,5 mM à 10 mM a permis d'activer efficacement la voie Notch [108]. En optant pour cette approche pour la présente expérience, on pouvait alors d'un même coup activer la voie Notch avec l'afficheur microfluidique et comparer les résultats obtenus avec ceux dans la littérature.

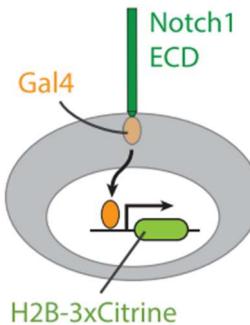


Figure 5.1 Représentation de la lignée cellulaire NECD-GAL4 utilisée. Figure reproduite de [13] dans le cadre de la licence CC BY-NC-ND 4.0.

Cette expérience consistait à stimuler la voie Notch dans les cellules CHO en utilisant six différents temps d'activation, soit un par pétalement, et ensuite à imager les cellules en fluorescence sous les zones d'activation pendant plusieurs heures. Les cellules NECD-GAL4 ont d'abord été cultivées dans du média cellulaire F-12k, 10 % FBS et avec les antibiotiques de restrictions appropriés; 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin et 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Geneticin. La veille de l'expérimentation, les cellules ont été ensemencées dans des plats de Petri à puits de verre 1.5, préalablement enduits de fibronectine à 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pour atteindre une confluence d'environ 70 % au moment de l'expérience et pour empêcher que l'activation Notch causée par la trypsinisation au moment du transfert des cellules ne biaise les résultats. Au moment de l'expérience, le média cellulaire est remplacé par le média d'imagerie (F-12k 25 mM HEPES sans NaHCO_3 , 1% Pen/Strep). Notons que le média F-12K contient initialement dans sa formule 1 mM de calcium, ce qui stabilise les récepteurs Notch. Le fluide

d'injection/d'activation est quant à lui composé de PBS à 10 mM EDTA, 25 mM HEPES, 0.1 µg/mL fluorescéine (pour la visualisation de l'écoulement en temps réel), 1 % Pen/Strep. Les paramètres de l'afficheur ont été fixés à $q = 0,4 \mu\text{L/s}$ et $\alpha = 1,3$. Les temps d'activation ont été choisis en tenant compte des précédents résultats trouvés dans la littérature. Ainsi, les six temps sont 20 min, 15 min, 10 min, 5 min, 2 min et 1 min. Pendant l'expérience, les positions d'imagerie du microscope sous chacun des pétales ont été enregistrées. Les pulses d'activation sont synchronisés pour terminer en même temps afin de synchroniser la visualisation de l'activation Notch post-activation (voir Figure 5.2). Immédiatement après, l'afficheur est retiré et le média des cellules est changé pour du nouveau média d'imagerie (F-12k 25 mM HEPES sans NaHCO_3 , 1 % Pen/Strep). Le calcium présent dans le média vient restabiliser les récepteurs Notch. Les cellules ont été imagées pendant 8 h suivant l'activation, une image aux 20 minutes. J'ai ensuite réalisé un script Matlab pour le traitement des images (segmentation et suivi des cellules).

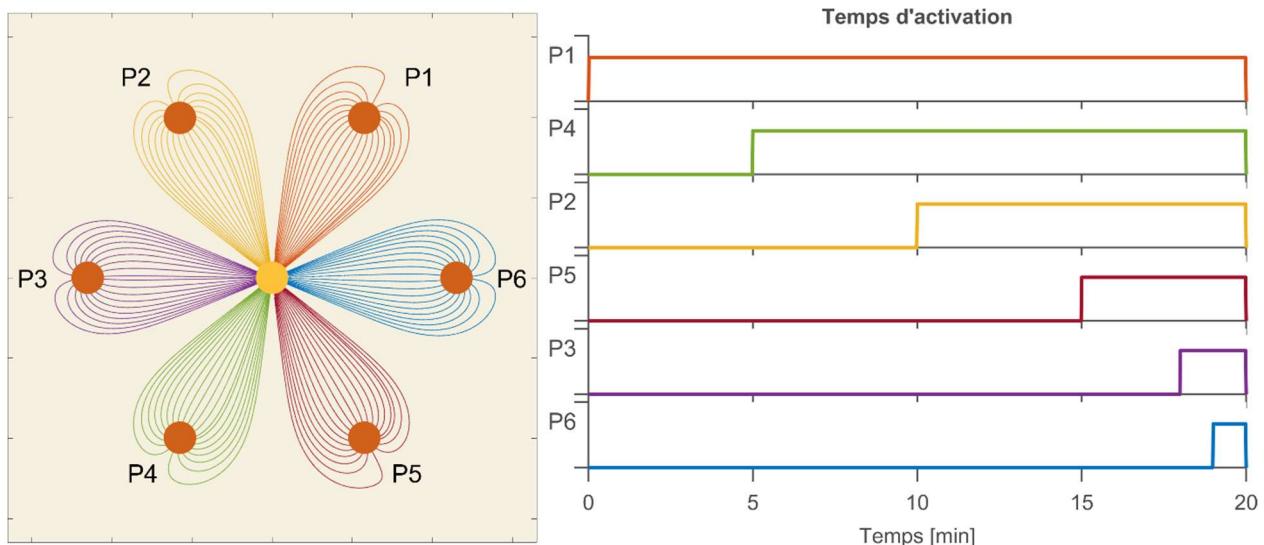


Figure 5.2 Plan des temps d'injection pour l'expérience d'activation Notch par 10 mM EDTA.
 L'attribution des conditions aux pétales est encore une fois faite dans un souci de symétrie radiale. La fin des activations à $T = 20$ min correspond au début de l'imagerie des cellules en fluorescence (temps 0 à la figure 5.3 et 5.4).

5.1.2 Résultats

L'analyse des résultats repose sur le modèle cinétique du système Notch1-Gal4-Citrine développé précédemment [13]. On sait que la quantité de fluorescence totale dans les cellules est contrôlée par la concentration de Gal4 clivés. Le taux d'augmentation de la fluorescence, ou l'activité du promoteur Gal4, est alors définie par $d\text{Citrine}/dt$. Avec le modèle mathématique qu'ils ont développé, Nandagopal et al. ont calculé un temps de demi-vie de Gal4 d'environ 4 h et un temps de demi-vie de l'ARNm H2B-3xCitrine d'environ 3,4 h [13]. Selon ce modèle, des pulses d'activation en dessous de 1 h ne produisent pas de différence dans la dynamique du gène rapporteur (par exemple dans le temps de montée). De plus, la période d'imagerie de 8h ne permet malheureusement pas de voir la décroissance de fluorescence causée par les pulses d'activation finis. Ainsi, pour la présente expérience d'activation Notch, on constatera principalement les différences d'amplitude dans l'intensité de fluorescence des différents pétales d'activation, où un plus long temps d'activation engendrera une production totale de citrine plus grande. La figure 5.3 montre les résultats d'imagerie en temps réel pour quelques cellules sous chaque pétale d'activation. Afin de constater plus précisément le comportement du gène rapporteur citrine dans chaque condition testée, les traces fluorescentes des cellules ont été calculées. Afin de faciliter les analyses, les cellules ont été segmentées et leur intensité de fluorescence mesurée une fois par heure. Ensuite, afin d'obtenir l'information sur la vitesse de l'augmentation de fluorescence, la dérivée ($d\text{Citrine}/dt$) a été calculée numériquement (voir Figure 5.4).

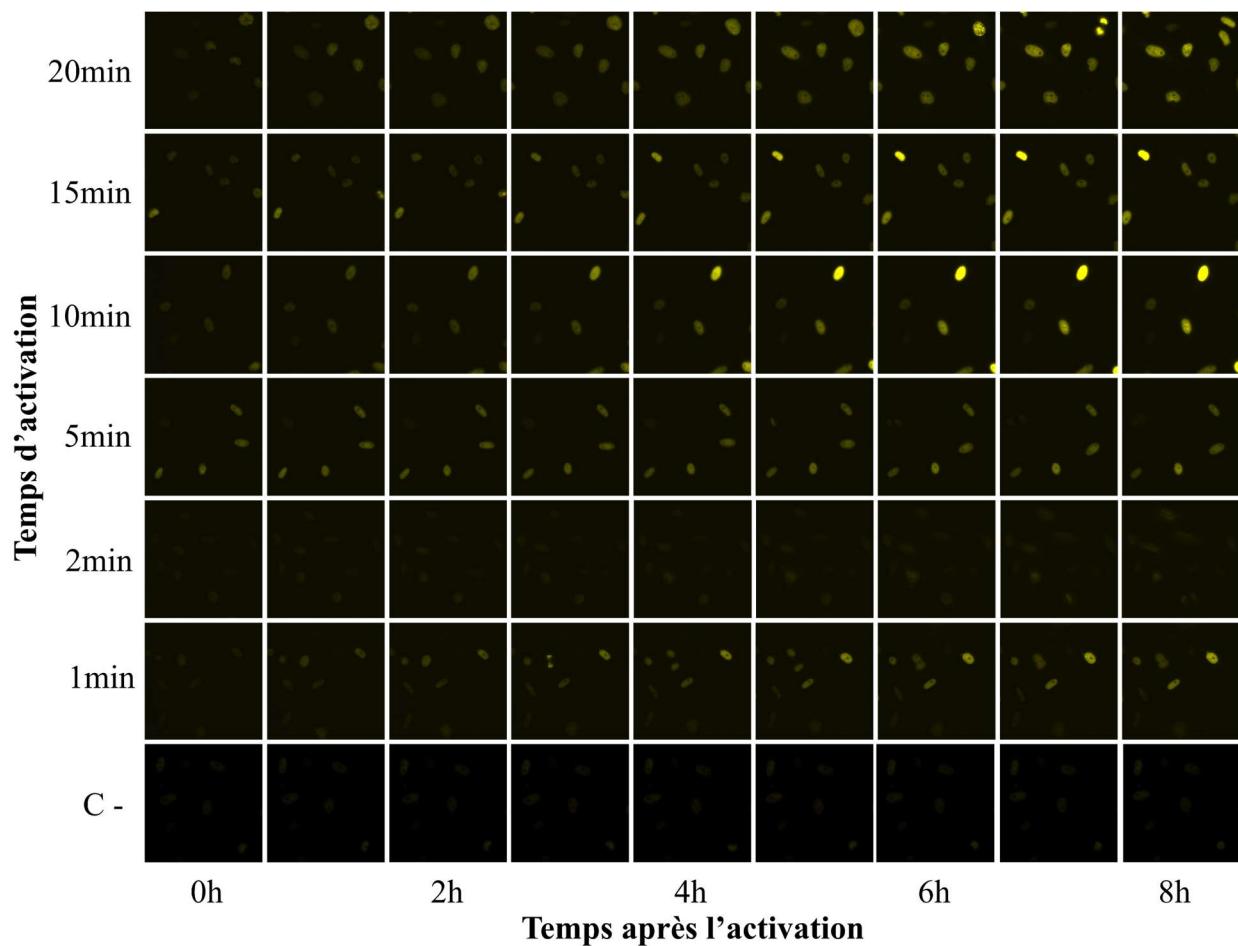
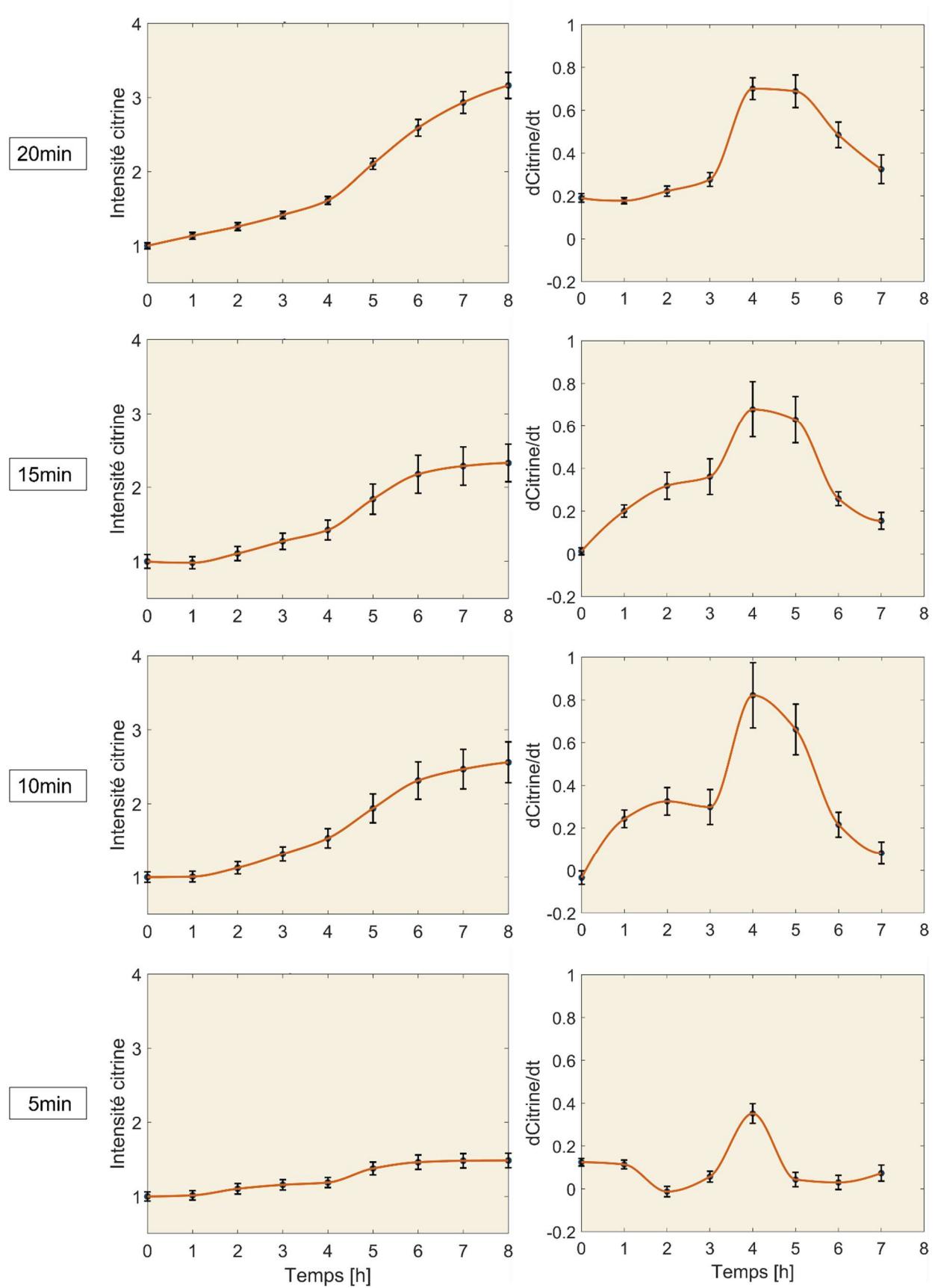


Figure 5.3 Résultats d'imagerie de fluorescence en temps réel suivant l'expérience d'activation Notch par EDTA. Quelques cellules sont montrées pour chaque durée d'activation par 10 mM EDTA. L'intensité de fluorescence (en jaune) représente la concentration de citrine dans le noyau des cellules, « C- » est le contrôle négatif où il n'y a eu aucune activation EDTA, les activations étaient toutes arrêtées simultanément à 0 h et une image par heure est présentée.



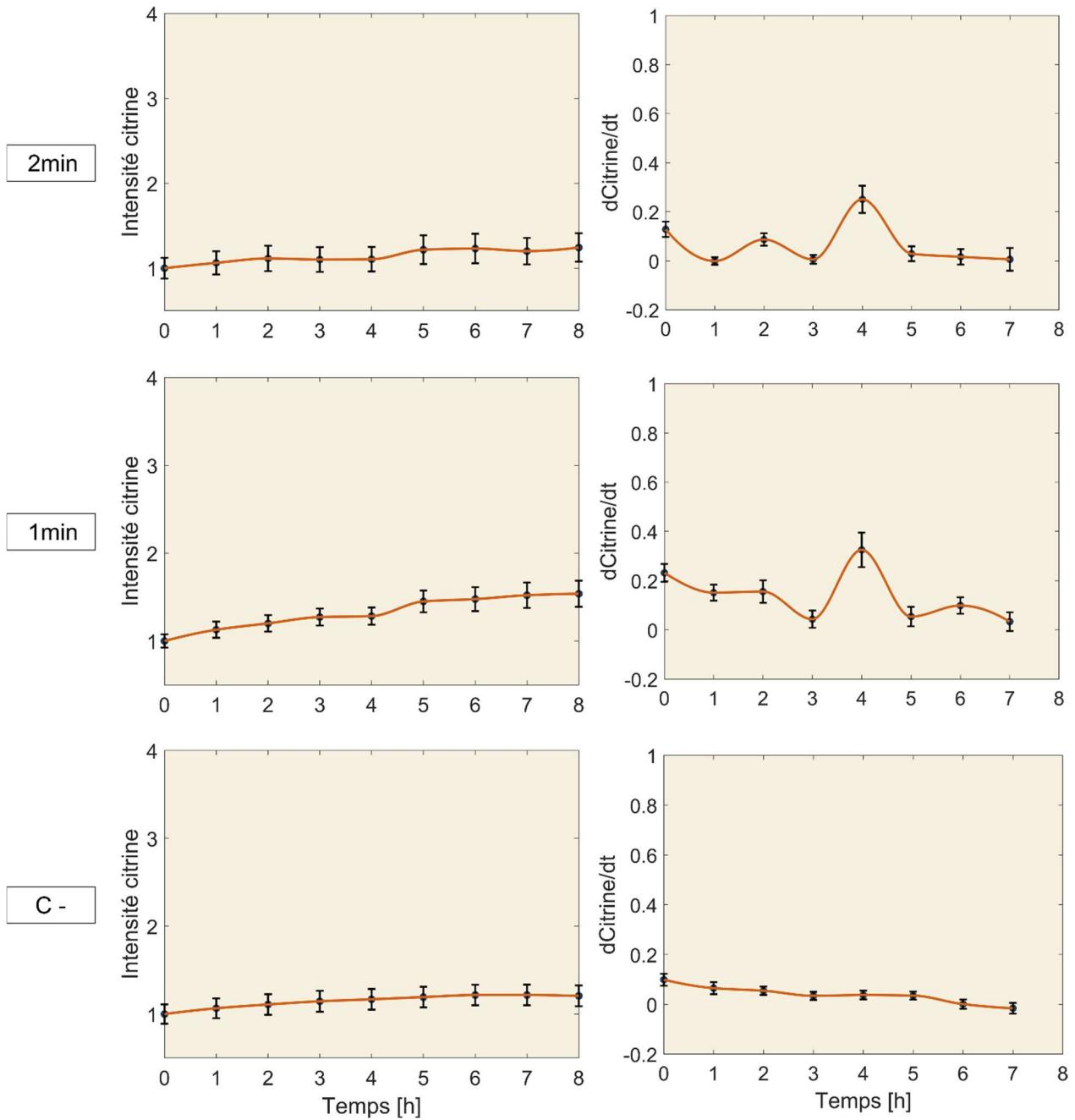


Figure 5.4 Mesure du gène rapporteur citrine suivant l'expérience d'activation Notch par EDTA. Pour chaque temps d'activation; À gauche, traces d'intensité de fluorescence totale, À droite, taux d'augmentation de fluorescence totale. « C - » est le contrôle négatif. Les courbes d'intensité sont normalisées par leur valeur initiale pour mettre en évidence l'augmentation de fluorescence totale (I/I_0). Les courbes du taux d'augmentation sont obtenues à partir des traces

d'intensité brutes et normalisées avec la valeur maximale entre toutes les conditions. Les barres d'erreur représentent l'erreur type sur $n = 20$ cellules par condition.

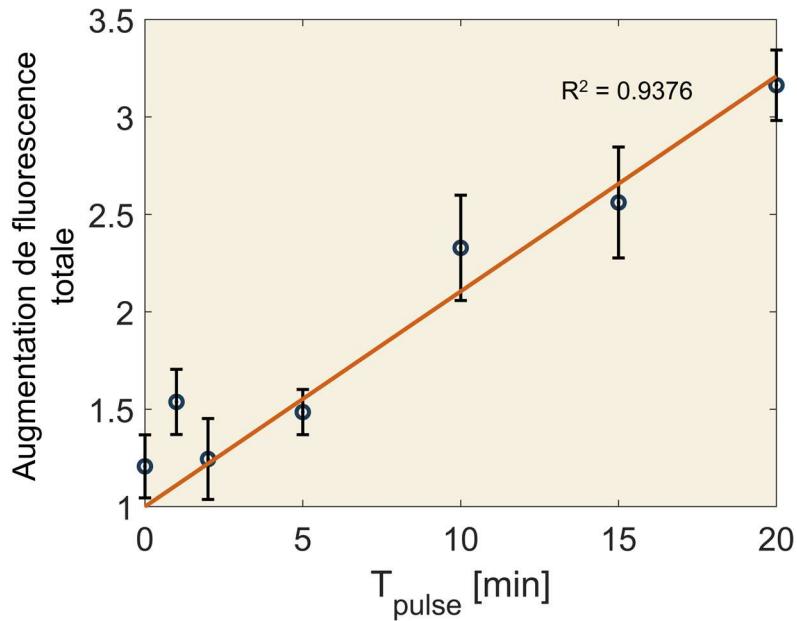


Figure 5.5 Taux d'augmentation de fluorescence selon le temps d'activation de la voie Notch (*fold change* : $I_f - I_0$). Les barres d'erreur représentent la propagation de l'erreur type sur la soustraction $I_f - I_0$.

Comme prévu, on observe une augmentation de fluorescence dans le temps suivant les pulses d'activation. De plus, la plus grande augmentation de fluorescence (*fold change*) est observée pour le temps d'activation de 20 min et l'augmentation de fluorescence totale semble être proportionnelle au temps du pulse d'activation (voir Figure 5.5).

On peut également constater l'activation de la voie Notch par l'analyse des courbes de vitesse. Celles-ci présentent toutes une augmentation du taux de fluorescence entre 4 et 5 heures, excepté celle du contrôle négatif. Cela montre donc qu'il y a eu une réponse à l'activation pour chaque condition, bien que minimale pour les temps d'activation en dessous de 5 min. Le délai précédent cette rapide augmentation correspondrait probablement au temps requis pour la transcription de l'ARNm citrine, la traduction et sa maturation en protéine fluorescente. Ces résultats se rapprochent de ceux attendus par le modèle cinétique développé par Nandagopal et al. En effet, en simulant la réponse du système Gal4 à une activation de 15 min, ils avaient trouvé un temps de montée, soit le temps pour passer de 10 % à 90 % de la valeur maximale du pic de l'activité du promoteur, d'environ 6 h, ainsi qu'un temps de montée d'environ 5,5 h pour une activation de 5

min. Par ailleurs, mes données de fluorescence auraient aussi bénéficié d'une moins grande intensité d'activation et d'un plus faible temps d'exposition; plusieurs cellules sous les pétales d'activation 20, 15 et 10 min ont saturé en intensité de fluorescence dans les dernières heures d'imagerie (voir Figure 5.3). Également, prendre des mesures d'intensité 2x par heure au lieu de 1x par heure permettrait d'augmenter la précision du taux d'augmentation. D'autres expériences du même genre pourraient donc venir répondre à ces questions.

Au final, les résultats de cette expérience démontrent qu'une activation par écoulement de l'afficheur microfluidique supérieure à 10 min permet d'activer Notch minimalement au double de son niveau basal (voir Figure 5.5). L'afficheur microfluidique a donc été utilisé avec succès pour activer une voie de signalisation cellulaire et tester plusieurs conditions simultanément dans le même puits de cellules.

5.2 Quantification de la réponse en fréquence de la voie Notch

Dans un deuxième temps, j'ai voulu concrètement appliquer la technologie des afficheurs microfluidiques à l'étude de la dynamique de la voie Notch. Pour cela, l'idée était de se servir de l'afficheur microfluidique pour envoyer différentes fréquences d'activation à la voie Notch, puis d'étudier la réponse des cellules au niveau des gènes en quantifiant les ARNm des gènes d'intérêt dont l'expression est ciblée par le NICD (Hes1 et Hey1, voir section 2.3.2). Le but de cette section était principalement de réaliser une preuve de concept et de montrer le bon fonctionnement des protocoles qui permettront d'éventuellement étudier plus en détails la réponse en fréquence de la voie Notch et comprendre comment la dynamique du NICD agit sur le destin cellulaire.

5.2.1 Méthodologie

Pour ces expérimentations, une lignée cellulaire C2C12 exprimant un récepteur Notch1 tronqué a été utilisée, lignée qui est également une gracieuseté de Pr. Michael Elowitz (California Institute of Technology). Dans ces cellules, le ECD du récepteur Notch1 est tronqué (Δ ECD), le rendant ainsi constitutivement actif. Afin d'inhiber le relâchement du NICD, soit l'activation du récepteur, il suffit d'ajouter en solution un inhibiteur de la γ -secretase, en l'occurrence le DAPT (*N*-[2S-(3,5-difluorophenyl)acetyl]-L-alanyl-2-phenyl-1,1-dimethylethyl ester-glycine) (voir Figure 5.6 A). Ainsi, pour contrôler l'activation temporelle de la voie Notch dans les cellules, l'idée était de maintenir les cellules dans un média environnant contenant du DAPT pour inhiber Notch, puis

d'envoyer des pulses d'activation « anti-DAPT », c'est-à-dire d'injecter du média sans DAPT, afin de retirer localement l'inhibiteur DAPT dans les pétales de l'afficheur et ainsi activer la voie Notch des cellules sous la fleur. Ce système permet de tester directement l'effet de la dynamique du NICD sur l'expression des gènes. En effet, le NICD a un court temps de demi-vie, ce qui permet de faire varier sa concentration au noyau rapidement en contrôlant l'activation de Notch [13].

Suivant l'activation, il faut ensuite quantifier l'expression des gènes d'intérêt. Pour cela, la méthode conventionnelle serait de procéder par RT-qPCR (*Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction*). Or, ce n'est pas possible dans le cas des expériences avec l'afficheur, puisque toutes les conditions testées se retrouvent dans le même puits. Une alternative permettant de quantifier les gènes en microscopie est l'hybridation *in situ* en fluorescence (« FISH » pour *Fluorescence in Situ Hybridization*). Il s'agit d'une méthode classique utilisant des sondes fluorescentes qui se lient spécifiquement aux séquences d'ARN d'intérêt. Dans la dernière décennie, cette méthode a été grandement améliorée pour une détection plus précise, multiplexée et quantitative des ARN, et ce, grâce à l'ajout au protocole de la réaction en chaîne d'hybridation (« HCR » de *Hybridization Chain Reaction*) [111]–[113]. Lors d'une HCR, des boucles d'ADN stables en solution (2 au minimum) s'assemblent en cascade par complémentarité uniquement lors de l'ajout d'un brin d'ADN initiateur [114]. Dans le cas de HCR-FISH, le brin initiateur est la sonde de détection de l'ARN d'intérêt (étape de détection) et la réaction en chaîne d'hybridation est enclenchée lors de l'ajout de deux boucles d'ADN fluorescentes (étape d'amplification) (voir Figure 5.6 B). Ainsi, le procédé HCR-FISH permet de grandement amplifier le signal fluorescent des ARN détectés pour une quantification plus efficace. HCR-FISH est donc la méthode qui a été retenue pour le présent projet, plus précisément le *digital HCR RNA-single molecule FISH* (dHCR RNA-smFISH) qui permet le comptage des molécules d'ARNm individuelles.

Dans cette section, j'ai réalisé deux expériences. D'abord, j'ai validé mes protocoles expérimentaux en tentant de reproduire les résultats publiés sur la dynamique de Notch avec les cellules C2C12-Notch1 Δ ECD [13] (voir sous-section 5.2.2). J'ai donc avant tout réalisé manuellement un contrôle d'activation Notch, c'est-à-dire sans l'afficheur microfluidique. Pour cela, j'ai testé 3 temps d'activation différents : 30 min, 1 h et 4 h, ainsi qu'un contrôle négatif sans activation. La deuxième expérience consistait à activer la voie Notch des cellules en utilisant l'afficheur microfluidique pour envoyer des pulses anti-DAPT à différentes fréquences. Le choix des fréquences sera détaillé dans la prochaine sous-section.

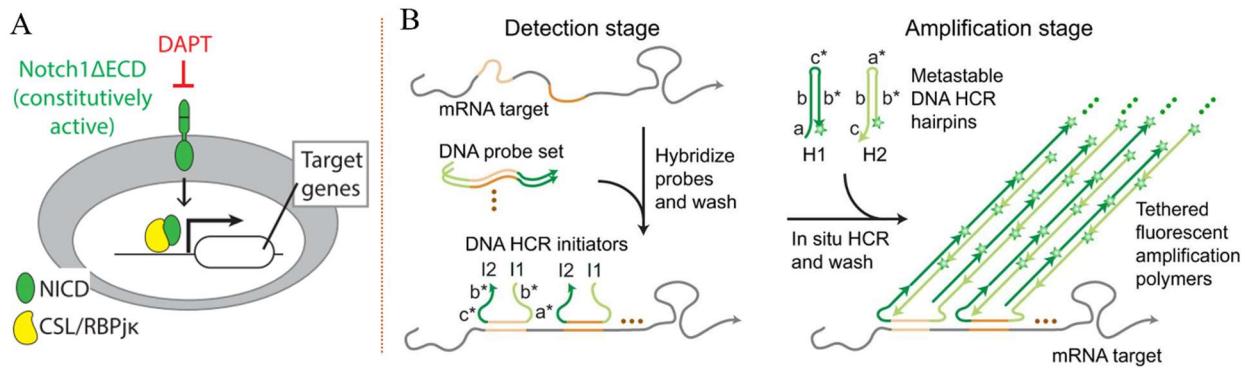


Figure 5.6 Ressources pour l'étude de la voie Notch. (A) Lignée C2C12 avec récepteur Notch1 tronqué, reproduit de [13] dans le cadre de la licence CC BY-NC-ND 4.0. **(B)** Schéma des deux étapes formant le protocole HCR *in situ*, reproduit de [112] avec permission de *Company of Biologists*.

Pour la réalisation de ces expériences, les cellules C2C12-Notch1ΔECD étaient préalablement cultivées dans du DMEM 20 % FBS, 10 μ M DAPT, 300 μ g/mL Hygromycin (antibiotique de restriction). La veille de l'expérimentation, les cellules ont été ensemencées dans des plaques 6-puits à verre 1.5, précédemment enduits de fibronectine à 5 μ g/mL, pour atteindre une confluence d'environ 70 % au moment de l'expérience. Au moment de l'expérience, le média cellulaire est remplacé par le média d'imagerie (DMEM, 2 % FBS, 25 mM HEPES, sans NaHCO₃, 1 % Pen/Strep, 10 μ M DAPT). Le fluide d'injection/d'activation est quant à lui composé de DMEM, 2 % FBS, 25 mM HEPES, sans NaHCO₃, 0,1 μ g/mL fluorescéine (pour la visualisation de l'écoulement en temps réel), 1 % Pen/Strep. Pour l'expérience avec l'afficheur, ses paramètres ont été fixés à $q = 0,4 \mu\text{L/s}$ et $\alpha = 1,3$. Pendant l'expérience, les positions d'imagerie sous chacun des pétales ont été enregistrées. À la fin des activations anti-DAPT, les cellules sont immédiatement rincées et fixées avec une solution de formaldéhyde 4%, puis perméabilisées pendant la nuit dans de l'éthanol 70% à -20 °C. La détection des ARNm des gènes d'intérêt se fait en suivant le protocole pour le dHCR RNA-smFISH de *Molecular Instruments* : « Mammalian Cells on a Slide ». Les cellules ont finalement été imagées à 63X par empilement de mises au point (z-stack) afin de pouvoir compter toutes les molécules d'ARNm dans les cellules.

5.2.2 Résultats escomptés

Cette série d'expérimentation se base également sur les précédentes découvertes de la dynamique de la voie Notch faites par le laboratoire de Pr. Michael Elowitz [13]. Comme mentionné au chapitre 2, ils ont montré dans leurs récents travaux que le ligand Dll1 activait Notch de façon pulsée, tandis que Dll4 activait la voie de façon continue. Pour tester cela, ils ont utilisé les cellules C2C12-Notch1 Δ ECD pour observer directement leur réponse transcriptionnelle selon l'activation. Ils ont notamment identifié deux gènes représentatifs de la différence dans la dynamique d'activation, Hes1 et Hey1. Leurs résultats rapportent que Hes1 est fortement exprimé selon une courte pulsation suivant une activation, peu importe sa durée, tandis que Hey1 est continuellement exprimé et s'accumule dans le temps avec le maintien de l'activation Notch (voir Figure 5.7).

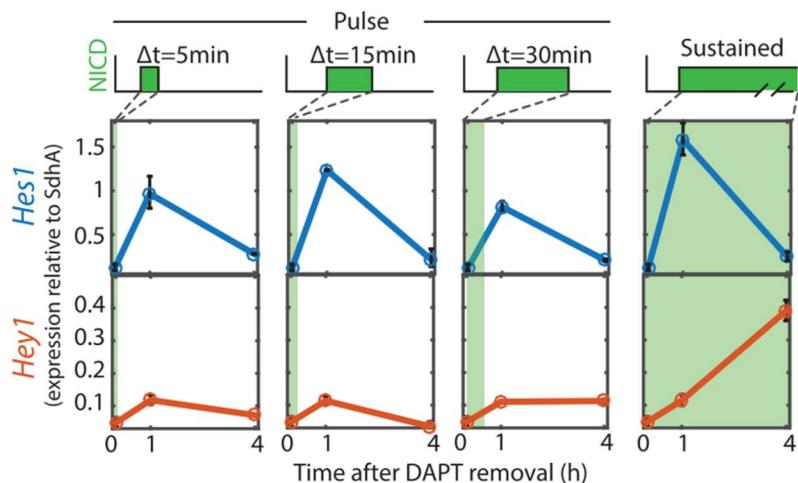


Figure 5.7 Résultats expérimentaux de Nandagopal et al. montrant la dynamique sous-jacente des gènes Hes1 et Hey1 lors de l'activation de la voie Notch à différents temps. Figure reproduite de [13] avec permission dans le cadre de la licence CC BY-NC-ND 4.0.

Cela nous éclaire aussi sur les fréquences d'activation intéressantes à tester pour ce système. En effet, on sait qu'après chaque pulse, il y a un relâchement de NICD dans le noyau des cellules et que le niveau de Hes1 augmente jusqu'à 1 h après l'activation avant de redescendre (voir Figure 5.7). Ainsi, plus on rapproche les impulsions d'activation l'une de l'autre dans le temps, plus on maintiendra un haut niveau d'expression de Hes1 dans les cellules. Il reste cependant à vérifier si le niveau de Hes1 sera proportionnel à la fréquence d'activation. Bien sûr, cela serait vrai jusqu'à l'atteinte d'une certaine fréquence, une fréquence de coupure, probablement dans l'ordre de

grandeur du temps de demi-vie du NICD, où l'ajout de NICD au noyau sera plus important que son taux de dégradation et la cellule devrait donc alors entrer en production de Hey1 (semblable à l'activation continue de la voie). Les fréquences choisies pour les tests sont donc : 1 pulse/h et 1 pulse/1.5h, ce qui devrait maximiser le niveau de Hes1; 1 pulse/3h, ce qui devrait diminuer le niveau moyen de Hes1 (dépendamment aussi du temps entre le dernier pulse et le moment où les cellules sont fixées); 1 pulse/20min et 1 activation continue de 4 h, qui devraient engendrer la production de Hey1. Finalement, 1 pulse/30min qui devrait soit engendrer la production de Hes1 ou de Hey1, car la fréquence de coupure devrait logiquement se trouver dans la plage alentour.

5.2.3 Résultats

Premièrement, l'utilisation de la méthode HCR-FISH s'est révélée être bel et bien efficace pour la lecture de l'expression des gènes, comme on peut le constater sur la figure 5.8, où chaque point brillant correspond à un ARNm qui a été marqué en fluorescence et dont le signal a été amplifié. L'utilisation d'un programme Matlab¹ a permis de réaliser le comptage des ARNm dans chaque cellule grâce à un algorithme de détection de points utilisant un seuil d'intensité ajusté et fixé manuellement pour chaque image.

Le résultat du contrôle d'activation manuelle de la voie Notch est présenté à la figure 5.9. Tout comme pour les résultats présentés à la figure 5.7, on observe une augmentation de l'expression de Hey1 avec la longue activation de 4 h, de même qu'un niveau diminué de Hes1 (toutefois supérieur au contrôle négatif). Les activations de 30 min et 1 h présentent quant à elles des niveaux de Hes1 comparables entre eux, de même que de faibles niveaux de Hey1 (mais supérieurs au contrôle négatif). Les résultats du contrôle sont donc concluants.

¹ Disponible en accès libre : <https://github.com/laurentpotvin/dot-counting-gui>

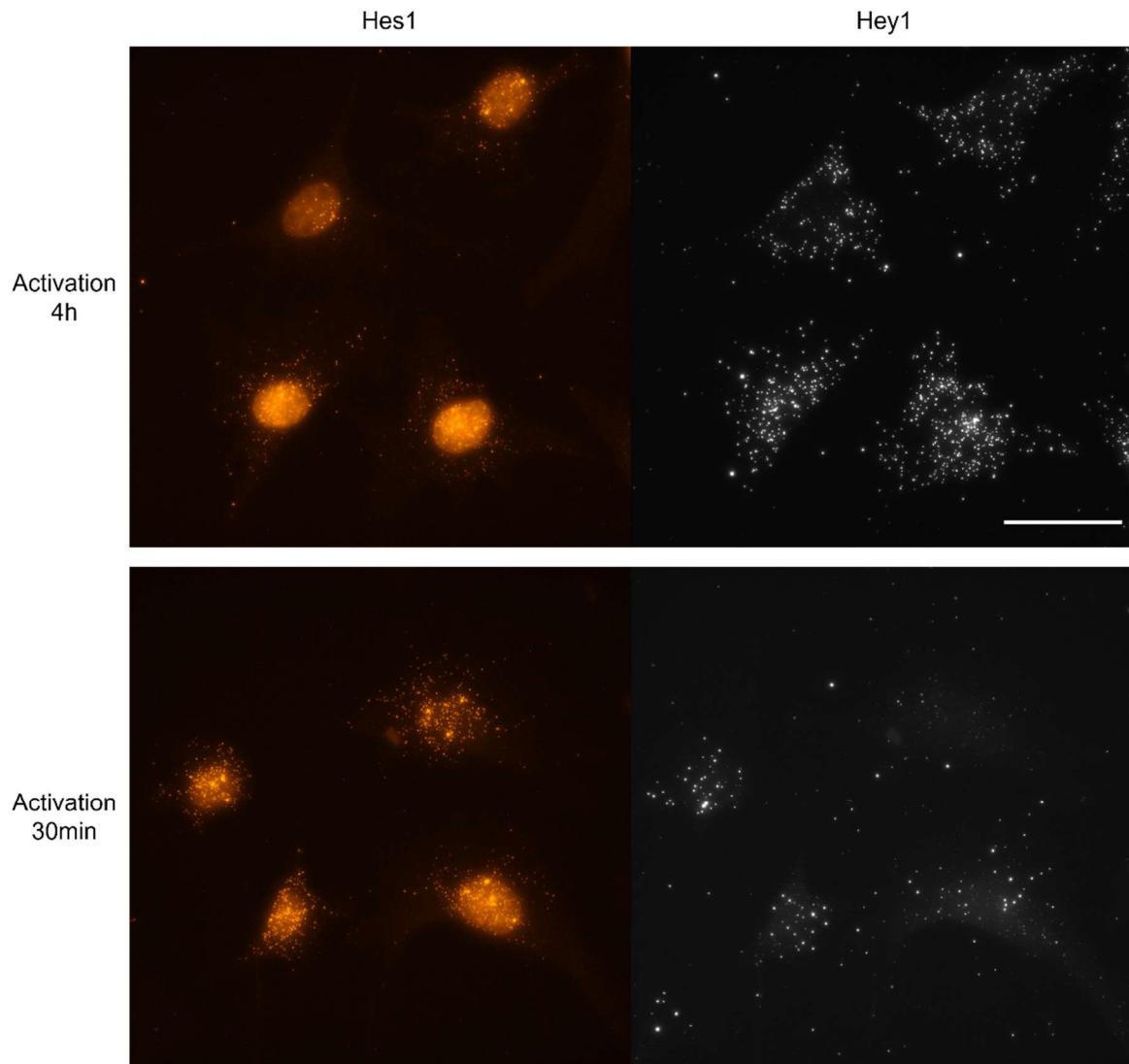


Figure 5.8 Exemple de résultats HCR-FISH tiré du contrôle manuel d'activation Notch. Le contrôle manuel est réalisé sans l'afficheur microfluidique. Les mêmes positions sont imagées dans 2 canaux différents (**Gauche**: Hes1 et **Droite**: Hey1), Barre d'échelle = 50 μ m (même échelle pour les quatre images).

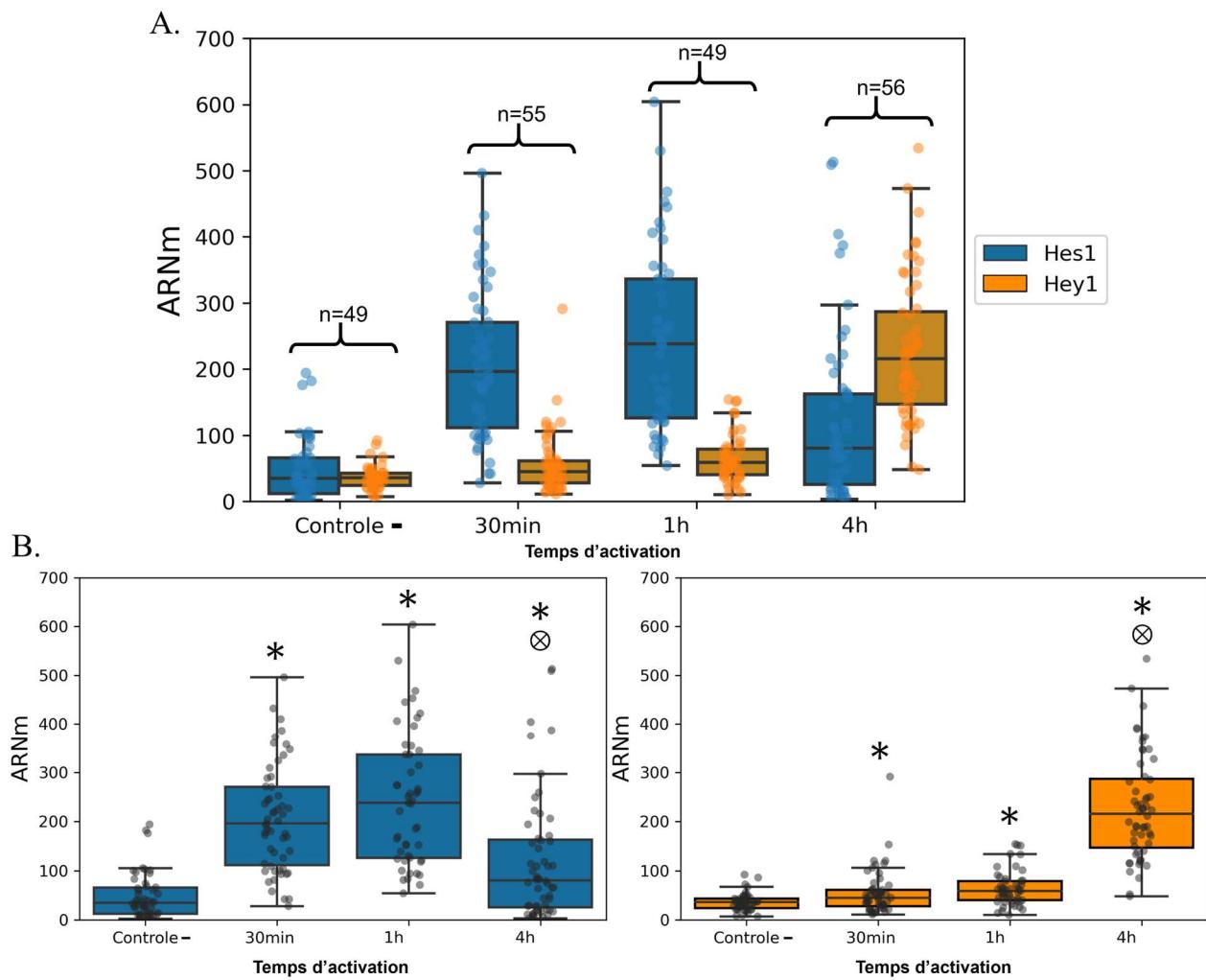


Figure 5.9 Quantification des gènes Hes1 et Hey1 pour le contrôle d'activation manuel. (A) Niveaux de Hes1 et Hey1 par condition, « n » est le nombre de cellules imagées par groupe, les mêmes cellules sont imagées pour Hes1 et Hey1. **(B)** Mêmes résultats qu'en A), mais visuellement séparés. **À gauche;** Hes1, * : différence statistique avec le contrôle négatif (Test de Student: $p\text{-value}_{30\text{min}} = 1,54 \times 10^{-15}$, $p\text{-value}_{1\text{h}} = 6,72 \times 10^{-16}$, $p\text{-value}_{4\text{h}} = 0,0005$), \otimes : différence statistique avec les groupes 30 min et 1 h (Test de Student entre groupe 30 min et 4 h: $p\text{-value} = 8,69 \times 10^{-5}$). **À droite;** Hey1, * : différence statistique avec le contrôle négatif (Test de Student : $p\text{-value}_{30\text{min}} = 0,0084$, $p\text{-value}_{1\text{h}} = 5,86 \times 10^{-6}$, $p\text{-value}_{4\text{h}} = 5,51 \times 10^{-24}$), \otimes : différence statistique avec les groupes 30 min et 1 h (Test de Student entre groupe 30 min et 4 h: $p\text{-value} = 3,53 \times 10^{-21}$).

La deuxième expérience de cette section visait à activer en fréquence la voie Notch des cellules en utilisant l'afficheur microfluidique. Le résultat de la quantification de l'expression des gènes est présenté à la figure 5.10.

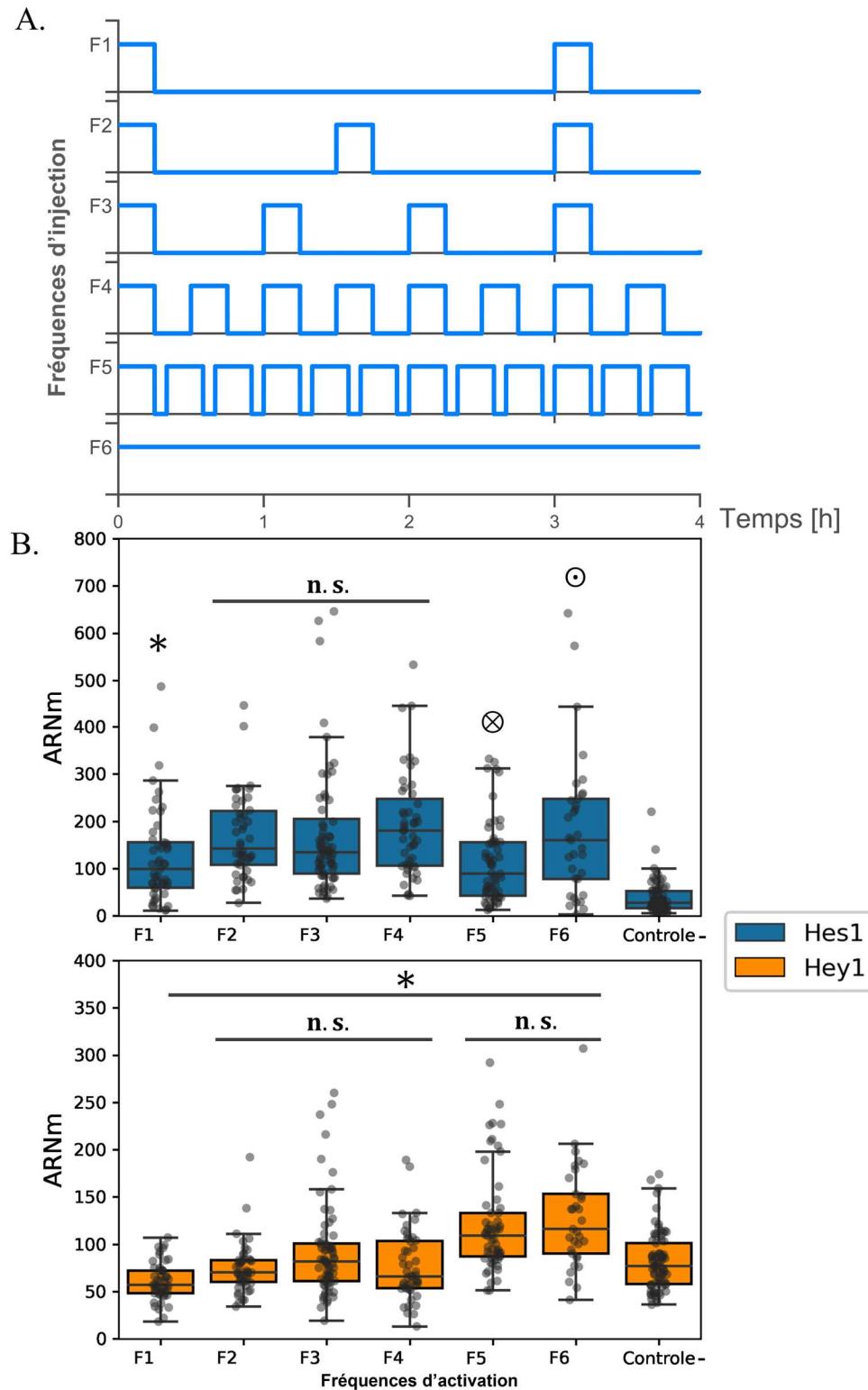


Figure 5.10 Quantification de la réponse en fréquence de la voie Notch. (A) Fréquences d'activation utilisées pendant les quatre heures de l'expérience. **(B)** Niveaux de Hes1 et Hey1 pour les fréquences testées. **En haut:** Hes1, * : niveau de Hes1 plus faible en F1 qu'en F2/F3/F4 (Test

de Student: $p\text{-value}_{F1-F2} = 0,0343$, $p\text{-value}_{F1-F3} = 0,0244$, $p\text{-value}_{F1-F4} = 0,0026$), **n.s.** : niveaux de Hes1 similaires pour F2/F3/F4 ($p\text{-value}_{F2-F3} = 0,3871$, $p\text{-value}_{F2-F4} = 0,2407$, $p\text{-value}_{F3-F4} = 0,9539$), \otimes : différence statistique avec F2/F3/F4 ($p\text{-value}_{F5-F3} = 0,0031$), \odot : niveau de Hes1 de F6 similaire à F2/F3/F4 et statistiquement différent de F5 ($p\text{-value}_{F5-F6} = 0,0049$). **En bas;** Hey1, **n.s.** : niveaux de Hey1 similaires pour F2/F3/F4 ($p\text{-value}_{F2-F3} = 0,0294$, $p\text{-value}_{F2-F4} = 0,6861$, $p\text{-value}_{F3-F4} = 0,0827$), **n.s.** : niveaux de Hey1 similaires pour F5/F6 ($p\text{-value}_{F5-F6} = 0,5225$) et, $*$: statistiquement différents des autres ($p\text{-value}_{F6-F1} = 9,94 \times 10^{-12}$, $p\text{-value}_{F6-F2} = 1,57 \times 10^{-7}$, $p\text{-value}_{F6-F3} = 0,0014$, $p\text{-value}_{F6-F4} = 4,17 \times 10^{-6}$), nombre de cellules par condition : F1 = 49, F2 = 46, F3 = 68, F4 = 47, F5 = 59, F6 = 33, Contrôle - = 77.

Ces résultats préliminaires sont prometteurs. D'une part, on constate que les six traitements ont bel et bien activé l'expression de Hes1 par rapport au contrôle négatif. Comme on s'y attendait aussi, les fréquences F2 et F3 ont activé Hes1 à des niveaux élevés similaires, comparativement à la plus faible fréquence F1 où Hes1 était moins exprimé. De plus, comme les derniers pulses d'activation pour F1, F2 et F3 étaient synchronisés, c'est donc dire qu'il y a eu une accumulation de Hes1 avec les répétitions de pulses pour F2 et F3. On voit aussi que les niveaux de Hey1 pour F2, F3 sont similaires au contrôle négatif (F1 également, même qu'il présente une quantité inférieure de Hey1 que le contrôle). Pour F4, il y a aussi une forte production de Hes1 et une production de Hey1 semblable au contrôle négatif. Ainsi, les fréquences inférieures à 1 pulse/30min (F1, F2, F3, F4) seraient toutes activatrices du régime Hes1.

À F5, soit 1 pulse/20min, on observe plutôt une diminution du niveau de Hes1 et une augmentation du niveau de Hey1. Comme on s'y attendait, on est maintenant en régime Hey1. Ces résultats suggèrent donc que la fréquence de coupure du système Notch serait entre F4 et F5. Cependant, pour F6, l'activation continue, on observe une quantité de Hes1 élevée, malgré une augmentation de la quantité de Hey1. Comme démontré lors du contrôle manuel, lorsque la voie Notch est continuellement activée, le niveau de Hes1 monte initialement et redescend à des faibles niveaux lors de la lecture des gènes à 4 h. On remarque toutefois une plus grande dispersion des quantités d'ARNm pour Hes1 de F6 (certaines cellules avec beaucoup de Hes1 et d'autres à presque zéro). Ainsi, cette hausse de Hes1 est peut-être due à l'oscillation normale de Hes1 et les résultats seraient plus précis avec un plus grand échantillon. Avec les résultats de cette expérience, il est difficile de conclure avec certitude lequel des traitements entre F5 et F6 constitue le cas particulier. On peut toutefois regarder le ratio Hey1/Hes1 dans chaque cellule pour voir comment la proportion des

deux gènes varie selon les conditions (voir Figure 5.11). On constate alors que les cellules des fréquences F5 et F6 présentent un ratio Hey1/Hes1 supérieur à celui des fréquences F1, F2, F3 et F4 (voir Figure 5.11 A). On remarque aussi que la plupart des cellules qui présentent plus de Hey1 que de Hes1 sont dans les conditions F5 et F6 (voir Figure 5.11 B). Ces résultats aident à expliquer le cas particulier de F6 (voir Figure 5.10 B) et confirment que la proportion de Hey1 était supérieure à Hes1 dans près de la moitié des cellules traitées sous F6.

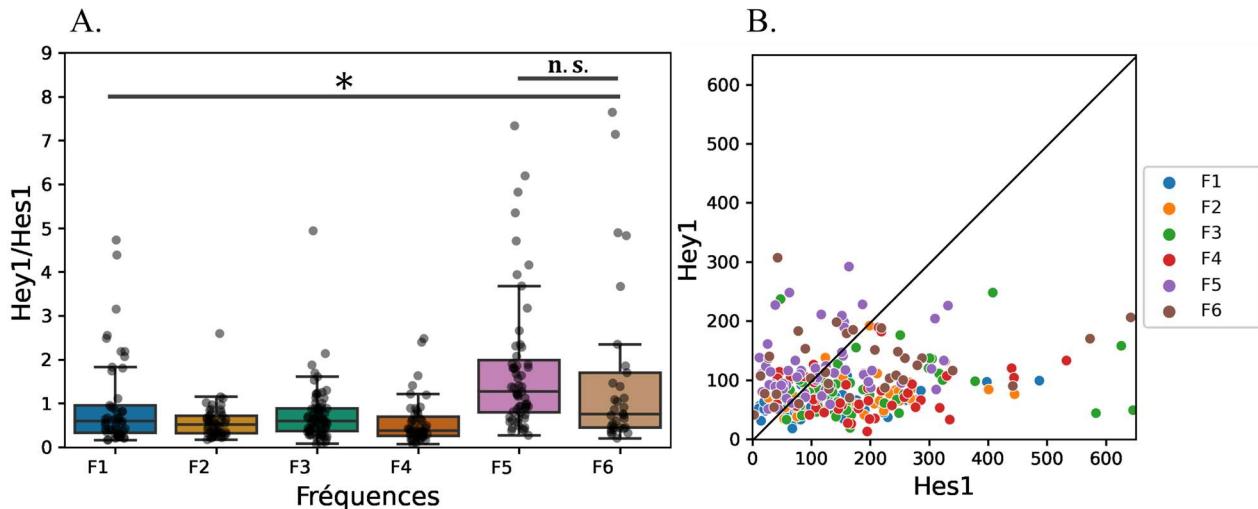


Figure 5.11 Analyse du ratio des gènes Hey1 et Hes1 dans chaque cellule selon les conditions de fréquence testées. (A) Ratio des gènes Hey1/Hes1 selon les fréquences d'activation (voir aussi Figure 5.10 A), **n.s.** : pas de différence statistique entre les distributions F5 et F6 (Test de Student : $p\text{-value}_{F5-F6} = 0,9919$) et, * : elles sont statistiquement différentes de F1/F2/F3/F4 (Test de Student, exemple pour F6 : $p\text{-value}_{F6-F1} = 3,46 \times 10^{-2}$, $p\text{-value}_{F6-F2} = 2,08 \times 10^{-3}$, $p\text{-value}_{F6-F3} = 0,0015$, $p\text{-value}_{F6-F4} = 1,99 \times 10^{-3}$), **(B)** Graphique de ratio entre Hes1 et Hey1, la diagonale représente un ratio de 1, chaque point correspond à la lecture des ARNm dans une cellule.

D'autres expériences seront nécessaires pour bien comprendre la réponse en fréquence de Notch et vérifier si l'utilisation de l'afficheur a un impact quelconque sur la réponse des cellules. Après une expérience de 4 h les cellules sont toujours visuellement en bonne santé, mais l'écoulement continu a peut-être un autre impact sur la production de gènes qu'il serait intéressant de vérifier. Quoi qu'il en soit, les expériences de ce chapitre démontrent le potentiel d'utilisation des afficheurs microfluidiques pour étudier la dynamique de la voie Notch. Les protocoles sont maintenant en place pour d'autres séries d'expériences visant à mieux caractériser la voie Notch et éventuellement d'autres voies de signalisation cellulaire.

CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE

6.1 Synthèse des travaux

L'objectif central de mon projet était de démontrer concrètement comment les afficheurs microfluidiques peuvent être utilisés pour étudier la dynamique des voies de signalisation cellulaire en caractérisant leur précision spatio-temporelle et leur capacité d'analyse multiplexée. Dans ce chapitre, j'évaluerai l'atteinte de chacun des sous-objectifs du projet afin de conclure sur l'objectif principal du projet. Je regarderai aussi comment la technologie des afficheurs microfluidiques se comparent aux autres techniques d'étude de la dynamique des voies de signalisation cellulaire. Finalement, je détaillerai les contributions de ce projet et je ferai mes recommandations pour la suite du projet.

6.1.1 Retour sur les objectifs

L'atteinte de mon objectif principal avait été préalablement divisée en trois sous-objectifs :

- I. Concevoir un afficheur microfluidique pour le contrôle spatial et temporel de réactifs en culture cellulaire.
- II. Caractériser et valider expérimentalement l'utilisation de l'afficheur microfluidique en culture cellulaire.
- III. Utiliser l'afficheur microfluidique pour mesurer et quantifier la réponse en fréquence de la voie de signalisation Notch au niveau du transcriptome dans des cellules mammifères.

Pour le sous-objectif I, j'ai présenté au chapitre 3 ma démarche de conception d'un afficheur microfluidique adapté aux expériences en culture cellulaire. J'ai d'abord comparé le PCD à la configuration fleur pour réaliser qu'avec les méthodes et procédés à l'usage dans le laboratoire, l'afficheur de type fleur permettait une meilleure résolution temporelle pour l'envoi d'impulsions de réactif, tout en étant plus simple d'utilisation. En tentant d'optimiser la configuration pour l'usage en culture cellulaire, j'ai finalement conçu un afficheur de type fleur à 6 pétales ($G = 100 \mu\text{m}$ et $r = 1,15 \text{ mm}$) permettant d'obtenir des pétales stables spatialement et suffisamment larges pour contenir plus de 100 cellules sous chacun d'eux (avec une confluence supérieure à 50 %). Le cisaillement est aussi maintenu inférieur à 1 Pa dans $0,3 \text{ mm}^2$ et plus du pétales avec $q_{inj} = 0,4 \mu\text{L/s}$

et $\alpha = 2$. L'afficheur conçu permet des temps de transition tous inférieurs à 10 s dans les plages d'intérêt des paramètres α et q_{inj} . Le sous-objectif I a donc été atteint.

Le sous-objectif II consistait principalement à tester l'afficheur conçu sur des cellules mammifères en culture et à adapter les protocoles expérimentaux pour limiter les impacts négatifs sur les cellules. Pour vérifier le bon fonctionnement de l'afficheur, des expériences de marquage avec le fluorophore Hoechst 33258 ont été réalisées. Cela a permis de vérifier expérimentalement la précision spatiale de la livraison de réactif aux cellules où seules les cellules sous les pétales étaient marquées par le fluorophore. Pour la précision temporelle, j'ai aussi constaté que la dose de réactif reçue par les cellules était proportionnelle à la fréquence de livraison du réactif. Un contrôle inter-pétales a aussi permis de valider l'absence de biais intrinsèque entre les pétales, permettant alors la comparaison entre les cellules traitées sous chaque pétale. Finalement, des tests ont montré que la viabilité cellulaire était maintenue à environ 97 %, soit comparable au contrôle négatif, pour des débits d'injection de 0,5 μ L/s et 1 μ L/s et des temps d'injection de 30 min, 1 h et 1 h 30 avec $\alpha = 1,5$. Toutes les expériences présentées au chapitre 4 permettent donc de confirmer l'atteinte du sous-objectif II.

Le sous-objectif III consistait quant à lui à démontrer expérimentalement que l'afficheur microfluidique pouvait être utilisé pour activer dynamiquement une voie de signalisation cellulaire. Dans un premier temps, j'ai utilisé l'afficheur pour activer la voie Notch dans des cellules CHO modifiées pour exprimer un gène rapporteur fluorescent (citrine). Les résultats ont démontré que l'augmentation de fluorescence totale dans les cellules est proportionnelle au temps du pulse d'activation EDTA. De plus, des temps d'activation supérieurs à 10 min ont mené à une activation totale au moins 2x plus importante que pour le contrôle négatif. Ainsi, j'ai démontré qu'on peut efficacement utiliser l'afficheur microfluidique pour activer une voie de signalisation. Dans un deuxième temps, j'ai utilisé l'afficheur pour stimuler la voie Notch en fréquence dans des cellules afin de mesurer les différences dans l'expression des gènes Hes1 et Hey1 selon la dynamique d'activation. Les résultats de ces expérimentations, bien qu'ils restent préliminaires, ont démontré que les cellules agissaient pour la plupart comme prévu par la littérature. En effet, Hes1 a été fortement activé pour les fréquences allant de 1 pulse/3h à 1 pulse/30min, tout en conservant des niveaux de Hey1 semblable au contrôle négatif. Pour la fréquence F5 de 1 pulse/20min, Hes1 a été moins exprimé, mais une plus grande expression de Hey1 a été observé. On suspecte donc une fréquence de coupure entre le régime Hes1 et le régime Hey1, entre les fréquences 1 pulse/30 min

et 1 pulse/20min. Les résultats sont toutefois compromis par un effet inattendu pour la fréquence d'activation continue (F6). Celle-ci déroge de la tendance et contredit les résultats du contrôle d'activation manuel en présentant une expression de Hes1 plus élevée que celle attendue, avec toutefois un niveau de Hey1 plus élevé. Pour F6, le ratio Hey1/Hes1 dans chaque cellule reste malgré tout supérieur à celui des traitements F1, F2, F3 et F4. Ces résultats constituent ainsi le premier pas vers une meilleure compréhension de la dynamique de la voie Notch, puisque plusieurs autres expériences restent à faire (voir section 6.3). Cependant, ces résultats démontrent que les afficheurs et les méthodes développées pendant mes travaux pourront être utilisés pour réaliser ces expériences. Le sous-objectif III est donc considéré atteint.

Finalement, l'atteinte des trois sous-objectifs a bel et bien permis la caractérisation des performances des afficheurs microfluidiques pour la stimulation dynamique d'une voie de signalisation cellulaire, montrant d'un même coup leur potentiel pour ce genre de recherche. Certes, j'en suis resté au stade de la preuve de concept, mais on peut déjà constater plusieurs avantages de l'utilisation de l'afficheur pour stimuler dynamiquement des cellules, comme je le présenterai dans la prochaine sous-section.

6.2 Comparaison des afficheurs microfluidiques aux autres techniques d'étude de la dynamique des voies de signalisation cellulaire

Les afficheurs microfluidiques, grâce à leur haute précision spatiale et temporelle, permettent la réalisation d'expériences impossibles, ou difficilement réalisables, manuellement. J'ai présenté préalablement au chapitre 2 d'autres méthodes permettant aussi la stimulation fréquentielle spécifique de voies de signalisation cellulaire. D'une part, les systèmes de microfluidique classique ont déjà été utilisés pour contrôler dynamiquement l'environnement cellulaire avec une résolution temporelle pouvant atteindre 2 pulses par seconde [44], [73] et en testant de 16 à 1500 conditions indépendantes par expérience [5], [75]–[77]. D'autre part, les systèmes d'optogénétique présentent des capacités spatio-temporelles inégalées avec des temps de transition de l'ordre de la nanoseconde et la possibilité de tester plusieurs milliers de conditions simultanément [62]. De fait, l'optogénétique a été avantageusement appliquée à plusieurs reprises à l'étude des voies de signalisation cellulaire [1], [55], [64]–[67].

L'afficheur que j'ai conçu et présenté dans ce mémoire, avec ses 6 conditions indépendantes par expérience et sa résolution temporelle d'environ 0,1 pulse par seconde, est encore loin d'atteindre des capacités techniques comparables. On peut toutefois s'imaginer un jour où la technologie atteindra un niveau de maturité permettant de contrôler une centaine de fréquences d'injection simultanément et d'envoyer jusqu'à 1 pulse à la seconde. Cela serait par exemple possible en concevant un PCD équipé de valves miniatures intégrées au design.

Malgré tout, les afficheurs microfluidiques possèdent des avantages que les autres techniques de stimulation fréquentielle de cellules n'ont pas. Comme discuté précédemment, avec cette méthode en microfluidique ouverte, plus besoin d'introduire les cellules sur les circuits microfluidiques fermés, ce qui permet de réduire au minimum les étapes de préparation de l'échantillon biologique d'intérêt. Bien sûr, c'est aussi le cas pour les méthodes d'optogénétique, où on peut étudier les cellules directement dans leur plat de culture. Les afficheurs microfluidiques présentent toutefois quelques avantages que l'optogénétique n'a pas. Il est par exemple possible d'inclure d'autres ouvertures sous l'afficheur pour automatiser d'autres manipulations (p. ex. fixation des cellules ou étapes de rinçage) [23]. Aussi, certaines voies de signalisation s'activent plus simplement et plus directement par induction chimique que par la mise au point d'un système de recrutement protéique photosensible. Comme c'est le cas pour la voie Notch, où on peut directement activer le récepteur Notch1 avec une solution EDTA ou en utilisant le récepteur Notch1 tronqué et l'inhibiteur DAPT (voir chapitre 5). Inutile donc, dans de tels cas, de passer par la conception d'un système optogénétique. Par ailleurs, la plupart des processus biologiques sont généralement lents et ne requièrent pas obligatoirement la haute précision temporelle fournie par l'optogénétique. Par exemple, pour activer efficacement la voie Ras-ERK dans des cellules, des stimulations lumineuses de plus de 5 min étaient requises, malgré la rapidité d'activation du système optogénétique [66]. La technologie des afficheurs microfluidiques pourrait donc trouver sa niche d'application entre les méthodes de microfluidique classique et les méthodes d'optogénétique. Le futur des afficheurs est prometteur, mais encore beaucoup de développement technologique reste à faire.

CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Les travaux que j'ai réalisés pendant ma maîtrise constituent vraisemblablement le point de départ du plus grand projet de caractérisation de la voie Notch en utilisant les afficheurs microfluidiques comme outil de stimulation. Éventuellement, on cherchera aussi à utiliser les afficheurs pour étudier toutes sortes d'autres voies de signalisation. Je présenterai dans ce chapitre plusieurs recommandations pour en arriver là.

7.1 Recommandations

Il serait d'abord possible d'apporter plusieurs améliorations à l'afficheur même. À ce jour, la robustesse du système réside principalement dans l'expérience et l'habileté de l'expérimentateur. De ce fait, je recommanderais de rendre le système encore plus robuste avant de poursuivre les expériences en biologie. Une des causes d'incertitudes est le positionnement de l'afficheur dans le puits de cellules au microscope : les piliers de support écrasent quelques cellules en périphérie, il faut donc être très délicat. Il serait donc peut-être intéressant à long terme d'automatiser le positionnement de l'afficheur dans le puits de cellules, ainsi que toutes les étapes préliminaires à l'expérience (p. ex. rinçage des canaux et prévisualisation de l'écoulement dans un premier Petri). On limiterait de la sorte les manipulations à l'intérieur de l'incubateur du microscope et donc les risques d'erreurs. Également, comme discuté en 6.1.2, il serait intéressant de développer en parallèle un modèle de PCD avec valves miniatures intégrées. Avec un nouveau design de la sorte permettant plus de conditions testées simultanément avec une meilleure résolution temporelle, on pourrait étendre l'utilisation de l'afficheur à bien d'autres études en dynamique de signalisation cellulaire.

Ensuite, un des principaux désavantages de la technologie, est qu'elle consomme beaucoup de réactif, en raison du flot continu requis pour maintenir l'écoulement. Cela est vrai quand on utilise l'afficheur pour injecter le réactif. On peut en effet distinguer deux modes d'opération pour l'afficheur de type fleur, soit 1) le réactif d'intérêt est dans le liquide d'injection et l'écoulement active les cellules (p. ex. les expériences d'activation Notch avec EDTA présentées en 5.1), ou soit 2) le réactif d'intérêt est présent dans le liquide environnant et inhibe l'activation, puis l'écoulement active les cellules par le retrait local de l'inhibiteur (p. ex. les expériences d'activation Notch avec DAPT présentées en 5.2). Planifier les expérimentations pour suivre le deuxième mode, permettrait

donc de toujours assurer une économie de réactif. Si on doit tout de même opérer l'afficheur avec le premier mode, une autre façon d'économiser du réactif serait de caractériser précisément le transport du réactif aux cellules pour ajuster la concentration de réactif à injecter selon le débit et la dose voulue. Pour cela, on peut regarder le nombre de Péclet de surface, soit le rapport entre le temps de diffusion transversal et le temps de convection axial dans l'écoulement sous l'afficheur.

Pour la suite des expériences sur l'étude de la voie Notch, plusieurs vérifications seraient intéressantes à faire. D'abord, il serait pertinent de mesurer expérimentalement le temps de demi-vie du NICD dans les cellules. Cela serait possible par immunoprécipitation du NICD suivie d'une analyse Western-Blot à différents temps suite à une activation de la voie Notch (voir [110] par exemple). Cela permettrait de préciser les hypothèses quant à la fréquence de coupure du système Notch entre les régimes Hes1 et Hey1. Il serait aussi intéressant de quantifier la quantité de NICD relâchée par les cellules Δ ECD suivant une activation. On pourrait alors optimiser la quantité de NICD relâchée en ajustant la concentration de DAPT en solution afin de reproduire des conditions naturelles à la voie Notch chez la cellule (p. ex. en injectant du média à 0,3 mM DAPT au lieu de 0 mM).

Par ailleurs, une des principales vérifications à faire à ce point, est de reproduire le contrôle d'activation Notch présentée à la figure 5.9, mais en utilisant l'afficheur microfluidique pour produire les temps d'activation. On saurait alors, en comparant avec les résultats de la figure 5.9, si l'afficheur a un effet sur la production de Hes1 et Hey1. Comme on a vu en 5.10, on cherche toujours à expliquer le haut niveau de Hes1 dans le cas de la fréquence F6, soit la fréquence continue. On cherche à savoir s'il s'agit d'un effet isolé ou d'un effet associé à l'utilisation de l'afficheur. D'autres contrôles pourront d'ailleurs être réalisés pour vérifier l'impact de l'afficheur sur l'activation Notch. Premièrement, on pourrait réaliser une expérience où le média injecté contient également 10 μ M de DAPT. De la sorte, on pourrait vérifier si le simple écoulement du fluide sur les cellules, par exemple par les forces de cisaillement, a un effet sur l'expression des gènes (Hes1 et Hey1). Deuxièmement, on pourrait reproduire l'expérience d'activation Notch en fréquence présentée à la figure 5.10, mais en utilisant des cellules avec un récepteur Notch1 naturel (non tronqué Δ ECD), encore une fois pour vérifier l'effet de l'afficheur sur l'expression des gènes. Finalement, afin de faciliter les analyses des prochaines expériences sur la réponse en fréquence de Notch, il serait avantageux de complètement automatiser le comptage des ARNm. Il serait par

exemple possible d'améliorer le système de traitement des images HCR par apprentissage machine. On accélérerait ainsi grandement l'acquisition de résultats.

7.2 Contributions et ouverture

Si mes travaux n'ont pas abouti à une publication dans le temps accordé pour ma maîtrise, j'estime toutefois avoir pavé la voie pour de futur.e.s étudiant.e.s désireux.ses de poursuivre l'étude des voies de signalisation avec les afficheurs microfluidiques. Tout au long de ma maîtrise, j'ai acquis beaucoup de résultats préliminaires qui ont permis de démontrer le potentiel qu'a la technologie des afficheurs pour étudier la dynamique cellulaire. J'espère que ma contribution à ce domaine de recherche permettra peut-être un jour d'aider les chercheurs dans leur quête de compréhension du vivant. Si la microfluidique classique a aujourd'hui permis de grandes avancées scientifiques, mes travaux portent à croire que la microfluidique ouverte a aussi son lot de potentiel en biologie des systèmes.

RÉFÉRENCES

- [1] S. Jeknić, T. Kudo, and M. W. Covert, “Techniques for studying decoding of single cell dynamics,” *Front. Immunol.*, vol. 10, no. APR, pp. 1–12, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.00755.
- [2] B. N. Kholodenko, J. F. Hancock, and W. Kolch, “Signalling ballet in space and time,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, no. 6, pp. 414–426, 2010, doi: 10.1038/nrm2901.
- [3] J. Selimkhanov *et al.*, “Accurate information transmission through dynamic biochemical signalling networks,” *Science (80-.)*, vol. 346, no. 6215, pp. 1370–1373, 2014, doi: 10.1126/science.1254933.
- [4] S. D. M. Santos, P. J. Verveer, and P. I. H. Bastiaens, “Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, no. 3, pp. 324–330, 2007, doi: 10.1038/ncb1543.
- [5] H. Ryu *et al.*, “Frequency modulation of ERK activation dynamics rewires cell fate ,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 12, no. 4, p. 866, 2016, doi: 10.15252/msb.20166982.
- [6] E. Batchelor, A. Loewer, C. Mock, and G. Lahav, “Stimulus-dependent dynamics of p53 in single cells,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 7, no. 488, pp. 1–8, 2011, doi: 10.1038/msb.2011.20.
- [7] J. E. Purvis, K. W. Karhohs, C. Mock, E. Batchelor, A. Loewer, and G. Lahav, “P53 Dynamics Control Cell Fate,” *Science (80-.)*, vol. 336, no. 6087, pp. 1440–1444, 2012, doi: 10.1126/science.1218351.
- [8] R. Kageyama, T. Ohtsuka, H. Shimojo, and I. Imayoshi, “Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition,” *Nat. Neurosci.*, vol. 11, no. 11, pp. 1247–1251, 2008, doi: 10.1038/nn.2208.
- [9] H. Shimojo, T. Ohtsuka, and R. Kageyama, “Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors,” *Neuron*, vol. 58, no. 1, pp. 52–64, Apr. 2008.
- [10] R. Kageyama, Y. Masamizu, and Y. Niwa, “Oscillator mechanism of notch pathway in the segmentation clock,” *Dev. Dyn.*, vol. 236, no. 6, pp. 1403–1409, 2007, doi: 10.1002/dvdy.21114.
- [11] S. Artavanis-tsakonas, M. D. Rand, and R. J. Lake, “Notch Signaling : Cell Fate Control and

- Signal Integration in Development,” *Science* (80-.), vol. 284, no. April, pp. 770–776, 1999, doi: 10.1126/science.284.5415.770.
- [12] S. J. Bray, “Notch signalling in context,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 17, pp. 722–735, 2016, doi: 10.1038/nrm.2016.94.
- [13] N. Nandagopal, L. Santat, L. Lebon, D. Sprinzak, M. Bronner, and M. Elowitz, “Dynamic Ligand Discrimination in the Notch Pathway,” *Cell*, vol. 172, no. 4, pp. 869-880.e19, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.01.002.
- [14] P. J. Roberts and C. J. Der, “Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer,” *Oncogene*, vol. 26, no. 22, pp. 3291–3310, 2007, doi: 10.1038/sj.onc.1210422.
- [15] R. G. Baker, M. S. Hayden, and S. Ghosh, “NF- κ B, inflammation, and metabolic disease,” *Cell Metab.*, vol. 13, no. 1, pp. 11–22, 2011, doi: 10.1016/j.cmet.2010.12.008.
- [16] E. R. Andersson and U. Lendahl, “Therapeutic modulation of Notch signalling—are we there yet?,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 13, no. 5, pp. 357–378, 2014, doi: 10.1038/nrd4252.
- [17] J. C. Aster, W. S. Pear, and S. C. Blacklow, “The Varied Roles of Notch in Cancer,” *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 12, pp. 245–75, 2017, doi: 10.1146/annurev-pathol-052016-100127.
- [18] P. Cohen, “Protein kinases — the major drug targets of the twenty-first century?,” vol. 1, no. April, 2002.
- [19] B. B. Aggarwal, G. Sethi, and V. Baladandayuthapani, “Targeting Cell Signaling Pathways for Drug Discovery : An Old Lock Needs a New Key,” vol. 592, no. June, pp. 580–592, 2007, doi: 10.1002/jcb.21500.
- [20] M. Sung *et al.*, “Dynamic Effect of Bortezomib on Nuclear Factor- κ B Activity and Gene Expression in Tumor Cells,” 2008, doi: 10.1124/mol.108.049114.
- [21] M. Behar, D. Barken, S. L. Werner, and A. Hoffmann, “The dynamics of signaling as a pharmacological target,” *Cell*, vol. 155, no. 2, pp. 448–461, 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.09.018.
- [22] S. H. Chen, W. Forrester, and G. Lahav, “Schedule-dependent interaction between

- anticancer treatments,” *Science* (80-.), vol. 351, no. 6278, pp. 1204–1208, 2016, doi: 10.1126/science.aac5610.
- [23] P. A. Goyette, É. Boulais, F. Normandeau, G. Laberge, D. Juncker, and T. Gervais, “Microfluidic multipoles theory and applications,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, 2019, doi: 10.1038/s41467-019-09740-7.
- [24] P. A. Goyette, É. Boulais, M. Tremblay, and T. Gervais, “Pixel-based open-space microfluidics for versatile surface processing,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 118, no. 2, pp. 1–7, 2021, doi: 10.1073/pnas.2019248118.
- [25] H. V. Westerhoff and B. O. Palsson, “The evolution of molecular biology into systems biology,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 22, no. 10, pp. 1249–1252, 2004, doi: 10.1038/nbt1020.
- [26] T. G. and L. H. Trey Ideker, “A New Approach to Decoding Life: Systems Biology,” *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, vol. 56, no. 1, pp. 66–72, 2001, doi: 10.1146/annurev.publhealth.27.021405.102100.
- [27] A. Frioulet and D. Thomas, “Systems Biology - An interdisciplinary approach,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, no. 12, pp. 2404–2407, 2005, doi: 10.1016/j.bios.2004.11.014.
- [28] R. Breitling, “What is systems biology?,” *Front. Physiol.*, vol. 1 MAY, no. May, pp. 1–5, 2010, doi: 10.3389/fphys.2010.00009.
- [29] Z. Chen and M. B. Elowitz, “Programmable protein circuit design,” *Cell*, vol. 184, no. 9, pp. 2284–2301, 2021, doi: 10.1016/j.cell.2021.03.007.
- [30] C. J. Bashor and J. J. Collins, “Understanding Biological Regulation Through Synthetic Biology,” 2018.
- [31] E. A. D. Ralph A. Bradshaw, *Handbook of Cell Signaling*. Academic Press, 2003.
- [32] K. Rottner and T. E. B. Stradal, “Actin dynamics and turnover in cell motility,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 23, no. 5, pp. 569–578, 2011, doi: 10.1016/j.ceb.2011.07.003.
- [33] S. Huvemeers and E. H. J. Danen, “Adhesion signaling - Crosstalk between integrins, Src and Rho,” *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. 8, pp. 1059–1069, 2009, doi: 10.1242/jcs.039446.
- [34] A. Oeckinghaus, M. S. Hayden, and S. Ghosh, “Crosstalk in NF-κB signaling pathways,” *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 8, pp. 695–708, 2011, doi: 10.1038/ni.2065.

- [35] T. Kawai and S. Akira, “Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity,” *Immunity*, vol. 34, no. 5, pp. 637–650, 2011, doi: 10.1016/j.jimmuni.2011.05.006.
- [36] Cybertory, “Signal transduction pathways,” *Wikimedia Commons*, 2010. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Signal_transduction_pathways.svg (accessed Mar. 04, 2022).
- [37] L. Cai, C. K. Dalal, and M. B. Elowitz, “Frequency-modulated nuclear localization bursts coordinate gene regulation,” *Nature*, vol. 455, no. 7212, pp. 485–490, 2008, doi: 10.1038/nature07292.
- [38] J. H. Levine, Y. Lin, and M. B. Elowitz, “Functional roles of pulsing in genetic circuits,” *Science (80-.)*, vol. 342, no. 6163, pp. 1193–1200, 2013, doi: 10.1126/science.1239999.
- [39] J. C. W. Locke, J. W. Young, M. Fontes, M. J. H. Jiménez, and M. B. Elowitz, “Stochastic pulse regulation in bacterial stress response,” *Science (80-.)*, vol. 334, no. 6054, pp. 366–369, 2011, doi: 10.1126/science.1208144.
- [40] E. Nadezhdin, N. Murphy, N. Dalchau, A. Phillips, and J. C. W. Locke, “Stochastic pulsing of gene expression enables the generation of spatial patterns in *Bacillus subtilis* biofilms,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14431-9.
- [41] A. Hoffmann, A. Levchenko, M. L. Scott, and D. Baltimore, “The I κ B-NF- κ B signaling module: Temporal control and selective gene activation,” *Science (80-.)*, vol. 298, no. 5596, pp. 1241–1245, 2002, doi: 10.1126/science.1071914.
- [42] D. E. Nelson *et al.*, “Oscillations in NF- κ B signaling control the dynamics of gene expression,” *Science (80-.)*, vol. 306, no. 5696, pp. 704–708, 2004, doi: 10.1126/science.1099962.
- [43] Q. Zhang *et al.*, “NF- κ B Dynamics Discriminate between TNF Doses in Single Cells,” *Cell Syst.*, vol. 5, no. 6, pp. 638–645.e5, 2017, doi: 10.1016/j.cels.2017.10.011.
- [44] N. Hao and E. K. O’Shea, “Signal-dependent dynamics of transcription factor translocation controls gene expression,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 31–40, 2011, doi: 10.1038/nsmb.2192.

- [45] Y. Lin, C. H. Sohn, C. K. Dalal, L. Cai, and M. B. Elowitz, “Combinatorial gene regulation by modulation of relative pulse timing,” *Nature*, vol. 527, no. 7576, pp. 54–58, 2015, doi: 10.1038/nature15710.
- [46] C. K. Dalal, L. Cai, Y. Lin, K. Rahbar, and M. B. Elowitz, “Pulsatile dynamics in the yeast proteome,” *Curr. Biol.*, vol. 24, no. 18, pp. 2189–2194, 2014, doi: 10.1016/j.cub.2014.07.076.
- [47] B. Vogelstein, D. Lane, and A. J. Levine, “Surfing the p53 network,” vol. 408, no. November, 2000.
- [48] N. Gaiano and G. Fishell, “The role of Notch in promoting glial and neural stem cell fates,” *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 25, pp. 471–490, 2002, doi: 10.1146/annurev.neuro.25.030702.130823.
- [49] J. Grego-Bessa *et al.*, “Notch Signaling Is Essential for Ventricular Chamber Development,” *Dev. Cell*, vol. 12, no. 3, pp. 415–429, 2007, doi: 10.1016/j.devcel.2006.12.011.
- [50] D. Amsen, C. Helbig, and R. A. Backer, “Notch in T Cell Differentiation: All Things Considered,” *Trends Immunol.*, vol. 36, no. 12, pp. 802–814, 2015, doi: 10.1016/j.it.2015.10.007.
- [51] D. Henrique and F. Schweisguth, “Mechanisms of notch signaling: A simple logic deployed in time and space,” *Dev.*, vol. 146, no. 3, 2019, doi: 10.1242/dev.172148.
- [52] I. Imayoshi *et al.*, “Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors,” *Science (80-.)*, vol. 342, no. 6163, pp. 1203–1208, Dec. 2013.
- [53] K. F. Sonnen *et al.*, “Modulation of Phase Shift between Wnt and Notch Signaling Oscillations Controls Mesoderm Segmentation,” *Cell*, vol. 172, no. 5, pp. 1079-1090.e12, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.01.026.
- [54] A. C. Rios, O. Serralbo, D. Salgado, and C. Marcelle, “Neural crest regulates myogenesis through the transient activation of NOTCH,” pp. 4–8, 2011, doi: 10.1038/nature09970.
- [55] L. J. Bugaj *et al.*, “Cancer mutations and targeted drugs can disrupt dynamic signal encoding by the Ras-Erk pathway,” *Science (80-.)*, vol. 361, no. 6405, 2018, doi: 10.1126/science.aa03048.

- [56] J. G. Albeck, G. B. Mills, and J. S. Brugge, “Frequency-Modulated Pulses of ERK Activity Transmit Quantitative Proliferation Signals,” *Mol. Cell*, vol. 49, no. 2, pp. 249–261, 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.002.
- [57] J. E. Purvis and G. Lahav, “Review Encoding and Decoding Cellular Information through Signaling Dynamics,” *Cell*, vol. 152, no. 5, pp. 945–956, 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.02.005.
- [58] K. Müller, S. Naumann, W. Weber, and M. D. Zurbiggen, “Optogenetics for gene expression in mammalian cells,” *Biol. Chem.*, vol. 396, no. 2, pp. 145–152, 2015, doi: 10.1515/hsz-2014-0199.
- [59] K. Kolar and W. Weber, “Synthetic biological approaches to optogenetically control cell signaling,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 47, no. ii, pp. 112–119, 2017, doi: 10.1016/j.copbio.2017.06.010.
- [60] M. Mansouri, T. Strittmatter, and M. Fussenegger, “Light-Controlled Mammalian Cells and Their Therapeutic Applications in Synthetic Biology,” *Adv. Sci.*, vol. 6, no. 1, 2019, doi: 10.1002/advs.201800952.
- [61] A. Levskaya, O. D. Weiner, W. A. Lim, and C. A. Voigt, “Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction,” *Nature*, vol. 461, no. 7266, pp. 997–1001, 2009, doi: 10.1038/nature08446.
- [62] E. Papagiakoumou, “Optical developments for optogenetics,” pp. 443–464, 2013, doi: 10.1111/boc.201200087.
- [63] N. Grossman *et al.*, “Multi-site optical excitation using ChR2 and micro-LED array,” 2010, doi: 10.1088/1741-2560/7/1/016004.
- [64] K. Zhang and B. Cui, “Optogenetic control of intracellular signaling pathways,” *Trends Biotechnol.*, vol. 33, no. 2, pp. 92–100, 2015, doi: 10.1016/j.tibtech.2014.11.007.
- [65] M. Shaaya, J. Fauser, and A. V. Karginov, “Optogenetics: The art of illuminating complex signaling pathways,” *Physiology*, vol. 36, no. 1, pp. 52–60, 2021, doi: 10.1152/physiol.00022.2020.
- [66] J. E. Toettcher, O. D. Weiner, and W. A. Lim, “Using Optogenetics to Interrogate the

- Dynamic Control of Signal Transmission by the Ras / Erk Module,” *Cell*, vol. 155, no. 6, pp. 1422–1434, 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.11.004.
- [67] R. Viswanathan *et al.*, “Optogenetic inhibition of Delta reveals digital Notch signalling output during tissue differentiation,” *EMBO Rep.*, 2019, doi: 10.15252/embr.201947999.
- [68] G. M. Whitesides, “The origins and the future of microfluidics,” *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–373, 2006, doi: 10.1038/nature05058.
- [69] J. Pihl, M. Karlsson, and D. T. Chiu, “Microfluidic technologies in drug discovery,” *Drug Discov. Today*, vol. 10, no. 20, pp. 1377–1383, 2005.
- [70] L. Gervais, N. De Rooij, and E. Delamarche, “Microfluidic chips for point-of-care immunodiagnostics,” *Adv. Mater.*, vol. 23, no. 24, 2011, doi: 10.1002/adma.201100464.
- [71] K. F. Sonnen and C. A. Merten, “Microfluidics as an Emerging Precision Tool in Developmental Biology,” *Dev. Cell*, vol. 48, no. 3, pp. 293–311, 2019, doi: 10.1016/j.devcel.2019.01.015.
- [72] A. Olanrewaju, M. Beaugrand, M. Yafia, and D. Juncker, “Capillary microfluidics in microchannels: From microfluidic networks to capillaric circuits,” *Lab Chip*, vol. 18, no. 16, pp. 2323–2347, 2018, doi: 10.1039/c8lc00458g.
- [73] P. Hersen, M. N. McClean, L. Mahadevan, and S. Ramanathan, “Signal processing by the HOG MAP kinase pathway,” vol. 105, no. 20, 2008.
- [74] A. S. Hansen and E. K. O’Shea, “Promoter decoding of transcription factor dynamics involves a trade-off between noise and control of gene expression,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 9, no. 704, 2013, doi: 10.1038/msb.2013.56.
- [75] R. Gómez-Sjöberg, A. A. Leyrat, D. M. Pirone, C. S. Chen, and S. R. Quake, “Versatile, fully automated, microfluidic cell culture system,” *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 22, pp. 8557–8563, 2007, doi: 10.1021/ac071311w.
- [76] S. Tay, J. J. Hughey, T. K. Lee, T. Lipniacki, S. R. Quake, and M. W. Covert, “Single-cell NF- κ B dynamics reveal digital activation and analogue information processing,” *Nature*, vol. 466, no. 7303, pp. 267–271, 2010, doi: 10.1038/nature09145.
- [77] C. Zhang *et al.*, “Ultra-multiplexed analysis of single-cell dynamics reveals logic rules in

- differentiation,” *Sci. Adv.*, vol. 5, no. 4, pp. 1–11, 2019, doi: 10.1126/sciadv.aav7959_rfseq1.
- [78] A. J. Blake, T. M. Pearce, N. S. Rao, S. M. Johnson, and J. C. Williams, “Multilayer PDMS microfluidic chamber for controlling brain slice microenvironment,” *Lab Chip*, vol. 7, no. 7, pp. 842–849, 2007, doi: 10.1039/b704754a.
- [79] G. V. Kaigala, R. D. Lovchik, and E. Delamarche, “Microfluidics in the ‘open Space’ for performing localized chemistry on biological interfaces,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 51, no. 45, pp. 11224–11240, 2012, doi: 10.1002/anie.201201798.
- [80] C. H. Hsu, C. Chen, and A. Folch, “‘Microcanals’ for micropipette access to single cells in microfluidic environments,” *Lab Chip*, vol. 4, no. 5, pp. 420–424, 2004, doi: 10.1039/b404956j.
- [81] A. Bruckbauer *et al.*, “Writing with DNA and protein using a nanopipet for controlled delivery,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 30, pp. 8810–8811, 2002, doi: 10.1021/ja026816c.
- [82] A. Meister *et al.*, “FluidFM: Combining atomic force microscopy and nanofluidics in a universal liquid delivery system for single cell applications and beyond,” *Nano Lett.*, vol. 9, no. 6, pp. 2501–2507, 2009, doi: 10.1021/nl901384x.
- [83] H. Tavana, “Nanoliter Liquid Patterning in Aqueous Environments for Spatially-Defined Reagent Delivery to Mammalian Cells,” vol. 8, no. 9, pp. 736–741, 2009, doi: 10.1038/nmat2515.Nanoliter.
- [84] D. Chen *et al.*, “The chemistrode: A droplet-based microfluidic device for stimulation and recording with high temporal, spatial, and chemical resolution,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 44, pp. 16843–16848, 2008, doi: 10.1073/pnas.0807916105.
- [85] D. Juncker, H. Schmid, and E. Delamarche, “Multipurpose microfluidic probe,” *Nat. Mater.*, vol. 4, no. 8, pp. 622–627, 2005, doi: 10.1038/nmat1435.
- [86] E. Delamarche and G. V. Kaigala, *Open-Space Microfluidics: Concepts, Implementations, Applications*. 2018.
- [87] G. V. Kaigala, R. D. Lovchik, U. Drechsler, and E. Delamarche, “A vertical microfluidic

- probe," *Langmuir*, vol. 27, no. 9, pp. 5686–5693, 2011, doi: 10.1021/la2003639.
- [88] A. Ainla, G. D. M. Jeffries, R. Brune, O. Orwar, and A. Jesorka, "A multifunctional pipette," *Lab Chip*, vol. 12, no. 7, pp. 1255–1261, 2012, doi: 10.1039/c2lc20906c.
- [89] J. F. Cors, A. Stucki, and G. V. Kaigala, "Hydrodynamic thermal confinement: Creating thermo-chemical microenvironments on surfaces," *Chem. Commun.*, vol. 52, no. 88, pp. 13035–13038, 2016, doi: 10.1039/c6cc08018a.
- [90] M. A. Qasaimeh, S. G. Ricoult, and D. Juncker, "Microfluidic probes for use in life sciences and medicine," *Lab Chip*, vol. 13, no. 1, pp. 40–45, 2013, doi: 10.1039/c2lc40898h.
- [91] A. Queval *et al.*, "Chamber and microfluidic probe for microperfusion of organotypic brain slices," *Lab Chip*, vol. 10, no. 3, pp. 326–334, 2010, doi: 10.1039/b916669f.
- [92] R. D. Lovchik, G. V. Kaigala, M. Georgiadis, and E. Delamarche, "Micro-immunohistochemistry using a microfluidic probe," *Lab Chip*, vol. 12, no. 6, pp. 1040–1043, 2012, doi: 10.1039/c2lc21016a.
- [93] K. V. Christ and K. T. Turner, "Design of hydrodynamically confined microfluidics: Controlling flow envelope and pressure," *Lab Chip*, vol. 11, no. 8, pp. 1491–1501, 2011, doi: 10.1039/c0lc00416b.
- [94] M. Safavieh, M. A. Qasaimeh, A. Vakil, D. Juncker, and T. Gervais, "Two-aperture microfluidic probes as flow dipole: Theory and applications," *Sci. Rep.*, vol. 5, 2015, doi: 10.1038/srep11943.
- [95] M. A. Qasaimeh, T. Gervais, and D. Juncker, "Microfluidic quadrupole and floating concentration gradient," *Nat. Commun.*, vol. 2, no. 1, 2011, doi: 10.1038/ncomms1471.
- [96] J. Autebert, A. Kashyap, R. D. Lovchik, E. Delamarche, and G. V. Kaigala, "Hierarchical hydrodynamic flow confinement: Efficient use and retrieval of chemicals for microscale chemistry on surfaces," *Langmuir*, vol. 30, no. 12, pp. 3640–3645, 2014, doi: 10.1021/la500875m.
- [97] A. T. Brimmo, A. Menachery, P. Sukumar, and M. A. Qasaimeh, "Noncontact Multiphysics Probe for Spatiotemporal Resolved Single-Cell Manipulation and Analyses," *Small*, vol. 17, no. 24, 2021, doi: 10.1002/smll.202100801.

- [98] T. Gervais and E. Boulais, “Two-dimensional convection – diffusion in multipolar flows with applications in microfluidics and groundwater flow,” vol. 122001, no. September, 2020, doi: 10.1063/5.0029711.
- [99] A. Brimmo, P. A. Goyette, R. Alnemari, T. Gervais, and M. A. Qasaimeh, “3D Printed Microfluidic Probes,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-29304-x.
- [100] D. P. Taylor, I. Zleaf, R. D. Lovchik, and G. V. Kaigala, “Centimeter-Scale Surface Interactions Using Hydrodynamic Flow Confinements,” *Langmuir*, vol. 32, no. 41, pp. 10537–10544, 2016, doi: 10.1021/acs.langmuir.6b02983.
- [101] Q. Zhang, S. Feng, W. Li, T. Xie, W. Zhang, and J. Lin, “In Situ Stable Generation of Reactive Intermediates by Open Microfluidic Probe for Subcellular Free Radical Attack and Membrane Labeling,” *Angew. Chemie*, vol. 133, no. 15, pp. 8564–8568, 2021, doi: 10.1002/ange.202016171.
- [102] H. Bruus, “5.5 Taylor dispersion; a convection-diffusion example,” in *Theoretical Microfluidics*, Oxford University Press, 2008, pp. 100–105.
- [103] P. Goyette, É. Boulais, and M. Tremblay, “Supplementary Information Pixel-based open-space microfluidics for versatile surface processing Table of Content,” doi: 10.1073/pnas.2019248118.
- [104] B1ONUMB3R5, “Volume of a typical cell.” [https://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?id=105906&ver=2&trm=mammal+cell+size&org=.](https://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?id=105906&ver=2&trm=mammal+cell+size&org=)
- [105] “What is the size range of mammalian cells?,” [Online]. Available: <https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/What-is-the-size-range-of-mammalian-cells>.
- [106] S. Govind, V. Kaigala, I. Pereiro, and A. F. Khartchenko, “Nip the bubble in the bud: a guide to avoid gas nucleation in microfluidics,” *Lab Chip*, 2019, doi: 10.1039/c9lc00211a.
- [107] G. Zhang, V. Gurtu, S. R. Kain, and G. Yan, “Annexin V-FITC Binding Assay,” *Biotechniques*, vol. 25, no. September, pp. 525–531, 1997, [Online]. Available: https://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00011/97233pf01_11715a.pdf.

- [108] M. D. Rand *et al.*, “Calcium Depletion Dissociates and Activates Heterodimeric Notch Receptors,” vol. 20, no. 5, pp. 1825–1835, 2000.
- [109] E. M. Hansson, I. Teixeira, and M. V Gustafsson, “Recording Notch Signaling in Real Time,” pp. 118–127, 2006, doi: 10.1159/000090758.
- [110] B. E. Housden *et al.*, “Transcriptional Dynamics Elicited by a Short Pulse of Notch Activation Involves Feed-Forward Regulation by E(spl)/Hes Genes,” *PLoS Genet.*, vol. 9, no. 1, pp. 13–16, 2013, doi: 10.1371/journal.pgen.1003162.
- [111] H. M. T. Choi, V. A. Beck, and N. A. Pierce, “Next-generation *in situ* hybridization chain reaction: Higher gain, lower cost, greater durability,” *ACS Nano*, vol. 8, no. 5, pp. 4284–4294, 2014, doi: 10.1021/nn405717p.
- [112] H. M. T. Choi *et al.*, “Mapping a multiplexed zoo of mRNA expression,” *Dev.*, vol. 143, no. 19, pp. 3632–3637, 2016, doi: 10.1242/dev.140137.
- [113] H. M. T. Choi *et al.*, “Third-generation *in situ* hybridization chain reaction: Multiplexed, quantitative, sensitive, versatile, robust,” *Dev.*, vol. 145, no. 12, 2018, doi: 10.1242/dev.165753.
- [114] R. M. Dirks and N. A. Pierce, “Triggered amplification by hybridization chain reaction,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 43, pp. 15275–15278, Oct. 2004.

ANNEXE A SUPPLÉMENTS AU CHAPITRE 3

A.1 Expérience de PCD en fréquence avec période = 10 s

On constate visuellement que l'intensité de fluorescence dans les pixels ne varie pas dans le temps. Aussi, un canal d'aspiration s'est bouché pendant l'expérience.

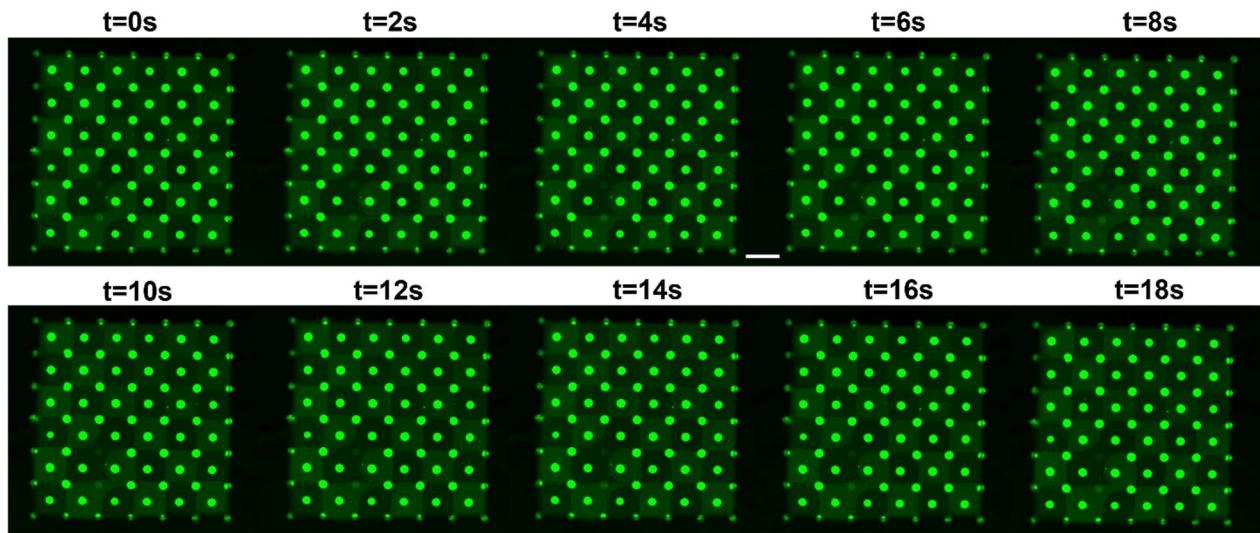


Figure A.1.1 Pulsations de réactif avec un PCD 6x6. Période = 10 s, RC 1 = 25%, RC 2 = 50%, $q = 0,3 \mu\text{L/s}$, barre d'échelle = 1 mm.

A.2 Facteur de correction pour la taille des pétales

On a vu que les débits dans la configuration fleur sont liés par :

$$Q_{asp} = n \alpha q_{inj} \times f_c(n)$$

Lorsque n varie, on varie donc en temps réel le débit d'aspiration total au centre de la fleur. Les tableaux ci-dessous présentent les facteurs correctifs $f_c(n)$ trouvés pour la configuration fleur à 10 pétales et à 6 pétales.

n	f_c	Q_{asp}
10	1	7,5
9	1,07	7,2225
8	1,16	6,96
7	1,31	6,8775
6	1,5	6,75
5	1,72	6,45
4	2,12	6,36
3	2,75	6,1875
2	4,05	6,075
1	7,9	5,925

Tableau A.2.1 Facteurs correctifs utilisés pour la fleur à 10 pétales. Selon le nombre de pompes-seringues actives (n) et exemple de Q_{asp} correspondant pour $q_{inj} = 0,5 \mu\text{L/s}$ et $\alpha = 1,5$.

n	f_c	Q_{asp}
6	1	3,12
5	1,17	3,042
4	1,4	2,912
3	1,75	2,73
2	2,55	2,652
1	4,8	2,496

Tableau A.2.2 Facteurs correctifs utilisés pour la fleur à 6 pétales. Selon le nombre de pompes-seringues actives (n) et exemple de Q_{asp} correspondant pour $q_{inj} = 0,4 \mu\text{L/s}$ et $\alpha = 1,3$.

A.3 Afficheur fleur 10 pétales en fréquence

Les temps d'ouvertures semblent être d'un peu plus de 10s, mais il est aussi possible que la véritable taille des pétales n'est jamais complètement atteinte avant que ceux-ci ne se referment (voir Figure A.3). Les pétales restent très minces. Ce qu'il faut remarquer de cette expérience, c'est plutôt le temps de fermeture des pétales. Lorsqu'un pétales se ferme, il laisse en effet une longue

traînée diffusive de fluorescéine qui prend du temps à disparaître. C'est le principal désavantage d'utiliser un grand rayon pour la fleur (dans ce cas-ci $r = 2$ mm). En effet, quand une injection se ferme, on veut que le réactif soit aussitôt aspiré par le centre, et non pas diffusé dans l'interstice, ce qui impliquerait une perte de précision temporelle et de dosage au niveau des cellules traitées.

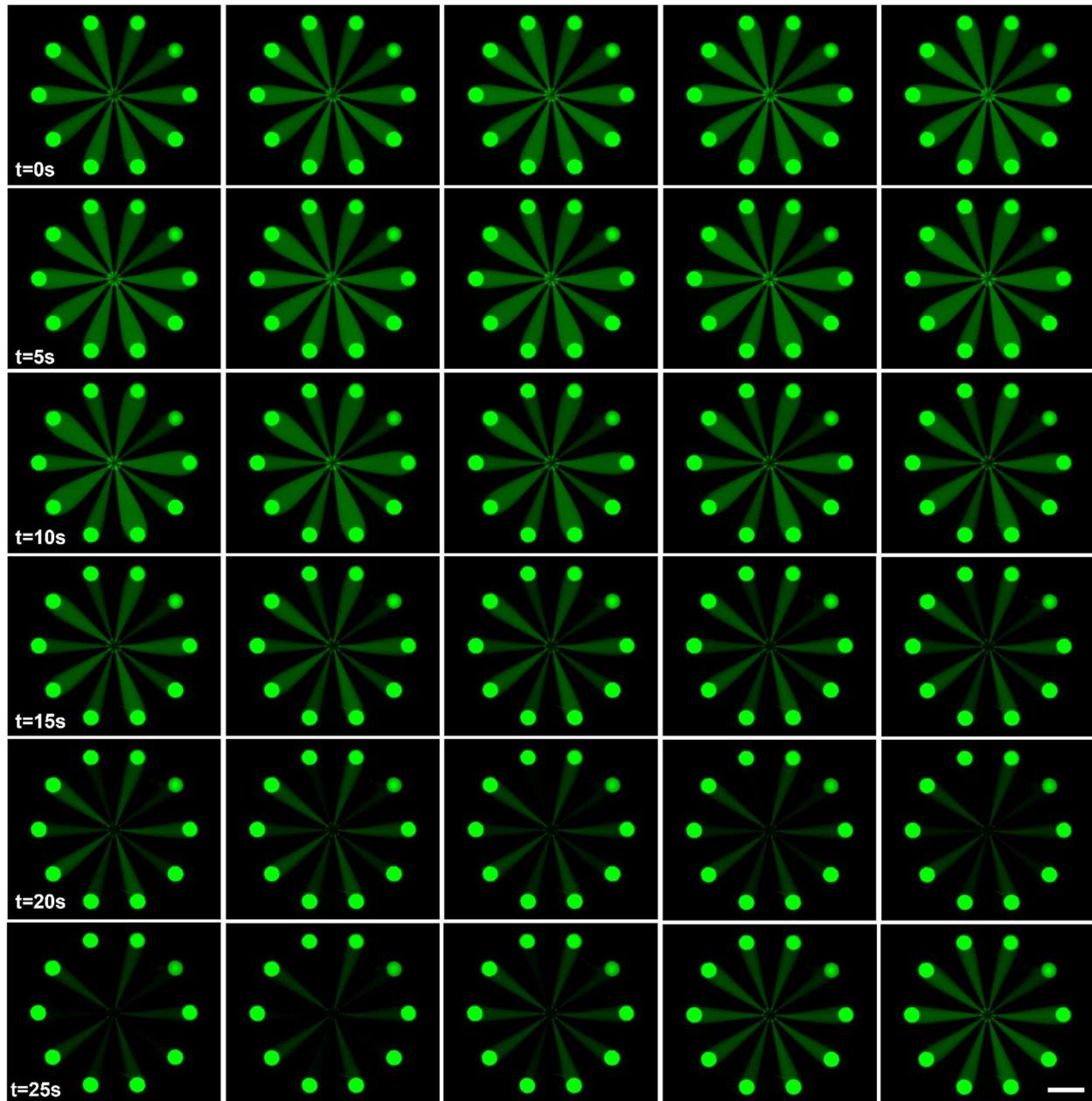


Figure A.3.1 Expérience préliminaire de pulsation de réactif avec l'afficheur fleur à 10 pétales. Période = 30 s, $RC1 = 25\%$, $RC2 = 50\%$, $\alpha = 1,5$ et $q_{inj} = 1 \mu\text{L/s}$, barre d'échelle = 1 mm.

A.4 Aire de confinement et longueur de diffusion

On a vu que la configuration fleur modifie la géométrie du dipôle. On peut facilement constater cet effet sur l'aire de confinement du fluide. On définit l'aire de confinement par l'aire dans l'enveloppe créée par la ligne de courant passant par le point de stagnation du dipôle [94]. On peut alors retrouver l'aire de confinement en traçant les lignes de courant numériquement et en intégrant sous la courbe formant le contour de l'écoulement. Les graphiques ci-dessous montrent l'aire de confinement pour le dipôle et pour un pétale dans une configuration fleur à 6 pétales, avec $G = 50 \mu\text{m}$ et $q_{inj} = 0,5 \mu\text{L/s}$ dans les deux cas (voir Figure A.4.1 et A.4.2). Il s'agit d'une autre preuve qu'un pétale agit comme un dipôle compressé, comme pour les mêmes paramètres l'aire du dipôle est beaucoup plus grande.

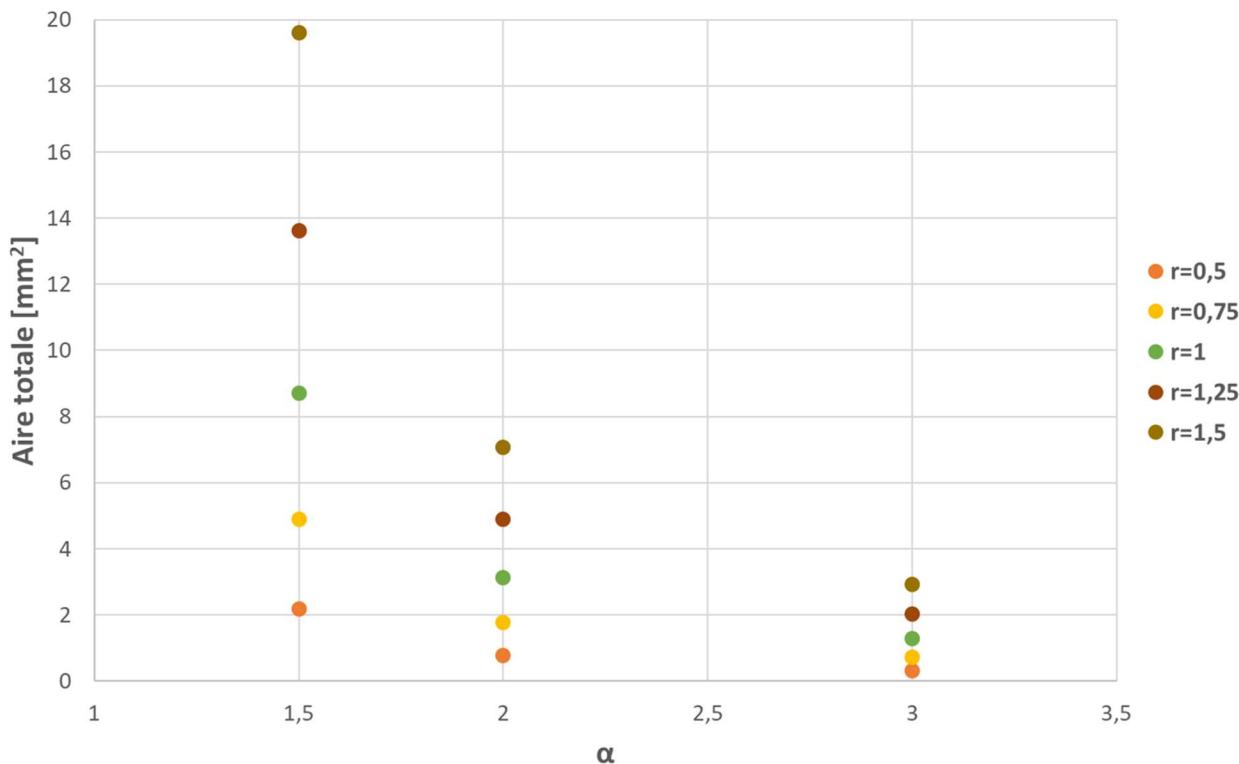


Figure A.4.1 Aire de confinement de l'écoulement pour un dipôle selon α et la distance r entre l'aspiration et l'injection. Résultats théoriques calculés selon [94].

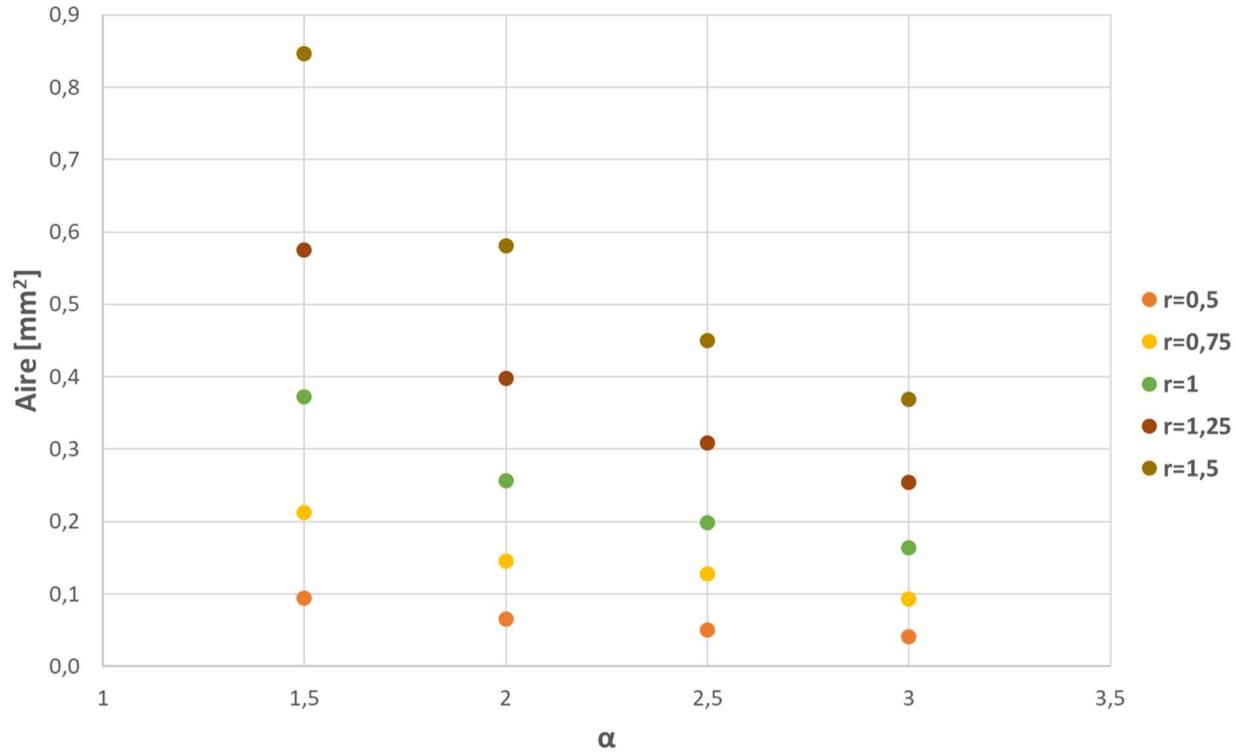


Figure A.4.2 Aire de confinement de l’écoulement pour un pétale en configuration fleur selon α et le rayon r . Résultats théoriques calculés à partir des lignes de courant tracées numériquement sur Matlab.

Dans les calculs d’aire précédent, la diffusion est négligée. Or, là où le confinement du réactif s’arrête dans le HFC, il y a diffusion avec le média environnant. Pour décrire cette diffusion, les travaux précédents ont défini une longueur de diffusion (DL pour *Diffusion Length*), comme la distance entre les points de concentration 0,1 et 0,9 à l’extrémité du dipôle, soit [94]:

$$DL = \frac{1.28r}{\sqrt{Pe}}$$

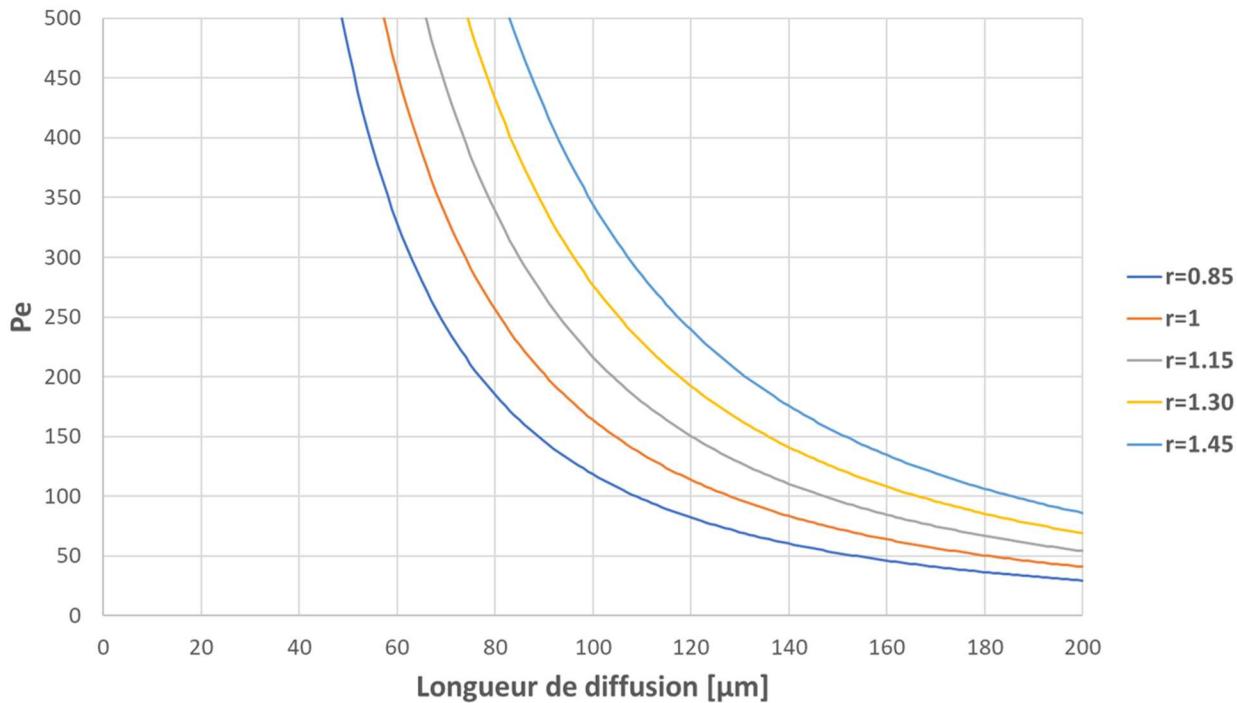


Figure A.4.3 Relation entre la longueur de diffusion et le nombre de Péclet dans le cas du dipôle microfluidique. Mis en évidence pour différent r .

La longueur de diffusion reste généralement de quelques centaines de micromètres dans le cas du dipôle (voir Figure A.4.3). Dans le cas de la configuration fleur, bien que cela n'a pas été démontré, on s'attend à ce que cette longueur de diffusion soit encore plus faible, étant donné la compression géométrique subie par les pétales. C'est pourquoi la diffusion a été négligée dans mes analyses de l'aire de traitement sous les pétales.

A.5 Détails optimisation

La première des choses à faire était de cibler la plage d'intérêt des différents paramètres, pour réduire le nombre de possibilités. Pour le débit par exemple, le système de pompes-seringues impose un débit minimal de $0,072 \mu\text{L/s}$ avec des seringues 20 mL . On sait aussi que l'on veut minimiser le rayon de la fleur pour accélérer les temps de transition, tout en conservant une aire d'écoulement suffisante pour traiter un bon nombre de cellules. En référence, un rayon d'environ $750 \mu\text{m}$ avait été utilisé pour obtenir des temps de transition approchant la seconde (avec $G = 100 \mu\text{m}$) [23]. Quant à α , il tourne généralement autour de 2. En jouant autour de ces plages de valeur, j'ai pu évaluer Pe pour différentes combinaisons de paramètres (voir Figure A.5.1 et A.5.2).

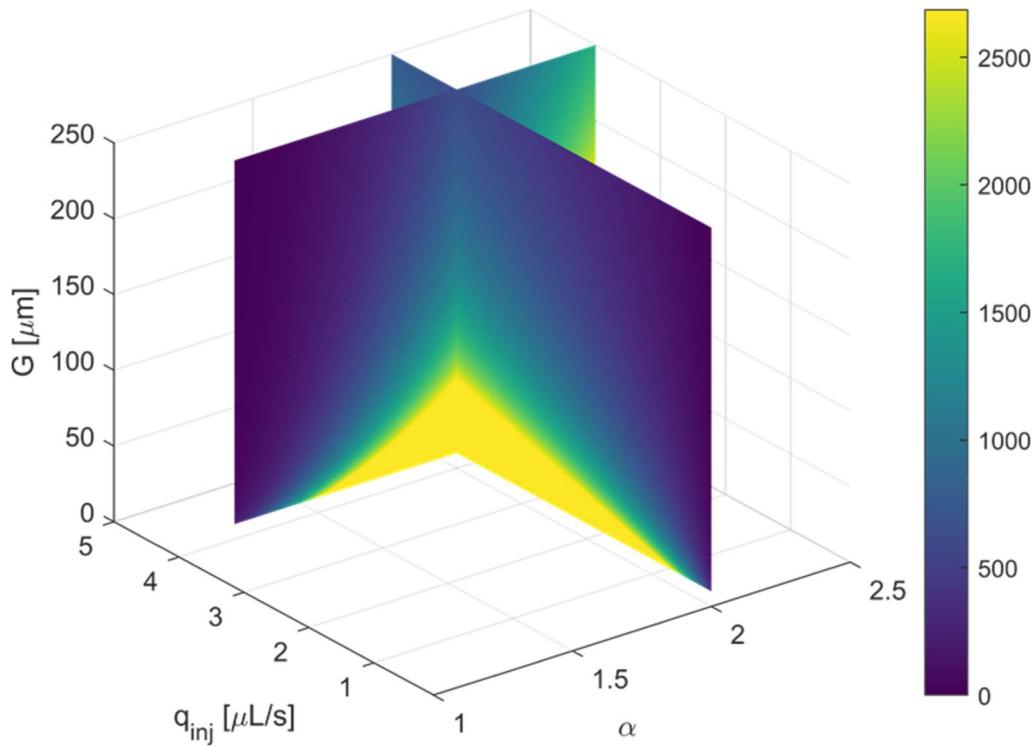


Figure A.5.1 Pe en fonction de α , q_{inj} et G.

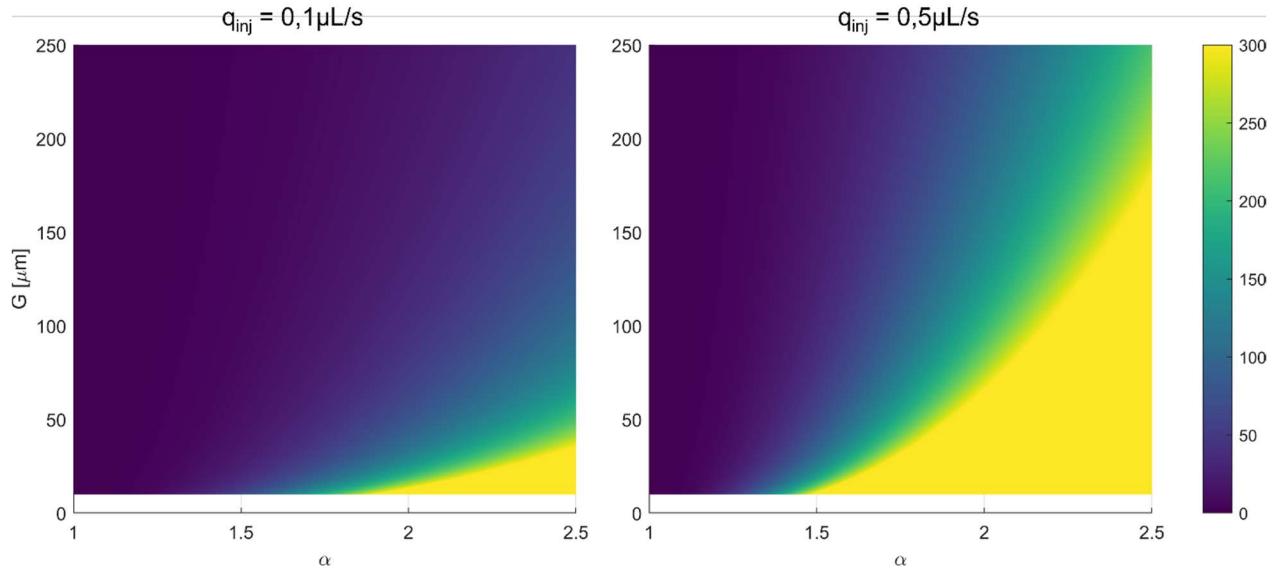


Figure A.5.2 Pe en fonction de α et G, pour $q_{inj} = 0,1 \mu\text{L/s}$ et $q_{inj} = 0,5 \mu\text{L/s}$.

En variant maintenant le nombre de Péclet pour évaluer le temps caractéristique t_0 d'ouverture, on voit que le Pe minimal à ne pas dépasser varie selon le rayon (voir Figure A.5.3). Pour une valeur

limite de t_0 de 15 s, le Pe minimal limite varie entre 100 et 200. Comme t_0 est calculé à partir de la loi d'échelle tirée du dipôle, on l'utilise surtout ici comme référence pour voir la tendance.

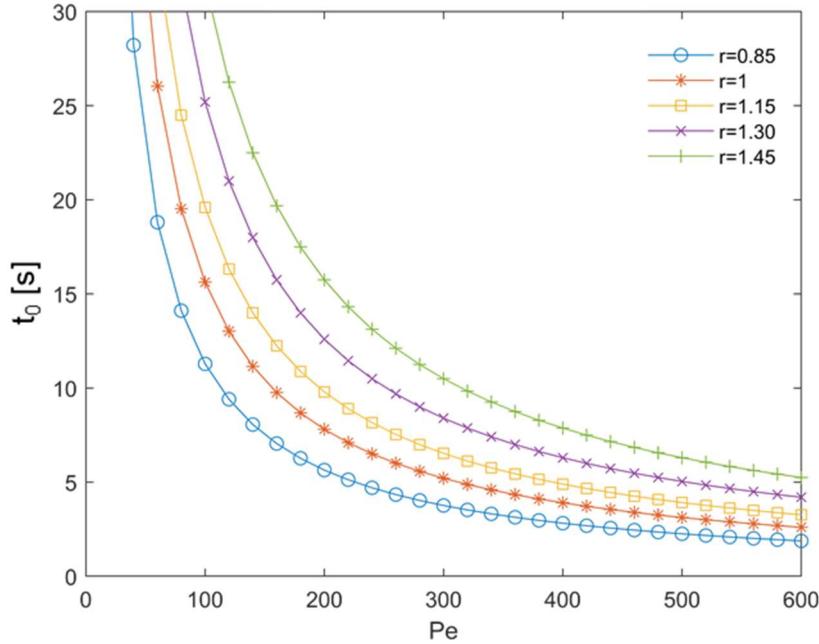


Figure A.5.3 Temps caractéristique t_0 en fonction de Pe (cas du dipôle).

Finalement, pour trouver une combinaison idéale des paramètres, j'ai fixé $\alpha = 2$ et testé numériquement, avec un code développé sur Matlab, plusieurs combinaisons d'utilisation de l'afficheur en variant q_{inj} , G et r . J'ai ensuite isolé les cas où l'aire totale sous 1 Pa était supérieure à $0,3 \text{ mm}^2$ et où le nombre de Péclet donnait un temps caractéristique t_0 inférieur à 15 s (par exemple $Pe = 130$ pour $r = 1,15 \text{ mm}$, voir Figure A.5.4).

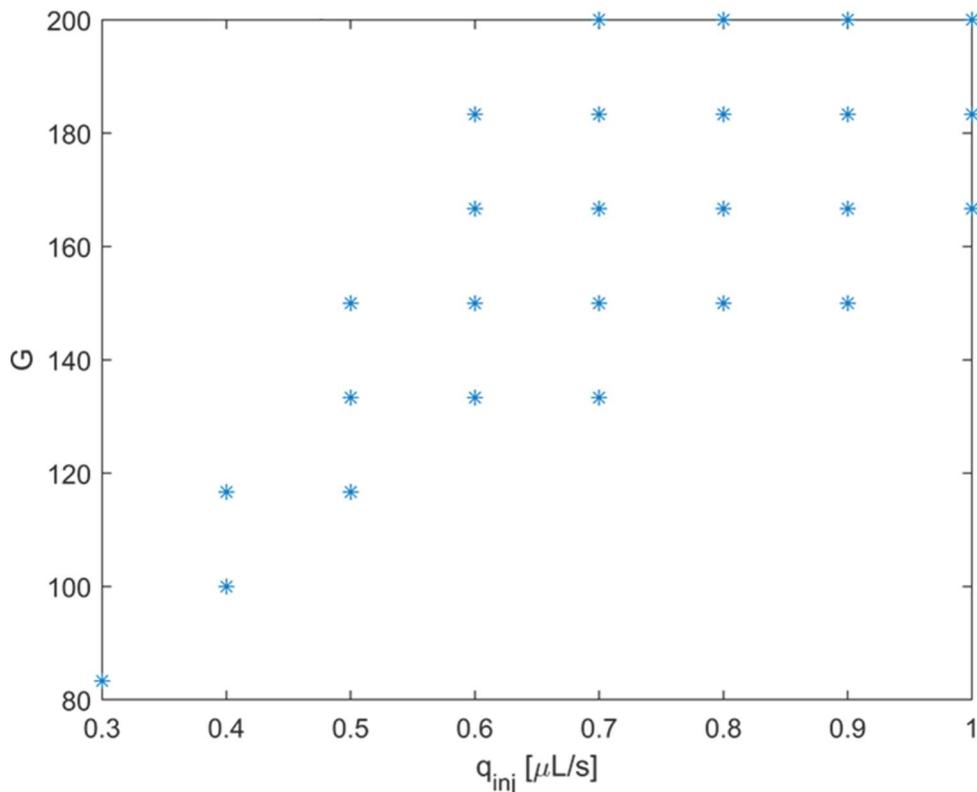


Figure A.5.4 Combinaisons de G et q_{inj} pour avoir $Pe \geq 130$ et $Aire \geq 0,3 \text{ mm}^2$, exemple pour $r = 1,15 \text{ mm}$. Tous les points représentent une solution possible.

Comme on veut aussi minimiser le débit (pour diminuer le cisaillement, mais aussi pour économiser sur le réactif injecté), le choix de design s'est arrêté sur $G = 100 \mu\text{m}$, avec $r = 1,15 \text{ mm}$.

ANNEXE B SUPPLÉMENTS AU CHAPITRE 4

B.1 Marquage Hoechst à 2 fréquences

Autre exemple d'utilisation de l'afficheur fleur pour le contrôle temporel de dose.

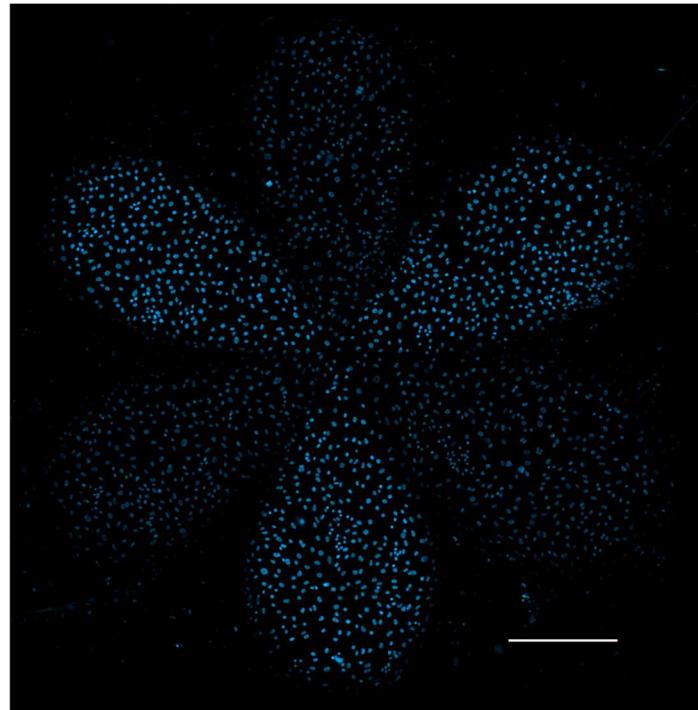


Figure B.1 Utilisation de l'afficheur fleur 6 pétales en triplicata de pétales. RC1 = 14 min, RC2 = 24 min, $\alpha = 1,3$ et $q_{inj} = 0,4 \mu\text{L/s}$, barre d'échelle = 500 μm .