

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri – Constantine 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire
Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

Thème

Mise en place de nouvelles biopuces intelligentes pour applications biotechnologiques

Présenté et soutenu par : AZIOUNE Bouchra

BOUKERCH Nada Elkaouther

Soutenu le 13 septembre 2018 devant le jury :

Présidente : Mme. BELLIL Ines. Maître de conférences classe A.

Promoteur : Mr. AZIOUNE Ammar. Directeur de Recherche (CRBt).

Examineur : Mr. SAHLI Salah. Professeur-UFMC.

Année Universitaire : 2017/2018



Remerciements

Nous avons eu la chance et le plaisir d'effectuer ce travail de recherche au Centre National de Recherche en Biotechnologie de Constantine, et nous tenons à remercier tout le personnel du centre pour leur accueil et leur soutien dans la construction de ce travail, et plus particulièrement les ingénieurs du laboratoire de la culture cellulaire et de la microbiologie.

Nous tenons à remercier très chaleureusement **Mr. AZIOUNE Ammar** qui nous a permis de bénéficier de son encadrement. Les conseils qu'il nous a prodigués, la patience, la confiance qu'il nous a témoignés ont été déterminants dans la réalisation de notre travail de recherche.

Nous tenons également à remercier **Mr. SAHLI Salah** et ses doctorants du laboratoire de Microsystème et Instrumentation de l'Institut de Zarzara-Constantine 1 d'avoir accepté nous ouvrir les portes de son laboratoire pour le traitement plasma de nos substrats.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Enfin, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, et surtout un grand merci à nos très chers parents.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre 1 : Partie Bibliographique

1. La microfabrication pour des applications biomédicales.....	3
1.1. Principales techniques de microfabrication.....	3
1.2. Comparaison des différentes techniques de lithographie.....	6
1.3. Impression par microcontact.....	9

Chapitre 2 : Partie Expérimentale

1. Procédé de fabrication du tampon.....	11
1.1. Fabrication du masque optique.....	11
1.2. Fabrication du moule.....	11
1.2.1. Moule de silicium.....	11
1.2.2. Résine photosensible.....	11
1.2.3. Étapes de fabrication du moule.....	12
1.3. Fabrication du tampon PDMS.....	14
1.3.1. PDMS.....	14
1.3.2. Étapes de fabrication du tampon.....	16
2. Impression par microcontact.....	18
2.1. Préparation des tampons.....	18
2.2. Lavage et traitement par plasma O ₂	19

2.2.1. Plasma électrique.....	19
2.2.2. Nettoyeur à plasma électrique	19
2.2.3. Étapes de lavage et traitement par plasma O ₂	20
2.3. Incubation et transfert de la Fibronectine / Fibrinogène Alexa 488.....	21
2.3.1. Fibronectine.....	21
2.3.2. Fibrinogène Alexa 488.....	23
2.3.3. Étapes de l'incubation et du transfert de la FN / Fg-488.....	23
3. Culture cellulaire.....	25
3.1. Lignée cellulaire.....	25
3.2. Lignée EMT6.....	26
3.3. Étapes de la culture cellulaire.....	26

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

1. Micropatronage de la FN / Fg-488 sur le verre.....	28
2. Adhésion cellulaire.....	30
Conclusions et Perspectives.....	35

Références bibliographiques

Résumé

Liste des tableaux

Tableau 1. Comparaison entre les techniques de lithographie conventionnelle et non conventionnelle.....	7
--	---

Liste des figures

Figure 1. Différentes techniques de la lithographie classique.....	4
Figure 2. Différentes techniques de la lithographie douce.....	5
Figure 3. Représentation schématique résume le procédé de l'impression par microcontact..	10
Figure 4. Représentation schématique des deux types de la résine photosensible.....	12
Figure 5. Étapes impliquées dans la production du moule par la photolithographie.....	14
Figure 6. Structure chimique du PDMS.....	14
Figure 7. Représentation 3D du PDMS.....	14
Figure 8. Représentation schématique des deux composants du Sylgard 184.....	15
Figure 9. Représentation schématique de la formation de ponts réticulés entre les différentes chaînes de polymères.....	16
Figure 10. Production de tampon PDMS.....	17
Figure 11. Décollement de la couche PDMS.....	17
Figure 12. PDMS après le décollement.....	17
Figure 13. Tampons avec les différentes formes des micromotifs.....	18
Figure 14. Nettoyeur à plasma électrique.....	20
Figure 15. Traitement des tampons et des lamelles par plasma O ₂	21
Figure 16. Structure de la fibronectine.....	22
Figure 17. Incubation de la FN / Fg-488 sur le tampon PDMS.....	23
Figure 18. Transfert de la FN / Fg-488 du tampon sur la surface de la lamelle.....	24
Figure 19. Cellules EMT6 en culture observées en contraste de phase par le microscope inversé.....	26

Figure 20. Images montrent la FN / Fg-488 imprimée sur des lamelles de verre traitées par plasma O₂ avec les différentes formes des micromotifs de tailles variées.....29

Figure 21. A- Micromotifs fluorescents en forme ronde de FN / Fg-488 avant l'incubation et l'adhésion cellulaire (en fluorescence). **B-** Cellules EMT6 adhérees sur les micromotifs en forme ronde de la FN / Fg-488 après 2 heures d'incubation (en contraste de phase). **C-** Gros plan des cellules EMT6 adhérees sur les micromotifs ronds (en contraste de phase).....31

Figure 22. A- Micromotifs fluorescents en forme d'ananas de FN / Fg-488 avant l'incubation et l'adhésion cellulaire (en fluorescence). **B, C, D-** Cellules EMT6 adhérees sur les micromotifs en forme d'ananas de la FN / Fg-488 après 2 heures d'incubation (en contraste de phase).....32

Figure 23. A- Micromotifs fluorescents en forme de champignon de FN / Fg-488 avant l'incubation et l'adhésion cellulaire (en fluorescence). **B, C-** Cellules EMT6 adhérees sur les micromotifs en forme de champignon de la FN / Fg-488 après 2 heures d'incubation (en contraste de phase). **D-** Gros plan d'une cellule EMT6 adhéree sur le motif champignon (en contraste de phase).....33

Figure 24. A- Lignes fluorescentes de FN / Fg-488 avant l'incubation et l'adhésion cellulaire (en fluorescence). **B, C-** Cellules EMT6 adhérees sur les lignes de la FN / Fg-488 après 2 heures d'incubation (en contraste de phase). **D-** Cellules EMT6 adhérees sur les lignes de la FN / Fg-488 et les zones non imprimées après 48 heures d'incubation (en contraste de phase).....34

Liste des abréviations

μCP: Microcontact Printing.

μTM: Microtransfer Molding.

2D: Deux Dimensions.

3D: Trois Dimensions.

ABS: Acrylonitrile Butadiene Styrene.

ATCC: American Type Culture Collection.

Au: Or.

CA: Cellulose Acetate.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

E-beam: Electron-beam.

EMT6: Experimental Mammary Tumour-6.

FBS: Fetal Bovine Serum.

Fg-488: Fibrinogène Alexa fluor 488.

FN: Fibronectine.

MIMIC: Micromolding in Capillaries.

NIL: Nanoimprint Lithography.

PBS: Phosphate Buffered Saline.

PDMS: Polydiméthylsiloxane.

PLL-g-PEG: Poly-L-Lysine-graft-Poly-Ethylene-Glycol.

PMMA: Poly Methyl Methacrylate.

PS: Polystyrène.

PSM: Poste de Sécurité Microbiologique.

PU: Polyuréthane.

SAMIM: Solvent-Assisted Micromolding.

SAMs: Self-Assembled Monolayers.

SiO₂: Dioxyde de Silicium.

Introduction

A la croisée de la biologie, de la biochimie, de l'électronique et de la mécanique des fluides, de nombreuses recherches sont actuellement menées dans le domaine de la santé afin de développer différentes méthodologies utilisées en recherche biomédicale.

Actuellement, la recherche et développement de nouveaux médicaments et leur évaluation toxicologique, *in-vitro*, sont réalisées principalement sur des cellules en culture dans des microplaques multi-puits. Ces microplaques, en verre et/ou en plastique, sont traitées physiquement pour permettre une meilleure adhérence cellulaire. Malheureusement, une fois adhérentes sur la surface de ces microplaques, les cellules perdent leur structure phénotypique (taille, forme, polarité, etc.) [1], déjà assurée dans les conditions *in-vivo*, par les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. Il est donc primordial de se focaliser sur le développement de nouveaux outils pour une culture cellulaire « intelligente » afin de se rapprocher de plus en plus des conditions *in-vivo*.

En effet et depuis une dizaine d'années, la culture cellulaire a complètement changé d'outil grâce à l'adaptation des technologies issues de la microélectronique, comme la microfabrication, pour la mise en place de nouveaux systèmes miniaturisés qui pourrait offrir une meilleure solution pour résoudre le problème lié à la variabilité phénotypique [2].

Parmi les technologies de microfabrication les plus utilisées dans les laboratoires de biologie cellulaire moderne, la technologie d'Impression moléculaire, appelée « microcontact printing (μ CP) ». Cette technologie assure le contrôle à l'échelle micrométrique de la géométrie et la taille des cellules sur des substrats de culture cellulaire [3].

Nos travaux de recherche pour le stage de Master ont pour objectifs d'optimiser la technologie de μ CP afin d'imprimer les protéines d'adhésion (ex. Fibronectine) sur les surfaces de lamelles de verre, et de vérifier le succès de cette technologie par la culture d'une lignée cellulaire sur les mêmes lamelles.

Dans ce manuscrit, le premier chapitre sera consacré à une présentation bibliographique de l'ensemble des techniques de la lithographie. Une part importante sera dédiée à la description de la technologie de μ CP.

Ensuite, le deuxième chapitre sera focalisé sur la partie expérimentale en présentant la conception du tampon d'impression (dispositif de PDMS) et son utilisation pour le contrôle de la géométrie des cellules.

Enfin, les résultats obtenus seront présentés et discutés dans le troisième chapitre. Des conclusions et perspectives seront également présentées à la suite de ce chapitre.

Chapitre 1 :
Partie
Bibliographique

1. La microfabrication pour des applications biomédicales

La microfabrication a été initialement issue, dans les années 70, de la micro-électronique qui est la première industrie mondiale moderne [4]. Les axes de la recherche étaient de poursuivre la course vers la miniaturisation des systèmes d'analyse intégrés qui permet de manipuler des fluides à faible volume dans des microsystèmes. Cependant les procédés de fabrication associée ont été incompatibles avec le monde vivant et n'ont été pas dédiés pour les analyses biologiques.

Puis le progrès réalisé dans le domaine de nanotechnologie a permis l'émergence de nouvelles perspectives innovantes et performantes qui ont été rapidement proposées pour des applications à grand public (biologique, thérapeutique ou chimique) [5,6].

1.1. Principales techniques de microfabrication

Une série de techniques ont été incluses dans le domaine de microfabrication comme des candidats promoteurs pour la biologie. Il s'agit des techniques de modelage basées sur le même principe qui est le transfert d'une image d'un masque vers un substrat. Ces techniques ont été réparties dans deux approches :

a- Approche classique

L'approche classique est appelée Top-Down, appelée aussi la lithographie conventionnelle, elle consiste à structurer un matériau déposé en couche mince par lithographie et gravure en impliquant une interaction entre un faisceau incident de photon, électron...etc, et un substrat solide dont la structure est modifiée chimiquement par cette interaction [7]. Les différentes extensions de cette approche sont présentées dans la figure 1 ci-dessous.

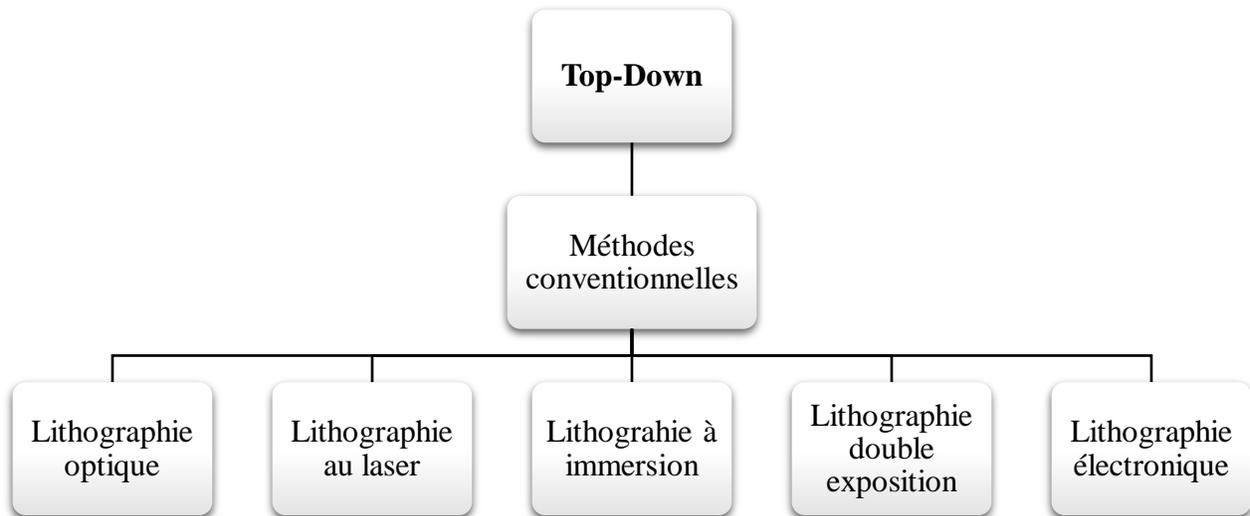


Figure 1. Différentes techniques de la lithographie classique.

Les techniques de photolithographies les plus récentes sont capables de produire en masse des structures à motifs dans des pellicules minces de photorésist avec des tailles aussi petites que d'environ 250 nm [8,9] et il est possible que la même technologie puisse être étendue aux caractéristiques aussi faibles que 100 nm à l'avenir. Les autres techniques sont actuellement explorées comme substituts potentiels de la photolithographie conventionnelle dans le régime inférieure à 100 nm [7,10]. Ces techniques ont la capacité de générer de très petites caractéristiques (aussi petites que quelques nm), mais leur développement en méthodes de production de masse (ou de fabrication) de nanostructures nécessite encore beaucoup d'efforts.

Bien que la photolithographie soit la technologie dominante, même pour de grandes caractéristiques mais elle n'est pas la meilleur et l'unique solution pour toutes les applications surtout le domaine de la santé.

b- Approche alternative

La technologie la plus populaire et alternative aux autres technologies de photolithographie, appelée lithographie molle «soft lithography » a été développée par Pr. George Whitesides dans les années 90 à Harvard. La technologie consiste à créer des structures par impression direct (contact physique) avec un substrat à une taille nanométrique [11]. Cependant la combinaison de ces deux données (la lithographie et l'impression) a donné naissance à l'impression par microcontact. Depuis son invention, de nombreuses dérivées de la lithographie douce ou molle ont été explorées. En effet, Gates et ces collègues ont proposés de les répartir en trois catégories : Moulage par réplcation, emboutissage et impression [12] (voir la figure 2).

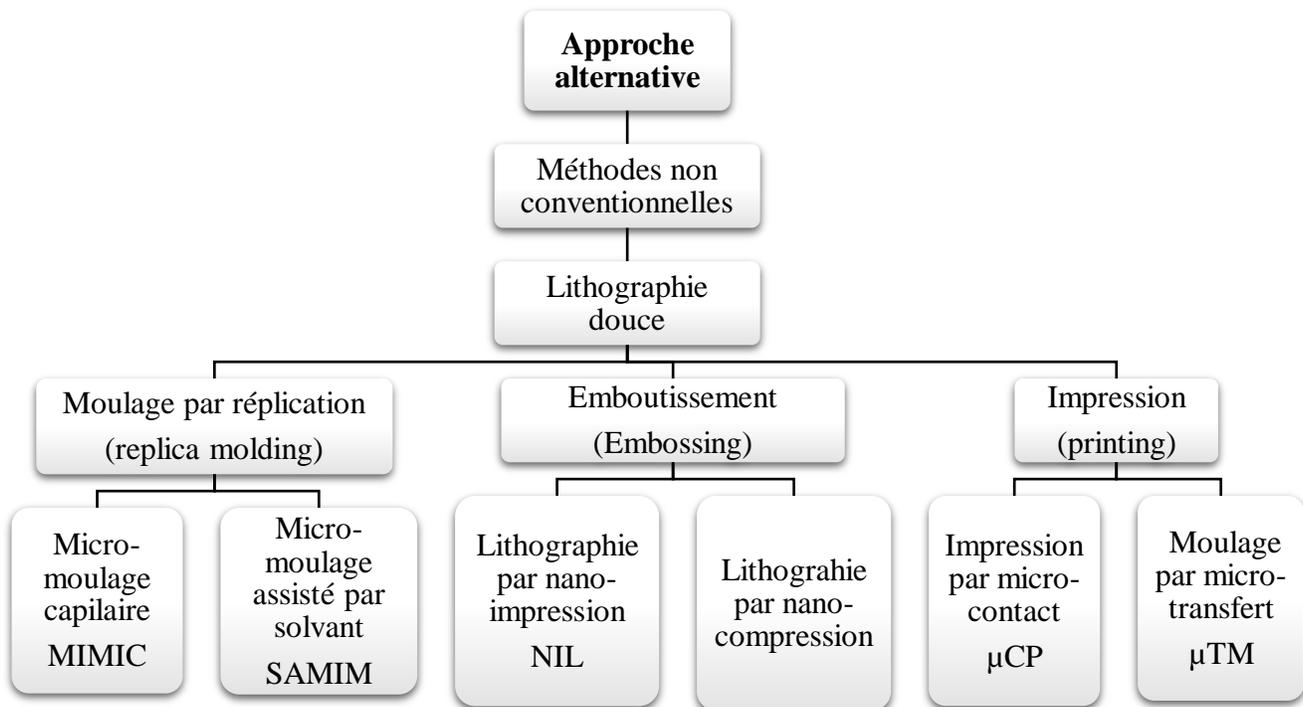


Figure 2. Différentes techniques de la lithographie douce.

Ces méthodes partagent l'utilisation d'un élastomère à motifs comme tampon ou timbre pour générer des micromotifs et des microstructures.

1.2. Comparaison des différentes techniques de lithographie

Le tableau 1 regroupe les techniques de lithographie conventionnelle et non conventionnelle. Il décrit les principes, les processus, les matériaux, les applications et les limites de ces techniques.

On peut constater que les méthodes non conventionnelles sont plus compétitives que les méthodes conventionnelles en termes de résolutions. Notons que ces dernières sont plus coûteuses, techniquement plus complexes à mettre en œuvre et parfois trop lentes pour permettre une production de masse. Les méthodes non conventionnelles sont au contraire moins chères, plus rapides, plus faciles d'utiliser et elles offrent des outils de prototypage qui ne nécessitent pas le recours à des équipements coûteux (ex. salle blanche). De tels avantages font de la lithographie douce une excellente alternative face aux technologies de fabrication conventionnelles dans de nombreux domaines.

Certainement toutes ces techniques couvrent un grand nombre de nœuds technologiques. Elles sont néanmoins encore au stade de développement et les questions concernant les problèmes techniques restants à résoudre, par exemple la déformation du tampon élastomère, la densité des défauts dans le motif formé et la difficulté de l'enregistrement à haute résolution.

	Motif	Matériels	Surfaces	Limite de résolution	Taille minimale de motif	Avantages	Inconvénients
Méthodes conventionnelles	<ul style="list-style-type: none"> - Photo-masque rigide. - Motifs supportés sur une plaque de quartz [13]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Photorésist (polymères avec des additifs photosensibles) SAMs sur Au et SiO₂ [13]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Surfaces planaires. - Structure 2D [13]. 	<ul style="list-style-type: none"> - ~250 nm (projection). - ~100 nm (par μscopie en champ proche) [7,14]. - Lithographie optique (1μm). - Electronique (10nm). 	<ul style="list-style-type: none"> - ~100 nm - 30 à 500 nm [13]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Employer dans le secteur de l'électronique, optique et photonique. - Consiste plus spécifiquement en une reproduction d'image d'un masque sur un substrat recouvert d'une couche de résine photosensible. [7, 13, 15,16]. - Production de microplaques pour culture cellulaire. 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessite une salle blanche. - Equipements couteux. - Ne convient pas vraiment aux biologistes. - Les produits chimiques peuvent dénaturer les biomolécules [7, 13, 15, 16]. - Gravure lente. - Rendement faible.

<p>Méthodes non conventionnelles</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Moule en élastomère. - Un bloc à motifs sur une plaque de quartz avec des éléments de relief [13]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Photorésist SiO₂. - Polymères non sensibilisés (époxy, PU, PMMA, ABS, CA, PS). - Polymères précurseurs (aux carbones et céramiques) organiques et inorganiques. - Macro-molécules biologiques [13]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Planaire et non planaire (incurvé). - Les structures 2D et 3D [13]. 	<ul style="list-style-type: none"> - ~30 à 60 nm. - ~1 µm [7, 9,14]. 	<ul style="list-style-type: none"> - 100 nm [13]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Peu coûteuse, facile, simple, accessible à large éventail d'utilisation. - Contourne les limites de diffraction de la photolithographie à projection. - Accès à la structure 3D. - Utilise une variété de matériaux et de chimie de surface. - Contact conforme entre les substrats et le timbre. - Effectuer dans des conditions régulières de laboratoire. - Ne nécessite aucune expertise ni machinerie sophistiquée. - Utiliser à plusieurs reprises. - Utilisable dans les laboratoires de biotechnologie [7,13, 15, 16]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Déformation du tampon. - Sa résolution est limitée par la taille des motifs du moule en PDMS [7,13, 15, 16].
---	---	---	--	--	--	--	---

Tableau 1. Comparaison entre les techniques de lithographie conventionnelle et non conventionnelle.

Par souci de concision seule la technique de l'impression par microcontact sera développée par la suite de ce manuscrit car notre recherche est focalisée sur les méthodes les plus adaptées à l'application en laboratoire de biotechnologie. Bien évidemment le μ CP répond parfaitement au profil due à sa simplicité, rapidité et à faible coût.

1.3. Impression par microcontact

L'impression par microcontact ou microcontact printing (μ CP) est une technique de lithographie douce accessible [17], initialement introduite en 1993 par Kumar et Whitesides [18]. C'est une version sophistiquée d'un processus d'emboutissage simple, similaire à l'impression conventionnelle. Le μ CP implique également un tampon (généralement le polydiméthylsiloxane), une encre et un substrat. Contrairement aux colorants normalement utilisés pour l'impression, les encres pour le μ CP sont imprimées en couches monomoléculaires. Au lieu du papier, des vêtements ou du bois, les surfaces pour le μ CP sont généralement des substrats en métal, en silicium ou en verre ultra plats. La différence la plus remarquable entre l'impression conventionnelle et celle du μ CP réside dans la taille des motifs, qui est sub-micrométrique. En moins de deux décennies, le μ CP est apparu comme une méthode de laboratoire simple, rapide et bon marché pour la préparation de surfaces micro et nanostructurées. Idéalement, l'encre est transférée du tampon au substrat uniquement dans la zone de contact [19]. Le contact est dit conformationnel comme les propriétés élastiques du tampon lui permettent de faire un contact conforme [17].

À l'origine, le μ CP était utilisé pour imprimer des monocouches auto-assemblées d'alcanthiols sur des surfaces en or. Bien que cette technique fonctionne très efficacement, elle est coûteuse, inaccessible à la plupart des laboratoires de biologie et non optimale pour la microscopie optique. Par conséquent, l'utilisation de μ CP a été rapidement étendue à l'impression de protéines et de peptides sur une variété de substrats pour la culture cellulaire à savoir, le verre et le polystyrène (PS) [20].

En principe, Le μ CP comporte trois étapes principales : réalisation des moules, l'encrage et l'impression qui sont présentées dans la figure 3 [18].

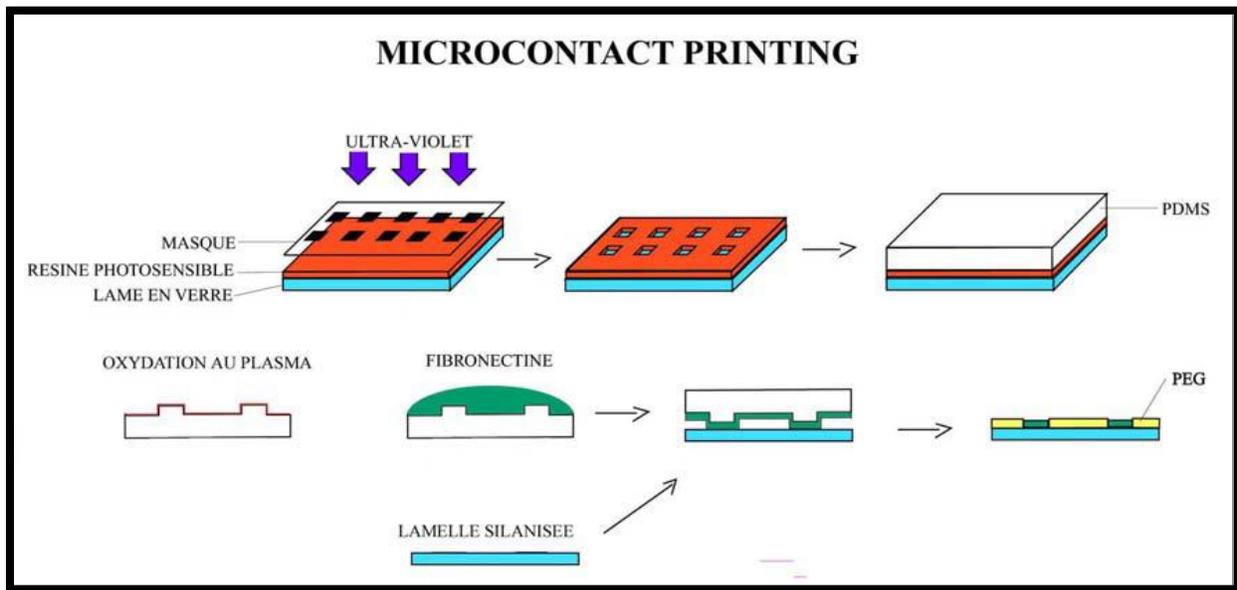


Figure 3. Représentation schématique résume le procédé de l'impression par microcontact [21].

Plusieurs études récentes ont été menées sur la compréhension de mécanisme de la technique ainsi que sur la définition de ses applications dans les domaines de la chimie de surface, de la microélectronique et de la biologie cellulaire [22,23] pour améliorer la modulation des liaisons des molécules transférées au substrat. Le μ CP confère plusieurs avantages :

- Elle a permis la réalisation de microstructures sur des surfaces planes [13], et par conséquent, la résolution de cette technique est limitée par la taille des motifs du moule en PDMS [16].
- Elle a été adaptée pour produire des surfaces planes destinées à la culture cellulaire afin de moduler la forme et la géométrie des cellules adhérentes. C'est une méthode de choix pour être implémentée dans un laboratoire de biologie dû à sa simplicité, sa robustesse, son faible coût [24].
- Elle est employée également pour l'étude des comportements cellulaires (adhésion, division, polarité, etc.) [25].

Des efforts se concentreront sur la «démocratisation» de la technologie au sein des laboratoires de biotechnologie en général, tout en offrant une meilleure résolution de molécule unique ; ce qui va ouvrir une brèche à de nouvelles applications innovantes.

Chapitre 2 :
Partie
Expérimentale

1. Procédé de fabrication du tampon

1.1. Fabrication du masque optique

Le masque optique est une plaque de quartz revêtue d'une couche de chrome qui a été gravée par faisceau d'électron (E-beam) pour obtenir les motifs souhaités de régions opaques et transparentes à partir d'un logiciel de dessin spécialisé et un format approprié pour la machine de pilotage du faisceau d'électron [21,26].

1.2. Fabrication du moule

1.2.1. Moule de silicium

Le moule de silicium ou « silicon master » c'est un film à motifs de résine photosensible sur une plaque de silicium, produit par photolithographie à partir d'un masque optique et une lumière ultraviolette qui transfère les motifs du masque à la résine photosensible à travers les régions transparentes. Il est utilisé pour mouler le tampon élastomère.

1.2.2. Résine photosensible

La résine photosensible (appelée aussi photorésine et parfois photorésist) est un matériau photosensible utilisé dans de nombreux procédés industriels, comme la photolithographie ou la photogravure afin de former un revêtement protecteur ajouré à la surface d'un substrat.

C'est un composé organique constitué pour l'essentiel de trois matériaux : une matrice (résine polymère), un composé photoactif et un solvant. Les propriétés de la résine sont altérées par des transformations photochimiques du matériau photoactif, la principale conséquence étant la modification de sa solubilité.

Il existe deux types de résine :

- La résine positive : est un type de résine photosensible pour laquelle la partie exposée à la lumière devient soluble au révélateur et ou la portion de résine photosensible non exposée reste insoluble.
- La résine négative : est un type de résine photosensible pour laquelle la partie exposée à la lumière devient insoluble au révélateur et ou la portion de résine photosensible non exposée reste soluble [27].

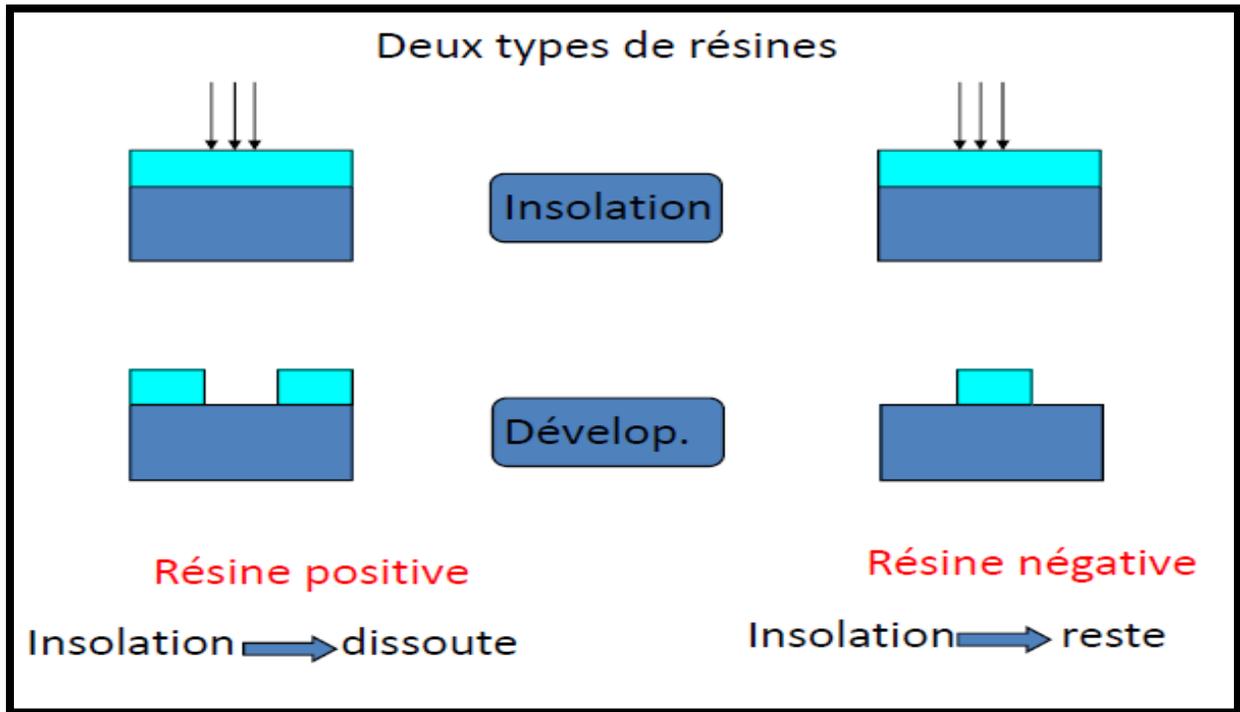


Figure 4. Représentation schématique des deux types de la résine photosensible [28].

1.2.3. Étapes de fabrication du moule

La fabrication du moule nécessite un équipement spécialisé (des installations nanolithographiques) et une formation, cependant le moule de photorésist désiré peut être acheté auprès des entreprises spécialisées qui fabriquent sur mesure des moules microstructurés à la demande. La fabrication d'un moule prend souvent beaucoup de temps dans sa conception, mais il peut être réutilisé indéfiniment pour produire les tampons élastomères [17,26].

La fabrication du moule se déroule en trois étapes principales :

a- Revêtement par une couche de photorésist

Le moule et le tampon de PDMS ont été fabriqués au Laboratoire de Microfluidique de l'Ecole Normale Supérieure (*ENS - Paris*), et en collaboration avec le laboratoire de Biologie cellulaire systémique de la polarité et de la division (*Institut Pierre Gilles de Gennes pour la Microfluidique - Paris*), respectivement dirigés par le Pr. Y. Chen et Dr. M. Piel.

Brièvement, la plaquette de silicium a été nettoyée dans un bain à ultrason pendant 10 min dans l'acétone, puis a été séchée dans un flux d'air filtré. Une fine couche de la résine photosensible a été revêtue sur la plaquette de silicium en utilisant une tournette (spin-coater) à 500 tr/min pendant 30 secondes puis 2000 tr/min pendant 30 secondes. La résine photosensible obtenue à une hauteur d'environ 5 μm , ce qui convient pour des caractéristiques de 4 à 10 μm de large. Après le revêtement, la couche de la résine photosensible a été séchée sous une hotte pendant 10 min, puis a été cuite sur une plaque chauffante ou un four pendant 1 min à 100°C pour évaporer le solvant qu'elle contient. A la fin, la plaquette a été refroidie sur le banc pendant 15 min.

b- Lithographie de la photorésist

Après la cuisson et le refroidissement, la couche de photorésist et le masque optique ont été placés en contact les uns avec les autres sur l'aligneur de masque et ont été exposés à la lumière ultraviolette (puissance UV 45 mW/cm^2 à 365 nm) pendant 10 secondes, puis la résine photosensible a été développée dans un révélateur dilué (un révélateur et quatre parties de H_2O) pendant 90 à 120 secondes, ensuite la plaquette a été rincée dans un bain d'eau distillée, ce qui arrête le processus de développement. A la fin, le moule de photorésist a été séché avec un flux d'air filtré. Parce que la résine utilisée est positive, les zones exposées à la lumière UV sont dissoutes dans le révélateur, créant les micro-caractéristiques.

c- Revêtement de la surface du moule de photorésist

Le moule de photorésist séché a été silanisé afin de l'empêcher d'adhérer au PDMS pendant la fabrication du tampon. Tout d'abord, le moule de photorésist a été placé dans un dessiccateur à vide avec un petit béccher contenant quelques gouttes de chlorotriméthylsilane, ensuite le vide a été maintenu pendant 30 min pour introduire la vapeur du chlorotriméthylsilane. Après, le moule de photorésist a été laissé silaniser pendant la nuit dans le dessiccateur scellé. A la fin, il a été placé pendant 30 min dans un four à 70°C pour consolider la silanisation [26,29].

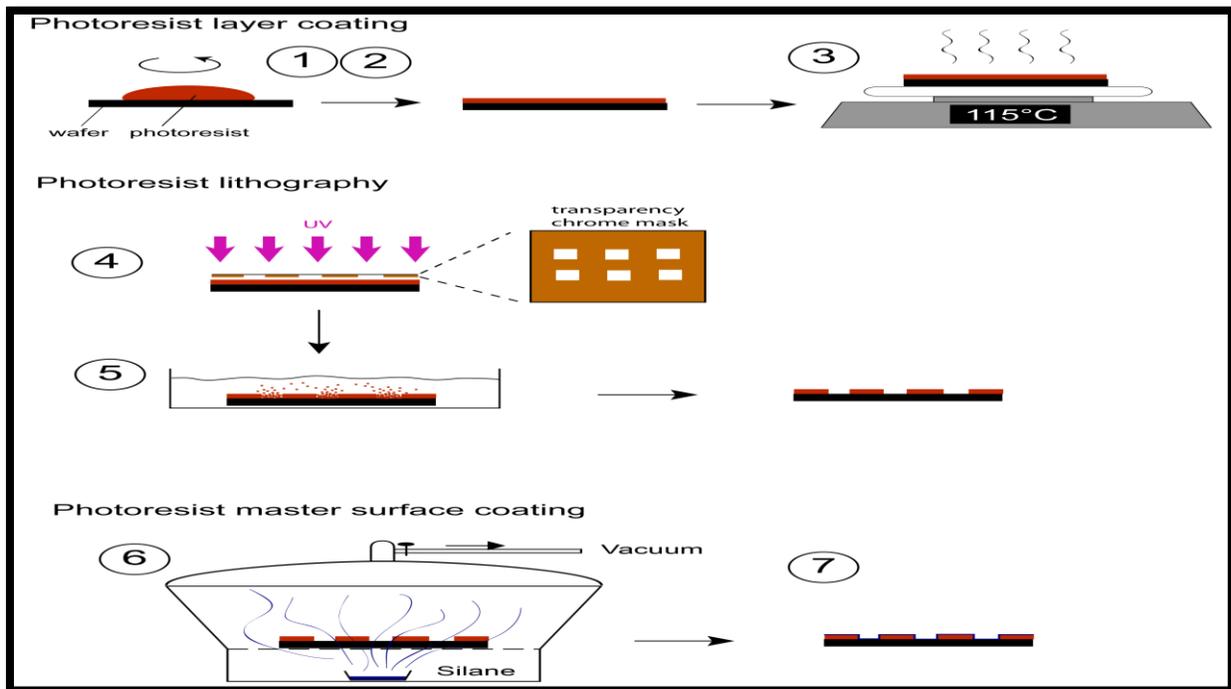


Figure 5. Étapes impliquées dans la production du moule par la photolithographie [26].

1.3. Fabrication du tampon PDMS

1.3.1. PDMS

PDMS abréviation de polydiméthylsiloxane, est un polymère flexible composé d'unités de siloxane répétées $\text{SiO}(\text{CH}_3)_2$.

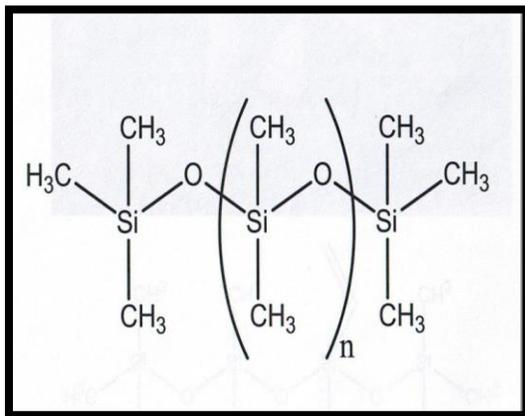


Figure 6. Structure chimique du PDMS [30].

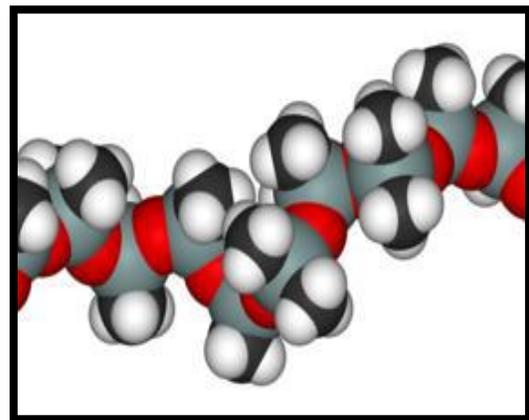


Figure 7. Représentation 3D du PDMS [30].

Le PDMS est peu coûteux, facilement moulé pour former des formes micrométriques [31] à cause de sa faible énergie de surface, à la flexibilité de la chaîne siloxane et aux faibles forces intermoléculaires entre les groupes méthyle [29], optiquement transparent à des longueurs d'onde supérieures à 280 nm, est produit par polymérisation à basse température, non toxique et peut être facilement scellé à de nombreux autres matériaux en établissant des contacts moléculaires avec la surface [31]. Ces caractéristiques en font de lui un matériau largement utilisé dans de nombreux procédés technologiques notamment pour la conception de canaux fluidiques et plus généralement pour la lithographie douce [11].

Le PDMS est disponible dans le commerce auprès de *Dow Corning* nommé *Sylgard 184*, sous forme de kit de base/agent de réticulation [11,31]. Le Sylgard 184 doit être préparé en mélangeant la base contenant l'oligomère PDMS et l'agent de réticulation (voir la figure 8) qui lui est formé de deux composés : un catalyseur en platine et un oligomère hydrogéné.

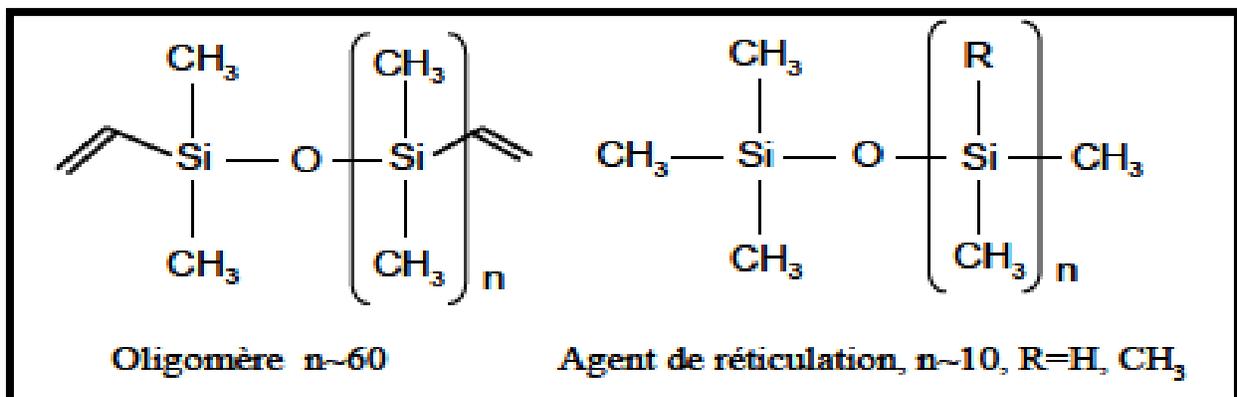


Figure 8. Représentation schématique des deux composants du Sylgard 184 [11].

Lorsque les deux composés sont mélangés la réticulation du polymère commence. Un phénomène appelé hydrosilylation est activé thermiquement et permet la formation de liaisons covalentes entre les groupes hydrosilanes (Si-OH) du polymère contenu dans l'agent de réticulation et les chaînes carbonées non saturées grâce à la présence du catalyseur en platine. Cette réaction conduit à la formation d'un réseau réticulé de chaînes polysilane (voir la figure 9) qui donne au PDMS ces propriétés élastomériques [11].

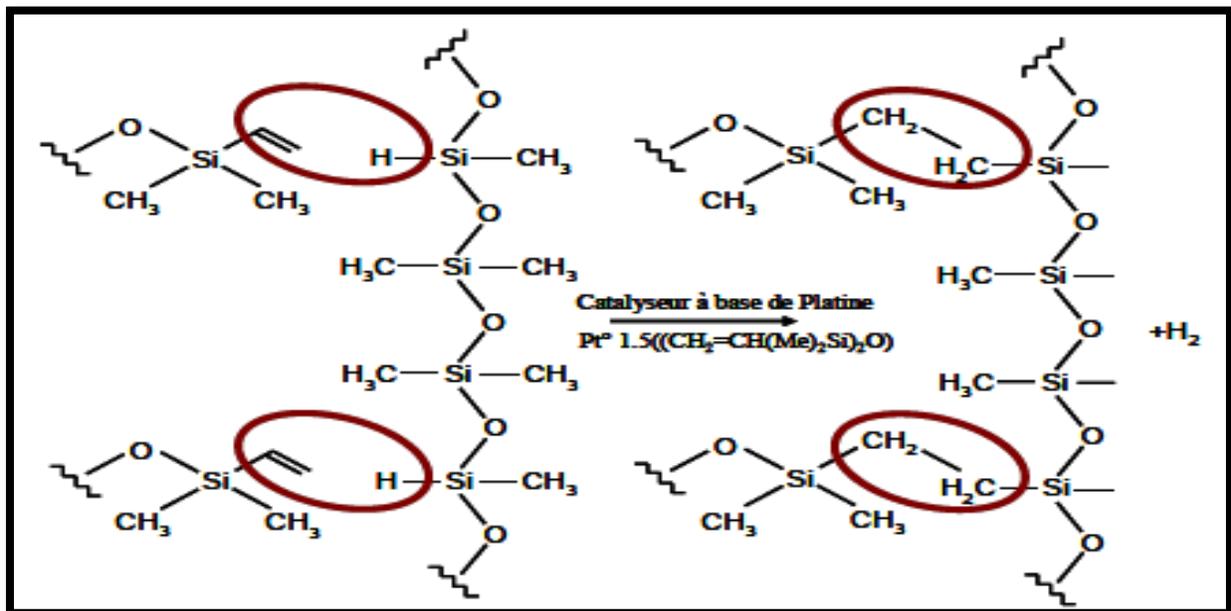


Figure 9. Représentation schématique de la formation de ponts réticulés entre les différentes chaînes de polymères [11].

1.3.2. Étapes de fabrication du tampon

Le PDMS (l'oligomère) et son agent de réticulation ont d'abord été combinés dans un rapport de 10:1 dans un béccher en plastique et ont été mélangés soigneusement en utilisant une cuillère en plastique, ensuite le mélange PDMS a été dégazé sous vide pour éliminer toutes les bulles d'air générées. Alternativement, le mélange a été centrifugé pendant 5 min à 3000 tr/min. Une couche épaisse de 5 mm de mélange PDMS dégazé a été coulée sur le moule de photorésist et cuite pendant 2 heures à 60°C dans un four. Finalement la couche PDMS a été décollée délicatement (voir les figures 10, 11).

Les tampons peuvent être conservés pendant des mois à l'abri de la poussière [26].

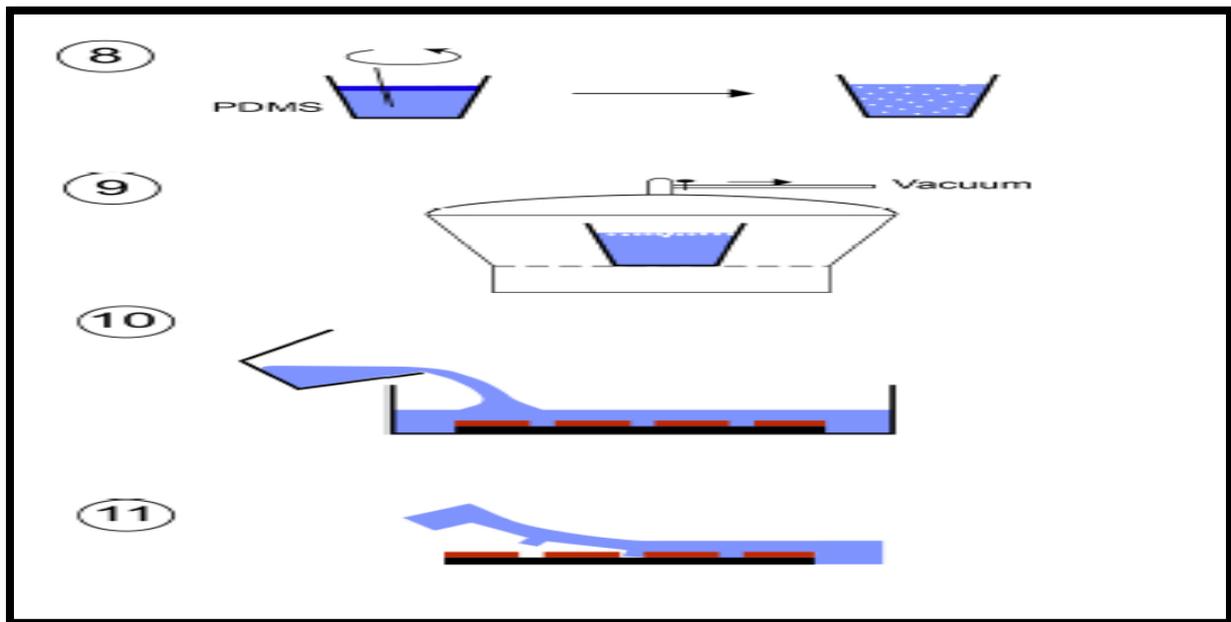


Figure 10. Production de tampon PDMS [26].



Figure 11. Décollement de la couche PDMS [32].

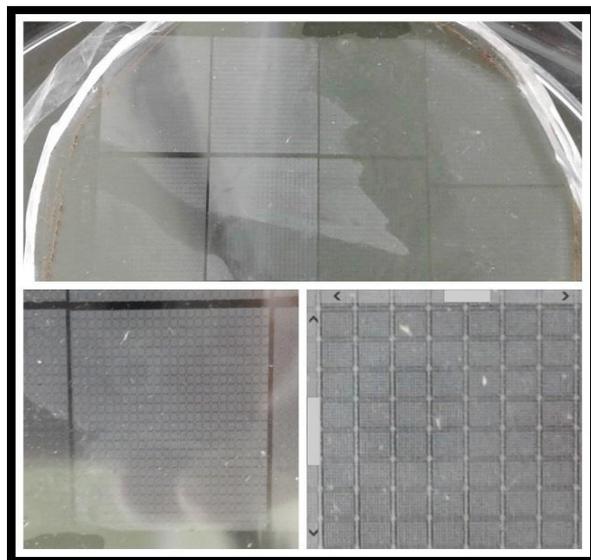


Figure 12. PDMS après le décollement.

2. Impression par microcontact

2.1. Préparation des tampons

À l'aide d'un microscope et d'une lumière transmise, les régions d'intérêt contenant les géométries des micromotifs désirés ont été localisés et avec un scalpel, les tampons de 1 cm² ont été découpés et excisés. La figure 13 montre les différentes régions d'intérêt contenant les différentes formes des micromotifs de tailles variées avec des dimensions minimales de 3-10 μm mais peut aller jusqu'à plusieurs dizaines de micromètres et une distance entre les micromotifs supérieure à 50 μm et sont entourées de cadres permettant une bonne tenue mécanique de l'ensemble au cours de l'impression [21,26].

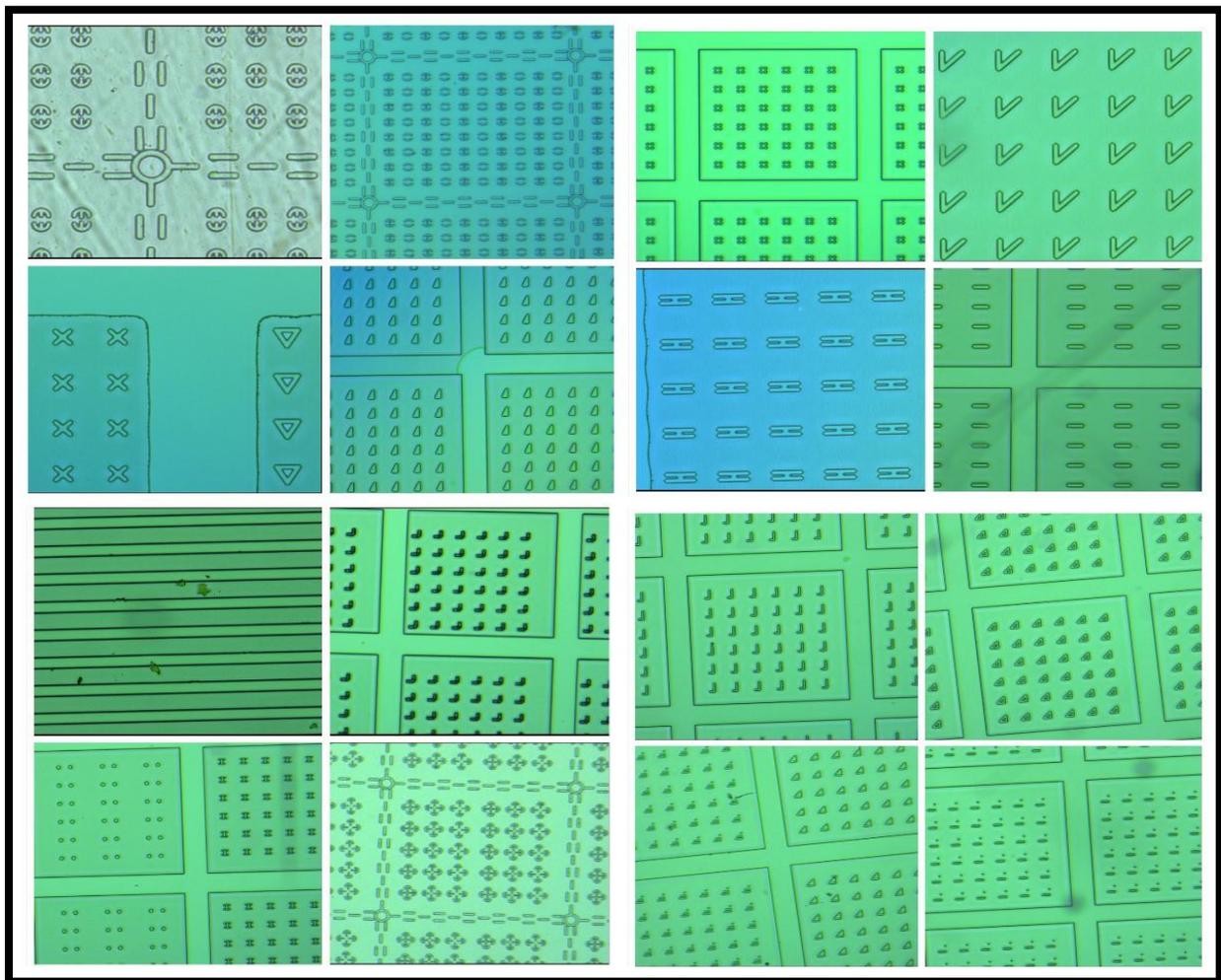


Figure 13. Tampons avec les différentes formes des micromotifs.

2.2. Lavage et traitement par plasma O₂

2.2.1. Plasma électrique

De nos jours, le terme plasma désigne un fluide ou un gaz partiellement ou totalement ionisé. Cet état a été décrit pour la première fois par le physicien britannique W. Crookes en 1879 comme « *un monde où la matière peut exister dans un quatrième état* ». Un demi-siècle plus tard, en 1928, I. Langmuir a défini ce quatrième état de la matière par le terme « *plasma* » par analogie avec le plasma sanguin. Un plasma est un gaz partiellement ionisé et électriquement neutre, constitué d'un grand nombre d'espèces chimiques : des ions (chargés négativement et en majorité positivement), des électrons, des radicaux, des photons, des espèces neutres, excitées ou métastables. Les plasmas ont des propriétés différentes (propriétés de transport, conductibilité électrique, etc.) de celles des gaz parfaits de par la présence des particules chargées (ions et électrons).

Les plasmas sont classifiés en trois catégories : les plasmas chauds, les plasmas thermiques et les plasmas froids. Leurs différentes grandeurs caractéristiques sont notamment l'énergie électronique du plasma, la densité électronique et le degré d'ionisation. Les densités des électrons et des ions positifs sont équivalentes [33].

2.2.2. Nettoyeur à plasma électrique

Le nettoyeur à plasma électrique c'est un dispositif de traitement utilisé pour le nettoyage et l'activation de surface de la plupart des matériaux tels que : plastique, métaux, verre...etc [34]. Le nettoyeur à plasma (électrique) que nous avons utilisé est constitué principalement de :

- Un générateur plasma.
- Une chambre sous vide (enceinte) : cylindrique, transparente et contient à l'intérieur deux électrodes superposées.
- Deux pompes à vide : pompe primaire et secondaire pour l'obtention du vide dans la chambre.
- Une bouteille de gaz (généralement d'oxygène).



Figure 14. Nettoyeur à plasma électrique.

2.2.3. Étapes de lavage et traitement par plasma O₂

Les tampons de 1 cm² préparés et les lamelles de verre (20 × 20 mm) ont été lavés à l'éthanol (95%) et l'ultrason pendant 15 min, puis ont été séchés avec un séchoir de laboratoire ou laissés sécher sous la hotte pendant une heure. Les tampons et les lamelles séchés ont été placés dans le nettoyeur et exposés au plasma O₂ pendant 1 min / 3 min respectivement à 40 W (voir la figure 15). Le traitement par plasma O₂ permet d'hydrophiliser la surface du PDMS initialement hydrophobe. L'hydrophilisation est dû à l'existence des terminaisons silanol (Si-OH), malheureusement elle est transitoire, car l'élastomère subit une récupération hydrophobe dans les heures qui suivent la modification.

Après le traitement, les tampons et les lamelles ont été conservés dans des boites de pétri scellées avec du parafilm.

Les tampons et les lamelles ont été traités en collaboration avec le Pr. SAHLI Salah et ses doctorants au niveau du laboratoire de Microsystème et Instrumentation (LMI) à l'*Institut de Zarzara-Constantine 1*.

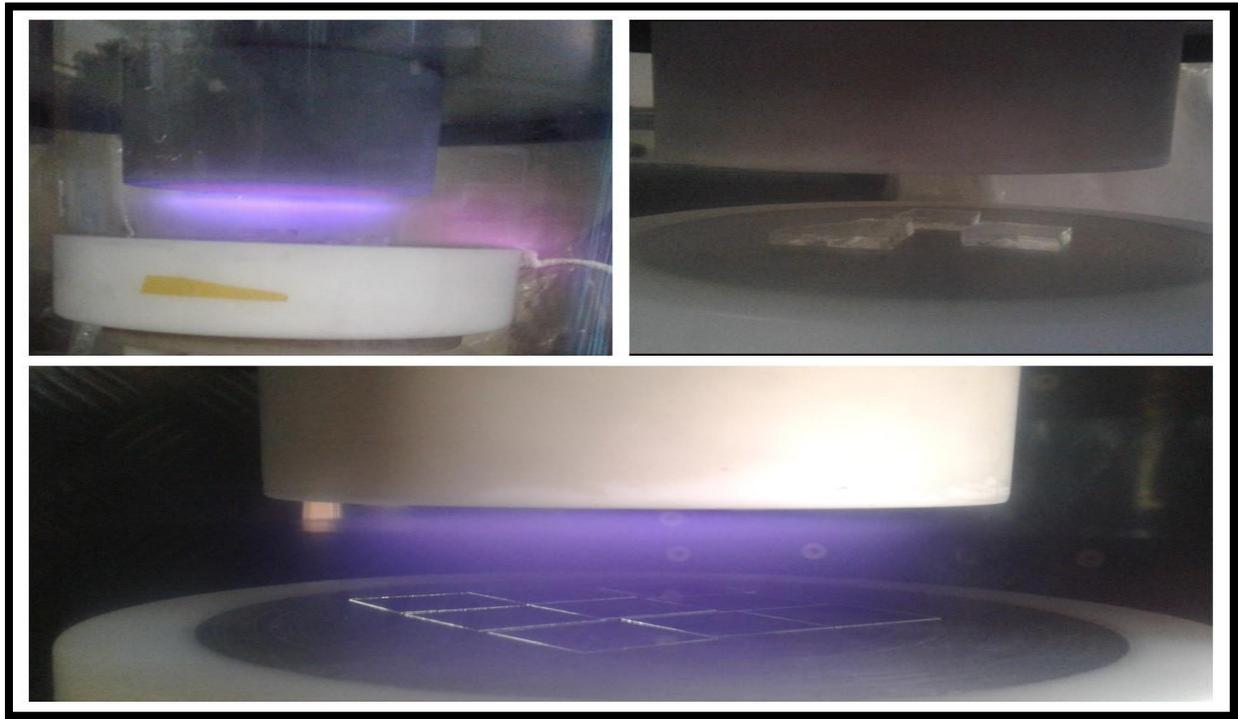


Figure 15. Traitement des tampons et des lamelles par plasma O₂.

2.3. Incubation et transfert de la Fibronectine / Fibrinogène Alexa 488

2.3.1. Fibronectine

Le nom de la fibronectine (FN) vient du latin *fibra* qui signifie « fibre » et *nectere* qui signifie « lier ». Ce nom lui a été donné de par sa structure allongée mais également de par sa capacité à se lier à différents partenaires pour former des réseaux. Cette protéine, découverte en 1948 sous le nom « *cold-insoluble protein* », est une des premières protéines ayant été reconnue pour sa double fonction structurelle mais également fonctionnelle.

La fibronectine est une des macromolécules constituant les matrices extracellulaires, est une glycoprotéine d'un poids moléculaire variant de 420 à 500 KDa en fonction des épissages alternatifs qu'elle subit et des glycosylations qu'elle arbore. Elle est constituée de deux sous unités homologues chacune d'environ 250 KDa. Les deux sous unités sont reliées entre elles par des ponts disulfures au niveau du domaine carboxy-terminal. Cette molécule est constituée de

domaines de type I, II et III qui sont repliés en modules globulaires [35] et qui peuvent se lier aux surfaces cellulaires, au collagène, au fibrinogène ou à la fibrine, au complément, aux glycosaminoglycane, aux protéoglycane et à l'héparine [36].

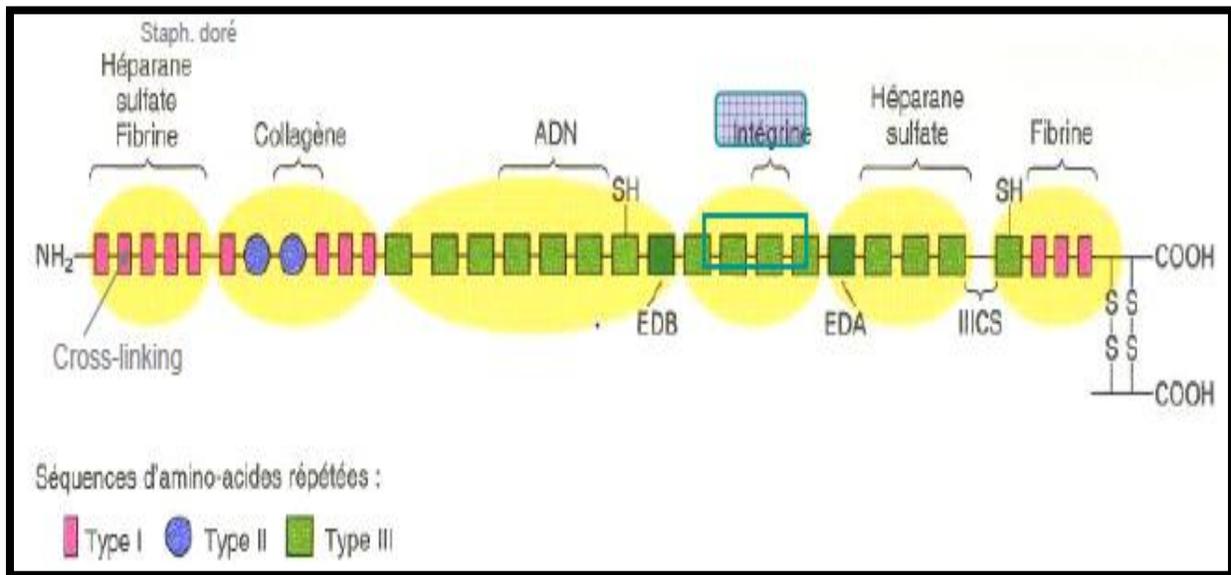


Figure 16. Structure de la fibronectine [37].

A l'issue d'un épissage alternatif, différents isoformes de fibronectine sont produits. La fibronectine est synthétisée par les hépatocytes et sécrétée dans le plasma sous forme soluble et compacte, on parle alors de fibronectine plasmatique. Cette molécule est également produite par les cellules résidentes des différents tissus dont les cellules endothéliales et les fibroblastes c'est le cas de la fibronectine cellulaire. Dans ce dernier cas, elle est liée à la surface des cellules. Ces deux fibronectines peuvent être assemblées et incorporées sous forme insoluble et fibrillaire dans les matrices en phase solide. Des études montrent également la formation *in vivo* d'agrégats de fibronectine dans certaines conditions pathologiques. Cette protéine peut donc se trouver sous différentes conformations moléculaires et supramoléculaires [35].

Elle joue un rôle dans la morphologie cellulaire, l'organisation du cytosquelette, la phagocytose, l'hémostase, la différenciation embryonnaire et la réparation des plaies [36].

2.3.2. Fibrinogène Alexa 488

Le fibrinogène Alexa 488 c'est une protéine soluble présente dans le plasma sanguin qui joue un rôle dans la coagulation [38], conjuguée avec l'Alexa fluor 488 qui est un colorant fluorescent vert brillant avec une excitation idéale pour la ligne laser 488, utilisé pour générer des signaux stables en imagerie et en cryométrie en flux. Le fibrinogène Alexa 488 est utilisé pour le marquage cellulaire et la détection de structures biologiques de faible abondance avec une grande sensibilité [39].

2.3.3. Étapes de l'incubation et du transfert de la FN / Fg-488

La fibronectine a été achetée auprès de *Sigma-Aldrich* et le fibrinogène Alexa fluor 488 c'est un don de l'*Institut Interdisciplinaire de NeuroSciences (IINS) de Bordeaux*.

Tout d'abord, un mélange de protéines a été préparé contenant : 50 μ l de 50 μ g/ml du fibrinogène dilué dans du PBS + 5 μ l de 1 mg/ml du fibrinogène + 2,5 μ l de 1mg/ml de la fibronectine concentré (la concentration totale du fibrinogène c'est 150 μ g/ml et le fibronectine c'est 50 μ g/ml). Ensuite, le tampon traité par plasma O₂ a été incubé avec une goutte de 40 μ l du mélange de protéines préparé pendant 2 heures à température ambiante, avec l'étalement et le déplacement du mélange vers chaque coin de la surface microstructurée du tampon par l'extrémité de la pipette.



Figure 17. Incubation de la FN / Fg-488 sur le tampon PDMS.

Après le temps d'incubation, la goutte des protéines a été bien aspirée avec la pipette pour enlever toutes les protéines non adsorbées (l'excès). Ensuite, le tampon a été séché sous le PSM et mis en contact avec la lamelle traitée par plasma O₂, pendant une heure à température ambiante avec l'application à chaque fois d'une légère pression avec la pince pour assurer un bon contact entre le tampon et le substrat (lamelle).

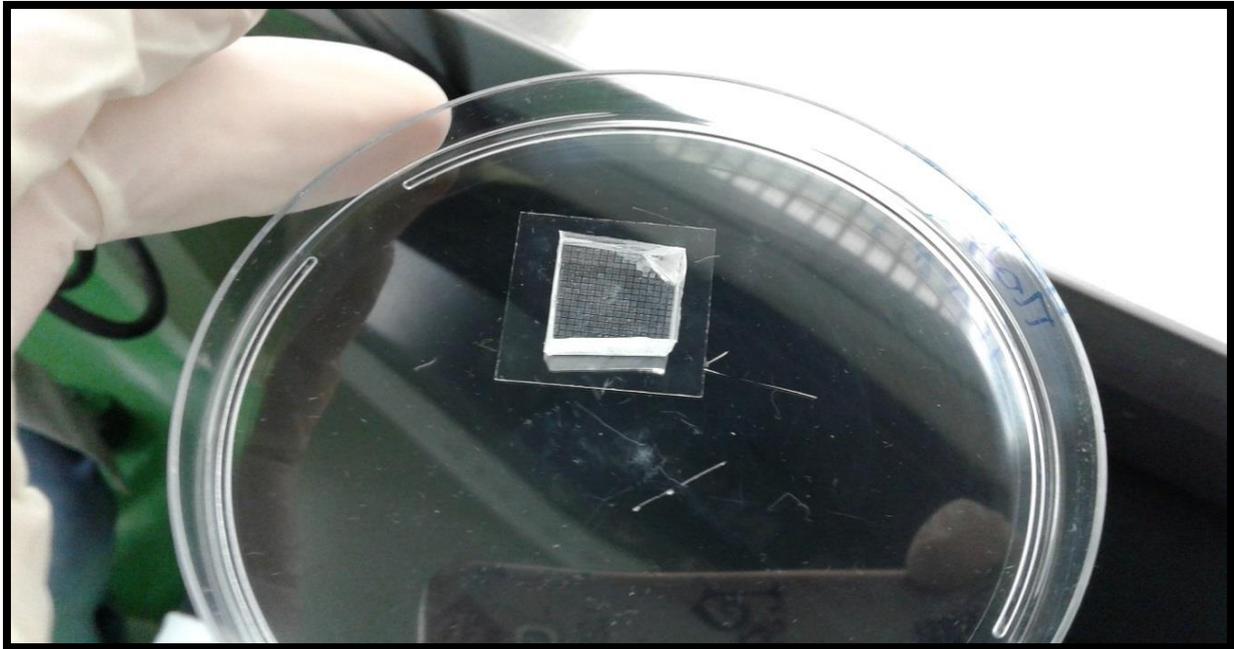


Figure 18. Transfert de la FN / Fg-488 du tampon sur la surface de la lamelle.

Après une heure, le tampon a été retiré délicatement de la lamelle contenant les micromotifs de la protéine (biopuce). Cette dernière a été ensuite placée sur une lame (26 × 76 mm) et observée par microscope en fluorescence. Un microscope inversé *Leica DM IL LED* équipé d'une caméra a été utilisé pour l'observation et l'enregistrement des images fluorescentes des micropatrons (micromotifs) de la FN / Fg-488, ces images ont été ensuite traitées par le logiciel Adobe Photoshop.

Après l'observation, la biopuce a été conservée dans une boîte de pétri qui contient du PBS dans le frigo à température 4°C pour la culture cellulaire.

3. Culture cellulaire

Les modèles *in vitro*, comprennent toutes les techniques de culture des cellules, des tissus ou des organes en dehors de tout organisme, sur un milieu nutritif et dans des conditions contrôlées. Ces cellules ou tissus peuvent être cultivés dans des supports de culture classiques (flasques), on parle alors de modèle 2D statique, ou en conditions 3D complétées parfois par des bioréacteurs qui permettent de recréer par la perfusion un environnement proche des conditions *in vivo* [40].

La culture cellulaire est une technique de laboratoire développée au XX^{ème} siècle [41]. Ses objectifs sont de :

- Disposer d'un type de cellules bien caractérisées (par exemple des cellules de poumon).
- Maintenir ces cellules en vie hors de l'organisme dont elles sont issues sur un temps suffisant pour observer les phénomènes étudiés.
- Permettre leur prolifération pour en disposer en nombre suffisant et en temps voulu pour les expériences.

Les cellules sont isolées des tissus par des combinaisons de méthodes chimiques (enzymes,) et mécaniques (dissociation, centrifugation, cryométrie). Les cellules directement issues d'un organisme et maintenues en vie quelques jours sont dits cultures primaires. La majorité des cellules des mammifères peuvent dans les conditions adéquates proliférer. La prolifération des cellules issues d'une culture primaire est appelée culture secondaire [42].

3.1. Lignée cellulaire

Une lignée cellulaire est une lignée clonale transformée, où les cellules filles vont proliférer indéfiniment lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu et des conditions appropriées. Contrairement aux cultures de cellules primaires, des lignées cellulaires ne sont pas limitées à un nombre de divisions cellulaires dues à des mutations dans une ou plusieurs voies de contrôle de la croissance, il n'y a pas d'apoptose [40]. Ces lignées sont issues, en général de cellules cancéreuses et peuvent être naturellement immortelles [42].

3.2. Lignée EMT6

La lignée EMT6 (ATCC® CRL-2755™) c'est une lignée cellulaire adhérente qui a été établie à partir d'un carcinome mammaire murin transplantable qui est apparu chez une souris BALB / cCRGL après l'implantation d'un nodule alvéolaire mammaire hyperplasique. La lignée tumorale résultante (appelée KHJJ) a été propagée chez des souris BALB / cKa et adaptée à la culture tissulaire après le passage du 25^{ème} animal, et la lignée cellulaire a été appelée EMT. EMT6 est un isolat clonal d'EMT isolé en 1971 à l'université de Stanford. La lignée cellulaire EMT6 peut être cultivée soit chez les animaux en tant que tumeur, soit en culture tissulaire. Les cellules dérivées de tumeurs ont une efficacité de placage *in vitro* de 30%. Les cellules cultivées en culture tissulaire auraient une efficacité de placage de 70% [43].

La lignée EMT6 a été achetée auprès d'ATCC (*American Type Culture Collection*).

3.3. Étapes de la culture cellulaire

Les cellules EMT6 ont été cultivées dans un milieu de culture complet (DMEM contenant 10% de sérum de bovin foetal [FBS] et 1% de pénicilline / streptomycine) dans des flasques de culture T-25 et au sein d'un incubateur humidifié contenant 5% de CO₂ et à température 37°C.

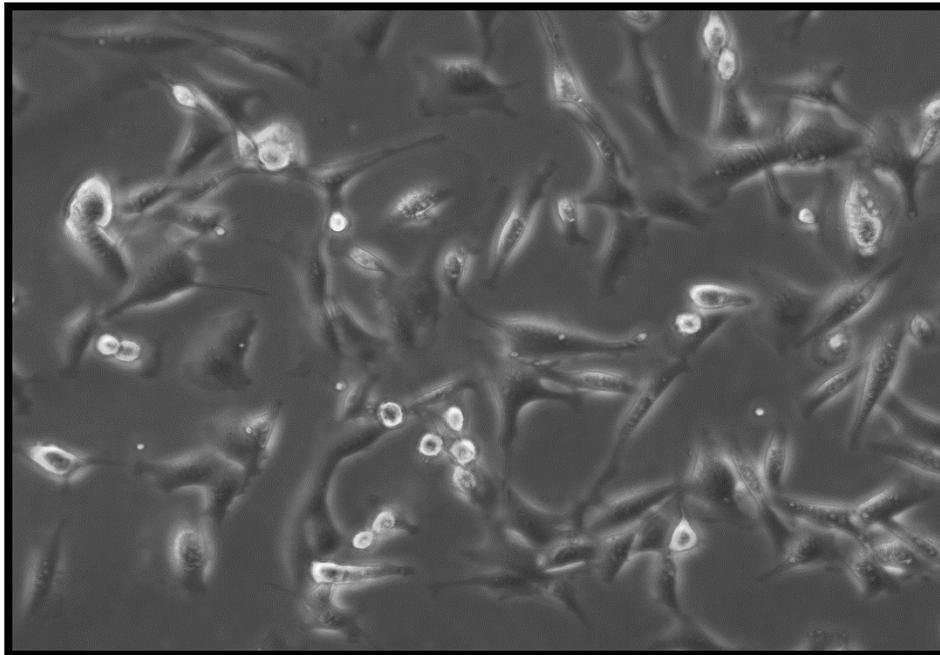


Figure 19. Cellules EMT6 en culture observées en contraste de phase par le microscope inversé.

Tout d'abord, la flasque des cellules EMT6 a été sortie de l'incubateur et mise sous une hotte à flux laminaire. Ensuite les cellules EMT6 adhérentes sur la paroi de la flasque T-25 ont été lavées dans 5 ml de PBS stérile après l'élimination du milieu, puis ont été détachées avec 1,5 ml de la trypsine pendant 3 min dans l'incubateur. Après le détachement du tapis cellulaire, 3 ml du milieu de culture complet ont été ajoutés pour inhiber l'action de la trypsine. Le milieu avec les cellules détachées ont été mis dans un tube de culture de 15 ml, puis les cellules ont été recueillies par centrifugation pendant 3 min à 1080 tours / min. Après la centrifugation, le surnageant a été retiré et les cellules ont été remises et bien mélangées dans 3 ml de milieu de culture complet. Ensuite 100 µl de la suspension cellulaire obtenue ont été prélevés dans un tube eppendorf avec 100 µl de bleu de trypan, 100 µl de ce mélange ont été déposés sur une cellule de Malassez (hématocytomètre). Cette dernière a été placée sous le microscope pour compter le nombre des cellules dans la suspension. Après le comptage, la suspension qui contient une densité cellulaire d'environ 20.000 cellules a été ajoutée à la biopuce, stérilisée aux UV pendant 15 min, puis a été placée dans l'incubateur pendant 20 min. Après le temps d'incubation, les cellules ont été vérifiées sous le microscope inversé pour déterminer si une proportion suffisamment grande de cellules ont été attachées aux micromotifs. Les cellules non attachées ont été enlevées par lavage de la surface avec le milieu de culture complet et les cellules attachées ont été retournées à l'incubateur et laissées pour s'étaler complètement sur les micromotifs de la biopuce pendant 2 à 5 heures. À la fin, des images de transmission des cellules vivantes ont été observées et enregistrées par le microscope inversé *Leica DM IL LED* équipé d'une caméra et ont été ensuite traitées par le logiciel Adobe Photoshop.

Toutes les étapes de l'impression par microcontact (sauf le traitement par plasma O₂) et la culture cellulaire ont été réalisées au laboratoire de la Culture Cellulaire au niveau du *Centre National de Recherche en Biotechnologie-Constantine*.

Chapitre 3 :
Résultats
et
Discussion

1. Micropatronage de la FN / Fg-488 sur le verre

La figure 20 montre des images de la Fibronectine / Fibrinogène-Alexa-Fluor-488 imprimée sur des surfaces en verre (lamelles) traitées par plasma O₂, avec les différentes formes de micromotifs de tailles variées de 3 à 10 µm et peut aller jusqu'à plusieurs dizaines de micromètres et une distance entre les micromotifs supérieure à 50 µm. Les lamelles micropatternées présentent une immobilisation homogène des micromotifs de la FN / Fg-488, avec un contraste élevé démontrant l'efficacité de cette méthode. Cependant, l'impression et le transfert de protéines sur le polystyrène était mauvais car seules de petites quantités de protéines ont été transférées sur toute la surface. La FN / Fg-488 patternée sur les lamelles de verre peut être conservée dans le PBS à 4°C pendant quelques semaines et conserve toujours une bonne capacité d'adhésion cellulaire.

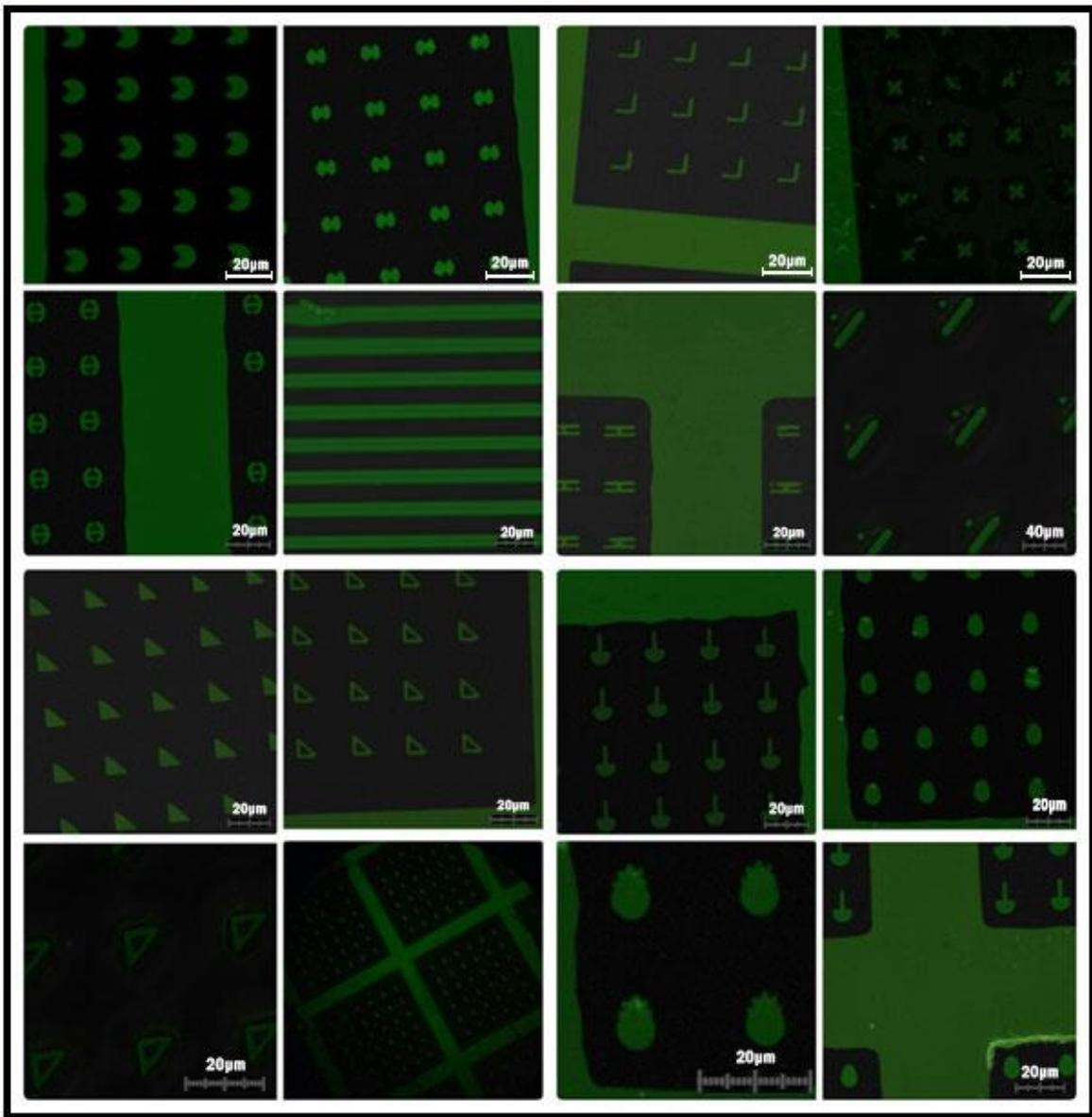


Figure 20. Images montrent la FN / Fg-488 imprimée sur des lamelles de verre traitées par plasma O_2 avec les différentes formes des micromotifs de tailles variées.

2. Adhésion cellulaire

Les figures 21, 22, 23 et 24 montrent des images fluorescentes et en contraste de phase de la FN / Fg-488 micropatternée sur des lamelles de verre traitées par plasma O₂ avant et après l'adhésion des cellules du carcinome mammaire de souris : EMT6 ; ces images ont été prises à différents temps et à différents grossissements (4X, 10X et 20X). Les cellules individuelles EMT6 s'adhèrent rapidement et adoptent la géométrie précise imposée par les micromotifs de la FN / Fg-488 avec les quatre formes différentes (ronde, ananas, champion et lignes). Les cellules adhérees sur les motifs restent confinées un certain temps mais, elles s'échappent après 48 heures, et colonisent les zones non imprimées (voir la figure 24 (D)). Ce phénomène peut être évité par une simple passivation de ces zones avec un polymère antiadhésif tel que le PLL-g-PEG.

La taille des micromotifs de protéines imprimées sur la lamelle a été optimisée pour l'adhésion de la cellule unique. En revanche, nous n'avons pas bien réussi à dresser une bonne densité de cellules uniques sur les micromotifs, comme nous pouvons l'observer sur les images des figures en dessous. Néanmoins, nous pouvons résoudre très facilement ce problème, en diminuant le nombre de cellule dans le milieu.

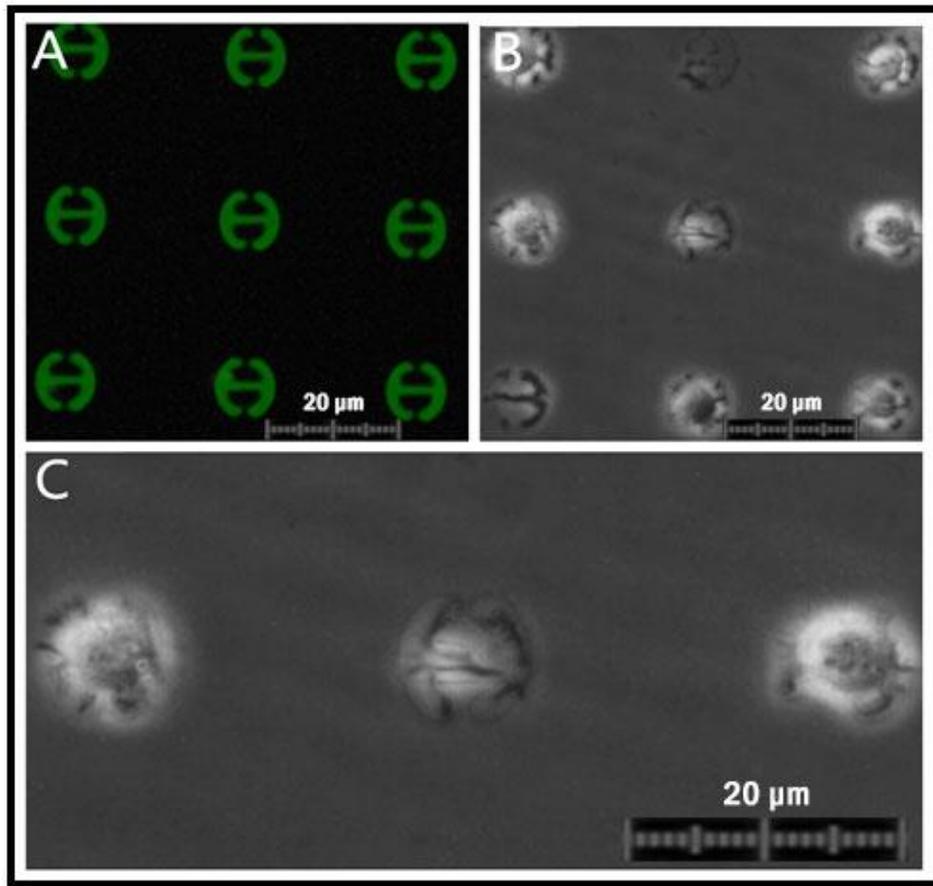


Figure 21. **A-** Micromotifs fluorescents en forme ronde de FN / Fg-488 avant l'incubation et l'adhésion cellulaire (en fluorescence). **B-** Cellules EMT6 adhérees sur les micromotifs en forme ronde de la FN / Fg-488 après 2 heures d'incubation (en contraste de phase). **C-** Gros plan des cellules EMT6 adhérees sur les micromotifs ronds (en contraste de phase).

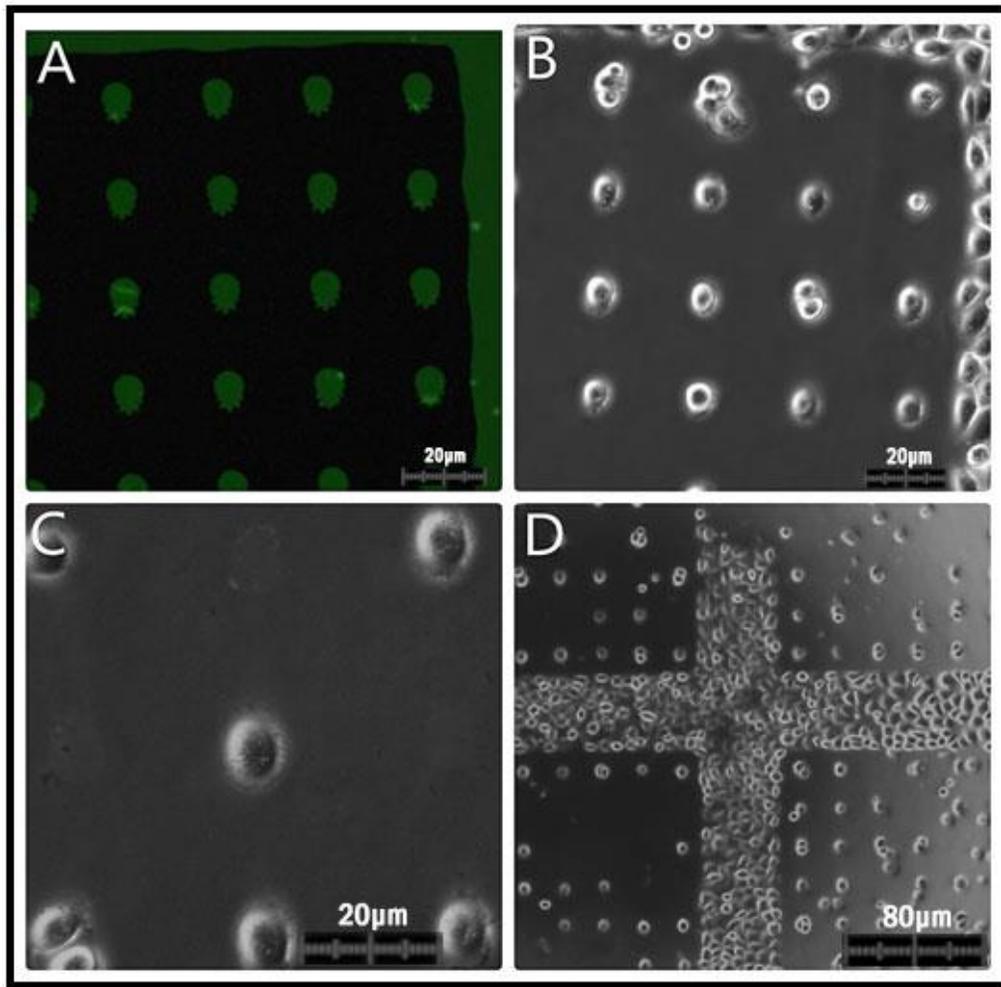


Figure 22. A- Micromotifs fluorescents en forme d'ananas de FN / Fg-488 avant l'incubation et l'adhésion cellulaire (en fluorescence). B, C, D- Cellules EMT6 adhérees sur les micromotifs en forme d'ananas de la FN / Fg-488 après 2 heures d'incubation (en contraste de phase).

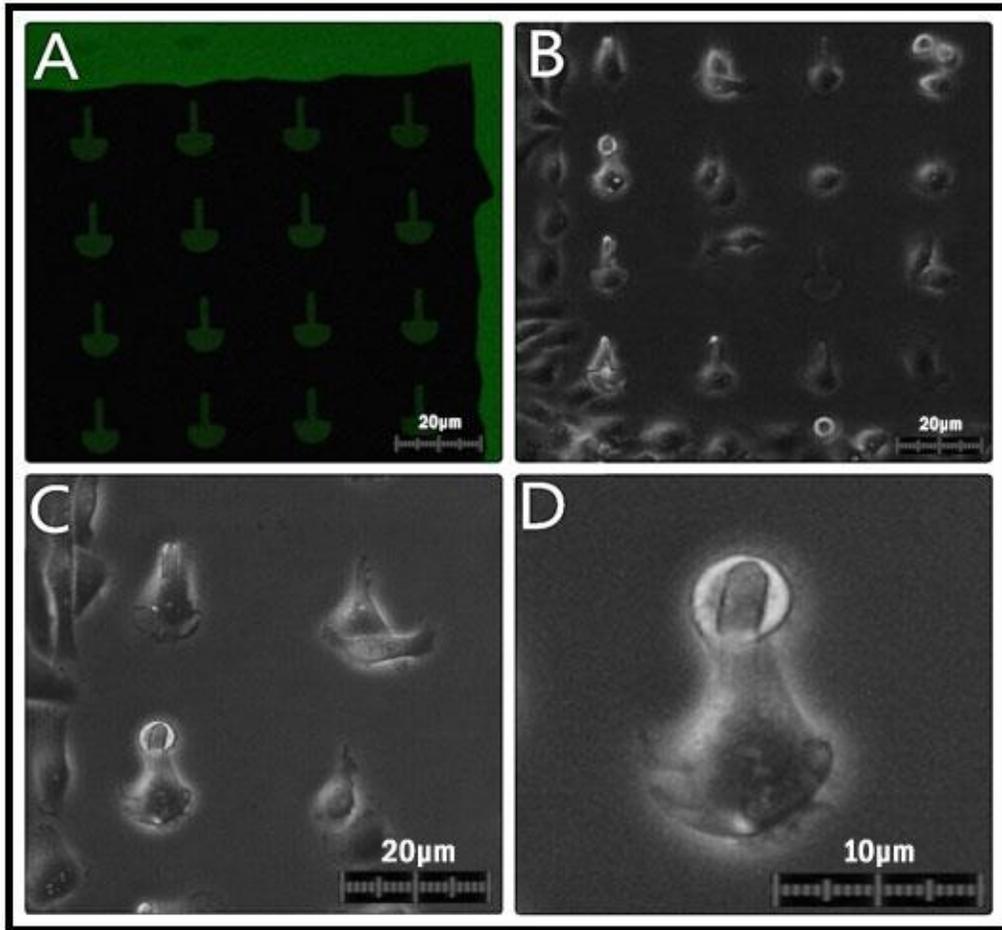


Figure 23. A- Micromotifs fluorescents en forme de champignon de FN / Fg-488 avant l'incubation et l'adhésion cellulaire (en fluorescence). B, C- Cellules EMT6 adhérees sur les micromotifs en forme de champignon de la FN / Fg-488 après 2 heures d'incubation (en contraste de phase). D- Gros plan d'une cellule EMT6 adhéree sur le motif champignon (en contraste de phase).

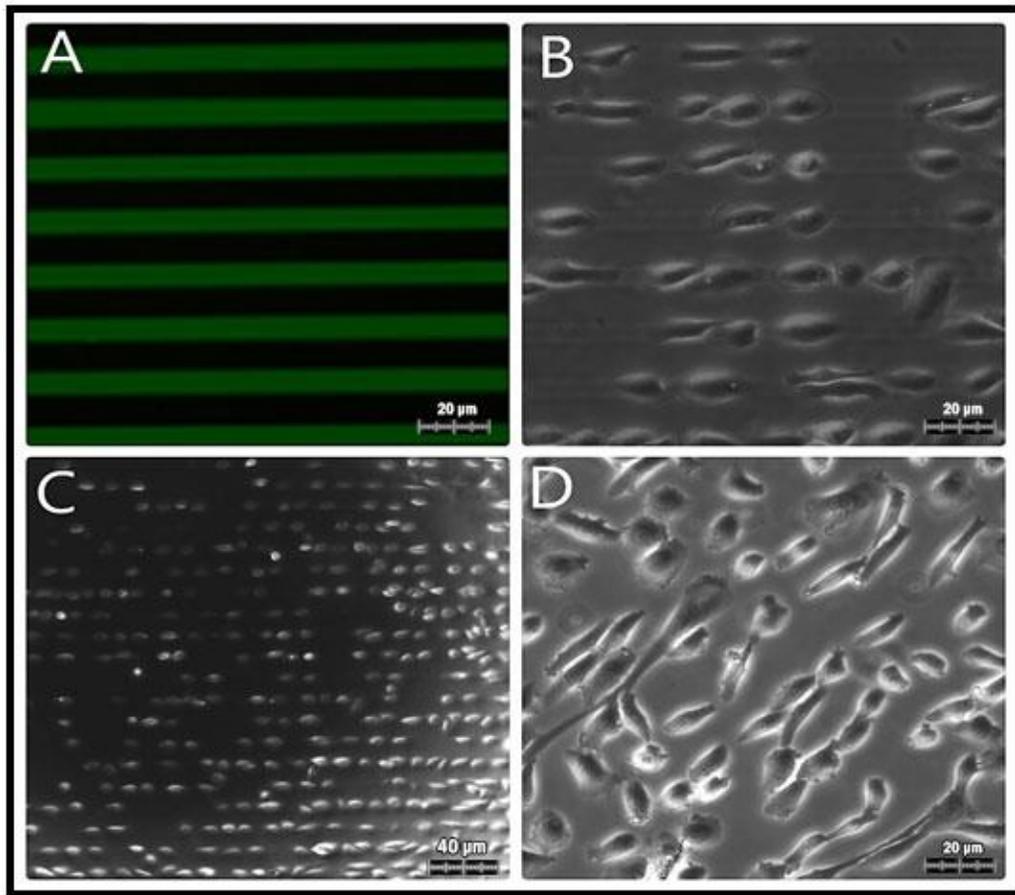


Figure 24. **A-** Lignes fluorescentes de FN / Fg-488 avant l'incubation et l'adhésion cellulaire (en fluorescence). **B, C-** Cellules EMT6 adhérees sur les lignes de la FN / Fg-488 après 2 heures d'incubation (en contraste de phase). **D-** Cellules EMT6 adhérees sur les lignes de la FN / Fg-488 et les zones non imprimées après 48 heures d'incubation (en contraste de phase).

Conclusions

et

Perspectives

Depuis quelques années, les études biologiques sont tournées vers l'utilisation d'outils de micro et nano ingénierie dédiés à la culture cellulaire qui demeure à l'heure actuelle un axe de recherche très dynamique entre autres ils sont employés pour des études toxicologiques et pharmacologiques.

La technologie de la miniaturisation à l'échelle nanométrique a permis d'améliorer l'efficacité de la production, de réduire le volume d'échantillons et la consommation de l'énergie ainsi a permis de répondre en partie aux problèmes d'éthique, en limitant l'emploi d'animaux, financier et aux difficultés d'interprétations des résultats des études *in vivo*.

Dans le cadre de notre travail, nous avons eu une idée générale sur l'ensemble des techniques qui peuvent exister et qui permettent d'élaborer des structures à l'échelle nanométrique tout en progressant dans les connaissances nécessaires à la réalisation de la technologie de μ CP qui est complémentaire à la lithographie douce et qui s'appuyait principalement sur un système de modélisation capable d'imprimer des molécules d'adhésion « fibronectine » et de reproduire des cellules alignées sur des lamelles de verre traitées par plasma O₂. Les résultats étaient positifs et satisfaisants avec un nombre limité de produits chimiques et d'étapes impliquées, par lequel le micropatronage est considéré comme un complément de choix par excellence pour contrôler la géométrie et la taille des cellules individuelles testées en 2D tout en permettant une meilleure simulation des conditions physiologiques et d'obtenir une vision sur l'ensemble du comportement cellulaire qui forme une seule population identique par une simple prise d'images à des intervalles de temps. Néanmoins le seul inconvénient est que le stockage des cellules est limité par le temps (quelques semaines). Le choix de la technologie est donc dépendra principalement de l'objectif de travail ainsi que les biomatériaux impliqués.

Pour conclure, l'optimisation de la technologie de μ CP pourra constituer de nouvelles armes d'analyse prometteuse dans l'arsenal de biologistes et de pharmaciens. Il s'agit d'une technique polyvalente qui pourra avoir un large éventail d'applications, non seulement dans la conception de nouveaux biomatériaux intelligents 3D, mais de nouvelles voies d'investigation dans le processus d'évaluation des médicaments, diagnostique des maladies, suivi thérapeutique...etc. La gamme d'applications est susceptible de s'élargir aux cours des

prochaines années ; dans le même sens on pourra avoir des modèles de tissus et d'organes « organe on a chip » plus sophistiqués, tout en augmentant le taux de réussite dans les conditions *in vitro* et remplir l'exigence de la plupart des études *in vivo*.

Finalement, ce travail peut donc constituer un point de départ vers la mise au point de nouveaux projets intéressants en biotechnologie en Algérie, en envisageant de construire des plates-formes à haute performance pour l'analyse cellulaire avec un grand impact industriel. En souhaitant ainsi de l'intégrer à l'avenir dans le système académique et industriel.

Références

Bibliographiques

- [1] Azioune, A., Carpi, N., Fink, J., Chehimi, M., Cuvelier, D., Piel, M. (2011). Robust Method for High-Throughput Surface Patterning of Deformable Substrates. *Langmuir*, 27, 7349-7352.
- [2] Baudoin, R. (2008). Développement et caractérisation d'une puce à cellules pour le criblage d'agents toxiques. Thèse : Sciences de l'ingénieur (physiques). Compiègne : Université de Technologie de Compiègne, 183 p.
- [3] Berthuy, O. (2015). Puce à cellules multiplexée pour l'étude de réponses cellulaires parallélisées. Thèse : Biochimie [q-bio.BM]. Lyon : Université Claude Bernard-Lyon I, 210 p.
- [4] <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosnano/glossaire/mot/microelectronique.htm> (Consulté le 22/05/2018).
- [5] Lintz, P. (2014). Analyse et enjeux éthiques des nanotechnologies en médecine : temps et discours, approche éthique systémique : double discours, approche psychanalytique : complémentarité des discours entre science et théologie. Thèse : Psychologie. Montpellier : Université Paul Valéry - Montpellier III, 298 p.
- [6] www.agence-nationale-recherche.fr (Consulté le 23/05/2018).
- [7] Lazzarino, F. (2005). Etude et caractérisation des films minces lors du procédé de lithographie par nanoimpression. Thèse : Physique. Grenoble : Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 149 p.
- [8] Dirani, A. (2010). Nanostructuration par photolithographie DUV de matériaux organiques. Thèse : Autre. Mulhouse : Université de Haute Alsace - Mulhouse, 156 p.
- [9] Stehlin, F. (2013). Photolithographie UV-profond d'oxoclusters métalliques : Des processus photochimiques aux applications en nanofabrication. Thèse : Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Mulhouse : Université de Haute Alsace - Mulhouse, 220 p.
- [10] Voisin, P. (2007). Lithographie de nouvelle génération par nanoimpression assistée par UV : étude et développement de matériaux et procédés pour l'application microélectronique. Thèse : Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Grenoble : Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 171 p.
- [11] Thibault, C. (2007). Impression de biomolécules par lithographie douce, applications pour les biopuces, de l'échelle micrométrique à nanométrique. Thèse: Nanophysique, Nanocomposants, Nanomesures. Toulouse : INSA de Toulouse, 170 p.

- [12] Lalo, H. (2009). Réalisation d'une plateforme biopuce sans marquage basée sur la lithographie douce. Thèse : Réseaux et télécommunications. Toulouse : INSA de Toulouse, 206 p.
- [13] Xia, Y., Whitesides, G. (1998). SOFT LITHOGRAPHY. *Annual Review of Materials Science*, 28, 153-184.
- [14] Masclaux, C. (2012). Etude de la structuration spontanée de films polymères en nanoimpression thermique. Thèse : Nanoélectroniques et Nanotechnologies. Grenoble : Université de Grenoble, 131 p.
- [15] <https://www.futura-sciences.com/sciences/definitions/physique-photolithographie-15130/> (Consulté le 03/07 /2018).
- [16] http://www.lpn.cnrs.fr/fr/NANOFLU/DIMIPOLE/documents/cours1er2_HAGHIRI_nano_tecnos_M2R_Septembre2013.pdf (Consulté le 03/07 /2018).
- [17] Martinez-Rivas, A., Gonzalez-Quijano, G., Proa-Coronado, S., Severac, C., Dague, E. (2017). Methods of Micropatterning and Manipulation of Cells for Biomedical Applications. *Micromachines*, 8 (347), 1-20.
- [18] Dezest, D. (2015). Nanosystèmes électromécaniques pour la biodétection : intégration d'un moyen de transduction et stratégies de biofonctionnalisation. Thèse : Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Toulouse: INSA de Toulouse, 167 p.
- [19] Kaufmann, T., Jan Ravoo, B. (2010). Stamps, inks and substrates: polymers in microcontact printing. *Polymer Chemistry*, 1, 371-387.
- [20] Fink, J., Théry, M., Azioune, A., Dupont, R., Chatelain, F., Bornens, M., Piel, M. (2007). Comparative study and improvement of current cell micro-patterning techniques. *Lab Chip*, 7, 672-680.
- [21] Thèry, M. (2006). Contrôle de la polarité des cellules adhérentes : Utilisation de micropatrons adhésifs pour la manipulation de l'architecture cellulaire et l'analyse quantitative de l'organisation des cellules en interphase et en mitose. Thèse : Interfaces Physique-Biologie. Paris : Université Paris 7 – Denis Diderot, 195 p.

[22] Chen, W. (2016). Spectroscopie diélectrique hyperfréquence de cellules uniques cancéreuses : de l'optimisation du capteur en sensibilité et répétabilité jusqu'au suivi en temps réel de stimuli chimiques. Thèse : Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Toulouse : Université Paul Sabatier - Toulouse III, 131 p.

[23] Badre, C. (2007). Étude de la réactivité de surface par mesure d'angle de contact : influence de la fonctionnalisation et de la structure. Thèse : Chimie Physique et Chimie Analytique. Paris : Chimie Paris-Tech, 124 p.

[24] Ghibaud, M. (2008). Influence des propriétés mécaniques du substrat sur l'adhésion et la migration cellulaire. Thèse : Biophysique. Paris : Université Paris-Diderot - Paris VII, 174 p.

[25] Bugnicourt, G. (2011). Adhésion, croissance et polarisation de neurones sur substrats micro-et nano-structurés. Thèse : COND-Mat. Grenoble : Université de Grenoble, 213 p.

[26] Théry, M., Piel, M. (2009). Adhesive Micropatterns for Cells: A Microcontact Printing Protocol. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 4, 1-11.

[27] <http://fracademic.com/dic.nsf/frwiki/1472959> (Consulté le 02/06/2018).

[28] www.eea.univ-montp2.fr/IMG/pdf/FME346techno_d_litho.pdf (Consulté le 30/06/2018).

[29] Alom Ruiz, S., Chen, C.S. (2007). Microcontact printing: A tool to pattern. *Soft Matter*, 3, 1-11.

[30] <https://www.aime-toulouse.fr/DOCPDF/TP/NanopptPDMS.pdf> (Consulté le 01/07/2018).

[31] Dechene, J. M. (2010). Surface Modifications of Poly (dimethylsiloxane) for Biological Applications of Microfluidic Devices. Thèse: Chimie. Ontario: Université de Western Ontario, 178 p.

[32] <http://cshprotocols.cshlp.org/content/vol2009/issue7/media/prot5255M1.mov>

(Consulté le 21/04/2018).

[33] www.nae.fr/wp-content/uploads/2014/05/EB_PrepSurfPlasma.pdf

(Consulté le 08/06/2018).

Références Bibliographiques

- [34] <https://www.usinenouvelle.com/expo/equipement-de-traitement-de-surface-torc-p10217995.html> (Consulté le 07/06/2018).
- [35] Bascetin, R. (2014). Etude de l'auto-assemblage de la fibronectine plasmatique humaine: Mécanismes et réponses cellulaires. Thèse : Biochimie - Biologie cellulaire. Cergy Pontoise : Université de Cergy Pontoise, 264 p.
- [36] Sitterley, G. (2008). BioFiles: Attachment and Matrix Factors. *Sigma-Aldrich*, 3, 1-25.
- [37] http://umvf.omskosma.ru/premannee/BOTTARISerge/BOTTARISergeP05/BOTTARISerge_P05.pdf (Consulté le 23/05/2018).
- [38] <https://www.passeportsante.net/fr/Maux/analyses-medicales/Fiche.aspx?doc=analyse-fibrinogene-sang> (Consulté le 10/06/2018).
- [39] <http://www.thermofisher.com/dz/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/alex-fluor-488.html> (Consulté le 10/06/2018).
- [40] Naudot, M. (2013). Caractérisation par imagerie en temps réel de cultures cellulaires hépatiques en biopuces micro-fluidiques. Thèse : Bio-ingénierie, Biomécanique, Biomatériaux. Compiègne : Université de technologie de Compiègne, 175 p.
- [41] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4244961/> (Consulté le 10/06/2018).
- [42] Gabriel, M. (2009). Développement d'un microsystème de visualisation et de suivi de cellules adhérentes par imagerie de contact. Thèse : Biophysique [physics.bio-ph]. Grenoble : Université Joseph-Fourier Grenoble I, 121 p.
- [43] https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/By_Tissue/Breast/CRL-2755.aspx#history (Consulté le 07/07/2018).

Résumé

L'impression par microcontact « μ CP » est avérée une technique simple, rapide et efficace. Elle est en particulier utile dans l'immobilisation de biomolécules et leur structuration sur diverses surfaces avec une résolution inférieure au micromètre, sans modifier leurs propriétés. Le but de ce travail est d'optimiser la technologie de μ CP afin d'imprimer les protéines d'adhésion « Fibronectine » sur les surfaces de lamelles de verre, et de vérifier le succès de cette technologie par la culture d'une lignée cellulaire « EMT6 » sur ces mêmes lamelles.

L'ensemble du processus peut être subdivisé en trois parties principales. Tout d'abord, un moule de silicium est fabriqué, qui contient les micro-caractéristiques d'intérêt. Deuxièmement, un tampon de polydiméthylsiloxane (PDMS) est fabriqué puis, incubé avec des protéines de la matrice extracellulaire « Fibronectine ». La fibronectine est imprimée sur les lamelles de verre traitées par plasma O_2 uniquement dans la zone de contact. La troisième et dernière partie décrit le dépôt de cellules sur les substrats micropatternés.

Cette approche semble être fiable et efficace pour obtenir un profil stable de fibronectine sur des lamelles de verre, observé par microscope à fluorescence. Les cellules EMT6 étaient correctement confinées par l'adoption de la géométrie précise imposée par les micromotifs de la fibronectine.

Mots clés: Impression par microcontact, Biomolécules, Fibronectine, Lignée cellulaire, EMT6, Moule de silicium, Polydiméthylsiloxane, Microscope à fluorescence, Micromotifs.

Microcontact printing « μ CP » is proven to be a simple, fast and efficient technique. It is particularly useful in the immobilization of biomolecules and their structuration onto various solid surfaces with a sub-micrometer resolution, without modifying their properties. The objective of this work is to optimize the μ CP technology to print the adhesion proteins « Fibronectin » on the surfaces of glass coverslips, and to verify the success of this technology by growing a cell line « EMT6 » on the same coverslips.

The entire process can be subdivided into three main parts. First, a silicon mold is fabricated, which contains the microfeatures of interest. Second, a polydimethylsiloxane (PDMS) stamp is fabricated and inked with the extracellular matrix proteins « Fibronectin ». The fibronectin is printed onto O₂ plasma treated glass coverslips. Finally, the last part describes the adhesion of cells on micropatterned substrates.

This approach seems to be reliable and effective in obtaining a stable fibronectin features on glass coverslips as observed by fluorescence microscopy. The EMT6 cells were properly constrained and adopted the precise geometry imposed by the fibronectin micropatterns.

Key words: Microcontact printing, Biomolecules, Fibronectin, Cell line, EMT6, Silicon mold, Polydimethylsiloxane, Fluorescence microscope, micropatterns.

ثبت أن طباعة ميكروكوتناكت « μ CP» هي تقنية بسيطة، سريعة وفعالة. وهي مفيدة بشكل خاص في تثبيت الجزيئات الحيوية وهيكلتها على أسطح مختلفة بأبعاد أقل من ميكرومتر واحد، دون تغيير خصائصها. الهدف من هذا العمل هو تحسين تقنية μ CP لطباعة بروتينات الالتصاق «فبرونيكتين» على أسطح الشرائح الزجاجية، والتحقق من نجاح هذه التقنية عن طريق زراعة خلايا «EMT6» على نفس الصفائح.

يمكن تقسيم العملية إلى ثلاثة أجزاء رئيسية. أولاً، يتم تصنيع قالب السيليكون، والذي يحتوي على الأنماط الدقيقة المرغوبة. ثانياً، يتم تصنيع طابع بولي ديميثيل سيلوكسان (PDMS) وحضنه مع بروتينات المصفوفة خارج الخلية «فبرونيكتين». تتم طباعة الفبرونيكتين على الشرائح الزجاجية المعالجة بالبلازما O_2 فقط في منطقة الاتصال. الجزء الثالث والأخير يصف التصاق الخلايا على ركائز الأنماط الدقيقة.

هذا النهج يبدو موثوقاً وفعالاً في الحصول على صورة ثابتة من الفبرونيكتين على الشرائح الزجاجية التي يلاحظها المجهر المضان. تم تقييد الخلايا EMT6 بشكل صحيح واعتمدت الهندسة الدقيقة التي تفرضها الأنماط الدقيقة للفبرونيكتين.

الكلمات المفتاحية:

طباعة ميكروكوتناكت، جزيئات حيوية، فبرونيكتين، لمة خلوية، EMT6، قالب سيليكون، بولي ديميثيل سيلوكسان، مجهر مضان، الأنماط الدقيقة.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master
Option : Biochimie Appliquée

Thème

Mise en place de nouvelles biopuces intelligentes pour applications biotechnologiques

Résumé

L'impression par microcontact « μ CP » est avérée une technique simple, rapide et efficace. Elle est en particulier utile dans l'immobilisation de biomolécules et leur structuration sur diverses surfaces avec une résolution inférieure au micromètre, sans modifier leurs propriétés. Le but de ce travail est d'optimiser la technologie de μ CP afin d'imprimer les protéines d'adhésion « Fibronectine » sur les surfaces de lamelles de verre, et de vérifier le succès de cette technologie par la culture d'une lignée cellulaire « EMT6 » sur ces mêmes lamelles.

L'ensemble du processus peut être subdivisé en trois parties principales. Tout d'abord, un moule de silicium est fabriqué, qui contient les micro-caractéristiques d'intérêt. Deuxièmement, un tampon de polydiméthylsiloxane (PDMS) est fabriqué puis, incubé avec des protéines de la matrice extracellulaire « Fibronectine ». La fibronectine est imprimée sur les lamelles de verre traitées par plasma O₂ uniquement dans la zone de contact. La troisième et dernière partie décrit le dépôt de cellules sur les substrats micropatternés.

Cette approche semble être fiable et efficace pour obtenir un profil stable de fibronectine sur des lamelles de verre, observé par microscope à fluorescence. Les cellules EMT6 étaient correctement confinées par l'adoption de la géométrie précise imposée par les micromotifs de la fibronectine.

Mots clés : Impression par microcontact, Biomolécules, Fibronectine, Lignée cellulaire, EMT6, Moule de silicium, Polydiméthylsiloxane, Microscope à fluorescence, Micromotifs.

Présenté et soutenu par : AZIOUNE Bouchra

BOUKERCH Nada Elkaouther

Soutenu le 13 septembre 2018 devant le jury :

Présidente : Mme. BELLIL Ines. Maître de conférences classe A.

Promoteur : Mr. AZIOUNE Ammar. Directeur de Recherche (CRBt).

Examineur : Mr. SAHLI Salah. Professeur-UFMC.

Année Universitaire : 2017/2018