

---

# Chauffage par effet plasmon pour la désorption localisée de cellules capturées sur une biopuce

Élodie Engel<sup>1,2,3</sup>, Radoslaw Bombera<sup>1,2,3</sup>, Loïc Leroy,  
Roberto Calemczuk<sup>1,2,3</sup>, Loïc Laplatine<sup>1,2,3</sup>,  
Dieudonné R. Baganizi<sup>1,2,3</sup>, Patrice N. Marche<sup>4</sup>,  
Yoann Roupioz<sup>1,2,3</sup>, Thierry Livache<sup>1,2,3</sup>

1. Univ. Grenoble Alpes, INAC-SPrAM, 38000 Grenoble, France

2. CNRS, SPrAM, 38000 Grenoble, France

3. CEA, INAC-SPrAM, 38000 Grenoble, France

4. Institut Albert Bonniot INSERM-UJF U823, 38000 Grenoble, France

[elodie.engel@ujf-grenoble.fr](mailto:elodie.engel@ujf-grenoble.fr)

---

**RÉSUMÉ.** Cet article présente un système miniaturisé capable de capturer sur la surface d'or d'une biopuce plusieurs types de cellules et de les libérer sélectivement. Tout d'abord, des lymphocytes non marqués sont capturés sur une puce à ADN par l'intermédiaire d'anticorps spécifiques conjugués à des brins d'ADN. On illumine ensuite avec un laser, par le dessous de l'échantillon et dans les conditions de réflexion totale, les plots de cellules à relarguer. Dans des conditions bien définies, l'énergie de l'onde évanescente est absorbée par les oscillations des plasmons de surface et convertie en chaleur qui se dissipe dans le milieu environnant. Sous l'effet de l'augmentation localisée de la température, les doubles brins d'ADN se déshybrident ce qui libère les objets biologiques correspondant (i.e. lymphocytes). Les cellules sont ainsi libérées et leur relargage est contrôlé spatialement et temporellement.

**ABSTRACT.** This work proposes a miniaturized system able to perform multiple cell capture followed by cell-type selective release from a gold-coated biochip surface. Unlabeled lymphocytes are first specifically captured onto a DNA array by antibody-DNA conjugates. Then a laser illuminates, from below the sample under total reflection conditions, the cells spots to be released. In well-defined conditions, the energy of incoming photons is absorbed by surface electron oscillations, and then heat converted and dissipated into the neighboring medium. Because of the temperature rising, the double-stranded DNA dehybridate which enables a spatially and temporally controlled liberation of corresponding biological objects (i.e. lymphocytes) upon laser-induced local heating.

**MOTS-CLÉS :** résonance des plasmons de surface, biopuce à ADN, tri cellulaire.

**KEYWORDS:** surface plasmon resonance, DNA biochip, cell sorting.

---

DOI:10.3166/I2M.15.3-4.9-27 © 2016 Lavoisier

## 1. Introduction

L'examen détaillé d'échantillons biologiques complexes comme le sang, présente un grand intérêt pour la recherche en biologie, les biotechnologies ou les applications biomédicales (Liotta *et al.*, 2003 ; Anderson *et al.*, 2002). Analyser de façon pertinente qualitativement et quantitativement un milieu complexe nécessite de pouvoir extraire des sous-populations de cellules à partir d'un mélange hétérogène (Roupioz *et al.*, 2009). Assurer un tel tri multiplexé dans des conditions compatibles avec la survie cellulaire représente un défi ambitieux. Il existe des dispositifs micro-structurés et micro-fluidiques capables de séparer des cellules par l'intermédiaire de contraintes mécaniques (Kim *et al.*, 2008), de reconnaissance antigène/anticorps (Liu *et al.*, 2013), d'application d'un champ magnétique (Adams *et al.*, 2008) etc. Cependant, ces techniques sont limitées en termes de multiplexage et requièrent souvent un marquage préliminaire des échantillons (photo- ou magneto-marquage pour les systèmes  $\mu$ FACS ou  $\mu$ MACS). C'est pourquoi il est intéressant de concevoir des microsystèmes basés sur des surfaces « bio-sensibles » capables de faire du tri cellulaire multiplexé et sans marquage (Didar *et al.*, 2010). L'objectif de ces microsystèmes est de capturer des cellules ciblées et de procéder à leur relargage sélectif et contrôlé sans altérer leur survie. Dans les dispositifs existant, le relargage est contrôlé mécaniquement (Wang *et al.*, 2010), électriquement (Zhu *et al.*, 2008 ; Yeo *et al.*, 2006), thermiquement (Hatakeyama *et al.*, 2007) ou par des enzymes (Bombera *et al.*, 2012 ; Kwong *et al.*, 2009). Notre équipe a quant à elle développé un système de tri cellulaire sans marquage basé sur les propriétés thermodynamiques de l'ADN et sur la résonance des plasmons de surface (SPR) (Leroy *et al.*, 2014). Le principe de l'expérience est détaillé dans les paragraphes suivants.

## 2. Principe de l'expérience

Les cellules ou les molécules ciblées sont capturées sur la surface d'or d'une biopuce grâce à des anticorps spécifiques conjugués à des brins d'ADN (figure 1). Ces brins d'ADN (conjugués aux anticorps) sont hybridés à leur brin complémentaire qui est immobilisé sur la surface d'or de la biopuce. Un chauffage laser localisé induit la déshybridation des doubles brins d'ADN et entraîne la libération des molécules/cellules capturées.

Le chauffage est réalisé par le dessous de l'échantillon. Dans cette configuration, l'échantillon n'est pas exposé à la totalité du flux de lumière incident mais seulement à l'onde évanescente. Dans ces conditions, le chauffage est localisé à l'interface or/milieu ce qui limite l'exposition du milieu à la chaleur et assure un impact minimal sur les échantillons biologiques libérés. Ce dernier point est essentiel étant donné que notre objectif final est le tri de cellules sanguines et que la plupart des cellules de mammifère sont très sensibles au stress thermique (Chen *et al.*, 2006).

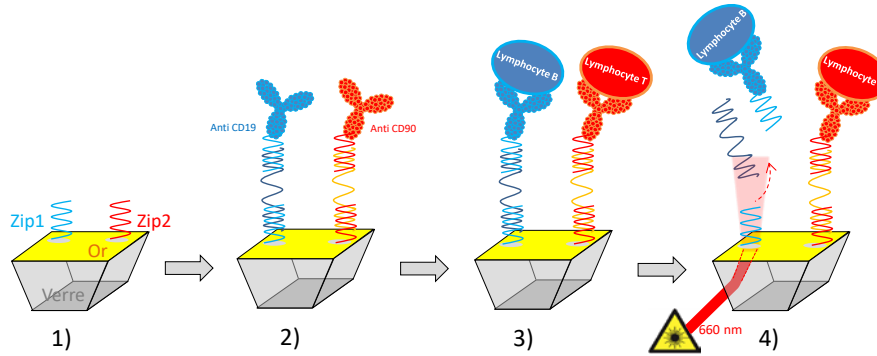


Figure 1. Principe de la stratégie de capture/relargage des cellules. 1) Greffage des ADN sur la surface d'or. 2) Hybridation des ADN complémentaires conjugués à des anticorps anti-lymphocytes. 3) Immobilisation des lymphocytes B et T. 4) Désorption localisée des cellules par chauffage laser

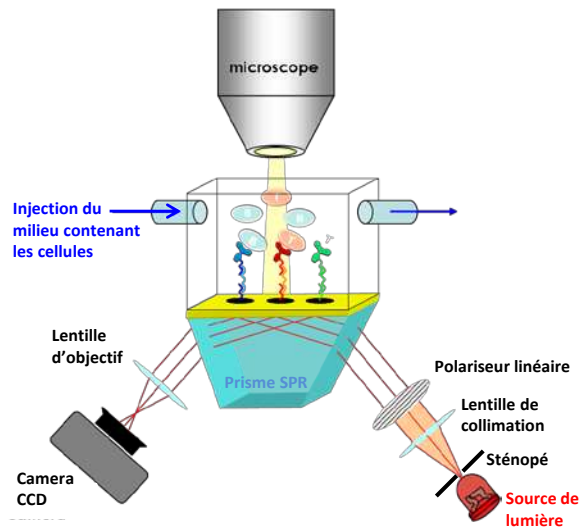


Figure 2. Schéma du dispositif expérimental utilisé en mode imagerie SPR (SPRi) : dispositif standard de SPRi complété avec un microscope qui permet le contrôle en temps réel de la construction de l'assemblage moléculaire sur la biopuce (par SPRi) et des étapes de capture et de relargage des cellules (par microscopie)

Notre stratégie repose sur une désorption physique induite par un chauffage localisé généré par un rayonnement laser continu appliqué dans les conditions de résonance des plasmons de surface (SPR) (Xiao *et al.*, 2010). Notre dispositif est

basé sur une configuration optique représentée figure 2. Il est dépourvu d'éléments de chauffage sophistiqués (Kajiyama *et al.*, 2003) et assure une élévation localisée de température. Ce dispositif, conçu au laboratoire, est constitué d'un système d'imagerie SPR classique (figure 2) complété par un microscope (pour permettre des observations par le dessus de la puce) et d'une source laser (qui induit le chauffage localisé) (figure 3). Le dispositif laser convergent, polarisé transverse magnétique et de puissance ajustable ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ ,  $P = 500 \text{ mW}$ ) est monté sur platine x/y qui permet de choisir la zone de la biopuce sur laquelle induire l'effet photothermique recherché. Sous l'angle d'incidence approprié, l'énergie des photons incidents est en premier lieu partiellement convertie en oscillation collective des électrons (plasmon de surface) puis finalement dissipée en chaleur dans le milieu environnant. La puissance laser effective absorbée par couplage avec les plasmons de surface est de l'ordre de  $1 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$ .

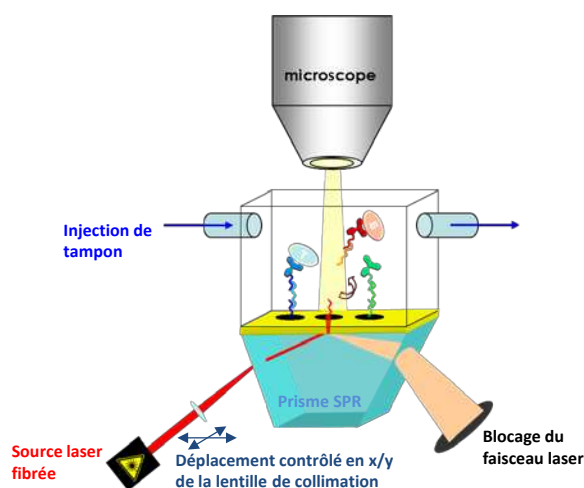


Figure 3. Schéma du dispositif expérimental utilisé en mode laser : configuration optique pour le chauffage SPR localisé permettant la désorption photothermique des espèces capturées sous l'effet du rayon laser

La libération des cellules dépend des propriétés thermosensibles des doubles brins d'ADN. Ces derniers, sous l'effet du chauffage, se déshybrident, ce qui entraîne le relargage contrôlé des objets ciblés (ici des lymphocytes). En premier lieu, des assemblages moléculaires assurent la capture spécifique de cellules sur une puce à ADN. Les expériences ont été réalisées sur un prisme recouvert d'or et fonctionnalisé par électropolymérisation (Fuchs *et al.*, 2010a) avec de courtes séquences d'ADN, les oligonucléotides Zip1, Zip2 et Zip3. Le réseau de sondes d'ADN était composé de plusieurs plots de 1 mm de diamètre. La puce a ensuite été assemblée dans un système micro-fluidique intégré au dispositif SPRi et convertie

en puce à anticorps capables de réaliser des captures spécifiques de cellules par l'intermédiaire d'anticorps conjugués à de l'ADN (Bombera *et al.*, 2012). Les cellules ont ensuite été injectées sur la puce grâce au circuit micro-fluidique. L'assemblage moléculaire a été érigé à l'aide de brins d'ADN intermédiaires (Zip1\*-ZipI, Zip2\*-ZipII, Zip3\*-ZipIII où Zip1\*, Zip2\* et Zip3\* correspondent respectivement aux séquences complémentaires de Zip1, Zip2 et Zip3) et complété par des anticorps liés covalamment à des ADN complémentaires des brins intermédiaires (ZipI\*, ZipII\*, ZipIII\*) (Bombera *et al.*, 2012).

Le détail des procédures de préparation des sondes, de leur greffage, du dispositif expérimental et du traitement des données est décrit dans la partie suivante.

### 3. Matériel et méthodes

#### 3.1. Réactifs

Les réactifs suivants ont été commandés chez Sigma-Aldrich (France) : IgG de sérum de lapin (IgG R), NaCl, NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Diméthylsulfoxyde (DMSO), Tris (2-carboxyéthyle) Phosphine acide chlorhydrique (TCEP), 1-Dodecanethiol, tampon phosphate salin (PBS), albumine sérique bovine (BSA), sérum de veau fœtal (FBS), Concanavaline A (ConA), acide Éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA), milieu de culture RPMI-1640 et MgCl<sub>2</sub>. Le NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> et le N,N-Diméthylformamide (DMF) proviennent de Fluka. Le Tris-HCl (Tris(hydroxyméthyl) aminométhane) et l'agent de réticulation SM(PEG)12 (succinimidyl-[(N-maleimidopropionamido)-dodecaéthylenglycol]) ont été commandés chez Interchim (France). Le pyrrole a été acheté chez Tokyo Casei (Japon). L'anticorps monoclonal de rat anti-souris CD19 (clone: 1D3) et l'anticorps de rat anti-souris CD90 (clone: G7) ont été achetés chez BD Biosciences (France). L'anticorps de souris IgG anti domaine HcB a été généreusement fourni par L. Bellanger (CEA/Institut de biologie environnementale et biotechnologie IBEB, France). Tous les produits chimiques listés ci-dessus ont été utilisés sans purification supplémentaire. Les oligonucléotides ont tous été commandés chez Eurogentec (France) et sont listés dans le tableau 1. Les oligonucléotides (Zip1, Zip2, R), portant à l'origine un groupement amine primaire à leur côté 5', ont été couplés covalamment à un groupement pyrrole comme décrit pour les protéines par Livache *et al.* (1994) et Mailley *et al.* (2005).

Tableau 1. Séquences des oligonucléotides utilisés dans l'étude

Nom	Séquences 5' → 3'
Sondes	
Zip1	pyrrole-(T <sub>10</sub> )-GACCGGTATGCGACCTGGTATGCG
Zip2	pyrrole-(T <sub>10</sub> )-GACCATCGTGCGGGTAGGTAGACC
Zip3	pyrrole-(T <sub>10</sub> )-TGCGATCGCAGCGGTAACCTGACC
R	pyrrole-(T <sub>10</sub> )-TGGAGCTGCTGGCGT
Brins complémentaires	
Zip1*	CGCATACCAGGTGCGATACCGGTC
Zip2*	GGTCTACCTACCCGCACGATGGTC
Brins intermédiaires	
Zip1*-ZipI	TACCTTCG-GAATTC- ACTCGCACCGCATACCAGGTGCGATACCGGTC
Zip2*-ZipII	GACAAGGT-CAGCTG- TAGGCAAGGGTCTACCTACCCGCACGATGGTC
Zip3*-ZipIII	CACTCACT-CCATGG- GCACTTGCGGTCAGGTTACCGCTGCGATCGCA
Cibles	
ZipI*	GTGCGAGT-GAATTC-CGAAGGTA-(T <sub>10</sub> )-SH
ZipII*	CTTGCCTA-CAGCTG-ACCTTGTC-(T <sub>10</sub> )-SH
ZipIII*	GCAAGTGC-CCATGG-AGTGAGTG-(T <sub>10</sub> )-SH

\* Les brins complémentaires sont indiqués par un astérisque.

### 3.2. Méthodes de synthèse

#### 3.2.1. Fonctionnalisation de la puce à ADN

La puce à ADN a été préparée sur un prisme en verre recouvert d'une couche d'or de 45 nm d'épaisseur fourni par Horiba Scientific (France). Avant la fonctionnalisation, la surface d'or a été nettoyée à l'aide d'une solution piranha (mélange 2:1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Attention, le mélange piranha est très exothermique et réagit fortement avec les matières organiques)) et immergée dans une solution de 1-dodecanethiol à 20 mM dans de l'éthanol, à température ambiante, pendant 30

minutes. La surface a ensuite été rincée avec de l'éthanol et de l'eau déionisée (18,2 M $\Omega$ .cm). Le greffage des sondes ADN a été réalisé par électro-polymérisation comme décrit par Livache *et al.* (1994) et Mailley *et al.* (2005). Pour chaque sonde, une solution contenant 20 mM de pyrrole et 10  $\mu$ M de sonde couplée à un pyrrole en 5' a été préparée (dans de l'eau contenant 30 % d'acétonitrile, 20 % de DMSO, 0,5 % de glycérol et 0,1 M de LiClO<sub>4</sub>). Les sondes ont alors été polymérisées sur la surface d'or à l'aide d'un cône de micro-pipette et grâce à des impulsions électriques d'amplitude 2 V et de durée 100 ms. Les plots d'ADN obtenus par cette méthode mesuraient 800  $\mu$ m de diamètre et la densité des oligonucléotides a été estimée à 10 pmol.cm<sup>-2</sup> (Guedon *et al.*, 2000). Plusieurs plots d'ADN contenant les mêmes sondes (réplicas) ont été greffés afin de couvrir la plus grande surface possible (environ 0,5 cm<sup>2</sup> par type de sonde). La puce ainsi préparée a été séchée, stockée à 4°C et utilisée dans les jours suivants sa préparation.

### 3.2.2. Couplage anticorps-ADN

Le couplage entre l'ADN et les anticorps IgG a été réalisé grâce à l'agent de réticulation hétéro-bifonctionnel SM(PEG)12. La première étape a consisté à lier covalamment les IgG et SM(PEG)12. L'anticorps IgG approprié a été dilué à 5  $\mu$ M dans du PBS de pH 7.4 et mélangé avec un large excès (100 molaire) de SM(PEG)12. La réaction d'activation de la protéine s'est déroulée pendant une heure à température ambiante. L'anticorps activé a ensuite été purifié sur une colonne NAP-5 (GE Healthcare) équilibrée auparavant avec du tampon PBE (tampon PBS de pH 6.8 contenant 5 mM d'EDTA) afin de retirer l'excès de SM(PEG)12. L'éluat purifié a ensuite été concentré par centrifugation (15 min, 15000 g) à travers des membranes filtrant des poids moléculaires de 30 kDa puis resuspendu dans du PBE. La concentration de la protéine activée a été déterminée par la mesure de son absorbance à 280 nm. En parallèle, les oligonucléotides thiolés, dilués dans l'eau déionisée (50  $\mu$ M), ont été mélangés avec du TCEP (concentration finale 5 mM) afin de réduire les ponts disulfure potentiellement formés entre les oligomères d'ADN thiolés. Nous avons laissé la réduction se produire pendant 30 minutes à température ambiante. Les oligonucléotides ont ensuite été purifiés sur une colonne NAP-5, élués dans du PBE et concentrés par centrifugation (15 min, 15000 g) à travers des membranes filtrant des poids moléculaires de 3 kDa. La concentration finale dans le PBE a été déterminée via la mesure d'absorbance des échantillons à 260 nm.

Les solutions d'oligomères d'ADN réduits et les anticorps activés ont ensuite été couplés. Nous avons mélangé les protéines activées et les brins d'ADN dans les proportions 2 pour 1, et les avons laissés réagir pendant une nuit à température ambiante. L'échantillon a ensuite été concentré par centrifugation (15 min, 15000 g) à travers des membranes filtrant des poids moléculaires de 30 kDa et le tampon a été remplacé par du PBS de pH 7.4. Les protéines n'ayant pas réagi ainsi que les produits de conjugaison ont été séparés sur une colonne échangeuse d'anion HiTrapHM Q FF 1 mL (GE Healthcare). Les espèces ont été éluées de la colonne

par un gradient de NaCl en flux à 1 mL/min à partir d'un tampon de départ composé de Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM et de pH 8.0. Les fractions collectées ont été concentrées par centrifugation (15 min, 15000 g) à travers des membranes filtrant des poids moléculaires de 30 kDa et resuspendues dans du PBS de pH 7.4. La charge en ADN des protéines a été estimée en déterminant les absorbances des produits conjugués à respectivement 260 et 280 nm (Niemeyer *et al.*, 1994)

### 3.3. Procédures expérimentales

#### 3.3.1. Culture cellulaire

Des splénocytes primaires ont été collectés à partir d'une souris adulte C57Bl/6 (en collaboration avec l'Institut Albert Bonniot, France). Juste après le retrait de la rate, les cellules ont été tamisées à travers les mailles d'une grille et mises en culture dans du milieu RPMI. La suspension cellulaire a ensuite été centrifugée (5 min, 300 g) et incubée dans un tampon de lyse (8.3 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 0.8g/L NaHCO<sub>3</sub>, 0.04 g/L EDTA) pendant 5 minutes afin d'éliminer les globules rouges. Le mélange des lymphocytes B et T a été lavé dans du PBS et à nouveau centrifugé (5 min, 300 g). Le culot de cellules a été resuspendu dans du milieu de culture cellulaire RPMI supplémenté en FBS (10%), pénicilline (50 µg/mL) et streptomycine (50 µg/mL). De la concavaline A a été ajoutée au milieu à 2 µg/mL afin de stimuler la prolifération des lymphocytes T. Les cellules ont été cultivées pendant 24 à 72h à 37°C dans un environnement à 95 % d'humidité et 5 % de CO<sub>2</sub> (Forma Steri Cycle CO<sub>2</sub> Incubator, Thermo Scientific). Avant l'injection dans le système microfluidique, les cellules ont été centrifugées (5 min, 300 g) et suspendues à une concentration comprise entre 3,0 et 5,0 10<sup>6</sup> cellules/mL dans du PBS complété par 20 % (v/v) de N,N-diméthylformamide (DMF). La viabilité des cellules dans du PBS complété par 20% de DMF a été mesurée et reste supérieure à 95 % pour des temps d'incubation allant jusqu'à trois heures. Dans le cas de notre étude, les lymphocytes sont suspendus dans ce tampon pendant un temps court (moins d'une heure). Bien que le DMF puisse altérer la morphologie et la croissance des cellules, cet effet est réversible comme l'ont démontrés plusieurs études (Li *et al.*, 1997 ; Dexter *et al.*, 1979 ; Grunt *et al.*, 1992). Un tel tampon peut donc être utilisé avec succès dans un objectif de tri cellulaire.

#### 3.3.2. Mesure des températures de dissociation

Nous avons mesuré les températures de dissociation des duplexes Zip1/Zip1\* et Zip2/Zip2\* (Zip1\* et Zip2\* sont respectivement les séquences complémentaires de Zip1 et Zip2). Des prismes recouverts d'or (Horiba Scientific - GenOptics, France) ont été fonctionnalisés par électropolymérisation de polypyrrole comme décrit plus haut (fonctionnalisation de la puce à ADN). Quatre plots par séquence (au minimum) ont été greffés afin d'évaluer la reproductibilité expérimentale. Sur chaque biopuce on a également greffé un plot contrôle de polypyrrole non fonctionnalisé et un plot d'ADN de séquence non complémentaire (Zip3) afin de



vérifier la spécificité de l'hybridation. Toutes les expériences ont été réalisées sur un dispositif d'imagerie SPR maison contrôlé en température (décrit par Fiche *et al.*, 2007). Le tampon utilisé était du PBS, 20% DMF (v/v). Pour l'hybridation, les ADN complémentaires (Zip1\* et Zip2\*) ont été introduits dans le tampon à une concentration de 200 mM. L'hybridation a été menée pendant 10 minutes à 23°C sous un flux de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Ensuite, après 3 minutes de rinçage, une rampe de température contrôlée a été appliquée au rythme de 2°C/min jusqu'à 80°C. Ainsi, nous avons obtenu des courbes de dénaturation thermique hors équilibre pour tous les plots d'ADN du prisme. Afin de déterminer la température de dissociation ( $T_D$ ), définie comme la température où il reste 50 % du signal initial d'hybridation (Urakawa, 2002 ; Pozhitkov *et al.*, 2007), les courbes de dénaturation ont été normalisées à 1 et moyennées sur les plots identiques. Pour plus de détails sur la procédure, se référer à Fuchs *et al.*, (2010b).

### 3.3.3. Dispositif d'imagerie SPR et de désorption photothermique

Les expériences de désorption photothermique ont été réalisées sur un dispositif SPRi maison basé sur la configuration classique de Kretschmann (Kretschmann *et al.*, 1968). Le prisme recouvert d'or et fonctionnalisé par des sondes ADN, a été placé dans le système de détection optique et assemblé à un module microfluidique (Figure 2) pour assurer le contact avec le milieu biologique. Le faisceau incident collimaté ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ ) a été généré par une diode électroluminescente (LED) associée à :

- un sténopé (0,5 mm de diamètre),
- une lentille ( focale de 50 mm),
- un polariseur linéaire monté sur un support tournant.

Le signal réfléchi a été enregistré par une caméra CCD (pike F-145B par Allied Vision Technologies GmbH) à l'aide d'une lentille d'imagerie VZMTM 600i zoom (Edmund optics) permettant la détection en temps réel des interactions spécifiques. (figure 2). Afin de produire l'effet photothermique, un laser rouge a été ajouté au système optique classique (figure 3). Selon les expériences, deux faisceaux laser d'intensité modulable ont été utilisés. Pour les expériences moléculaires, le faisceau était issu d'une diode laser de puissance 100 mW, de longueur d'onde 665 nm. Pour les expériences cellulaires, le faisceau provenait d'un laser fibré (Laser diode driver KS3-22312-103, BWT Beijing LTD) d'une puissance de 500 mW et de longueur d'onde 653 nm associé à un objectif 10X/0.33 Olympus UPlan FLN. Dans les deux cas, l'angle d'incidence et la polarisation du laser chauffant ont été précisément ajustés pour optimiser la génération des plasmons de surface. Cette optimisation a été réalisée en mesurant le minimum de l'intensité de la lumière transmise à l'aide d'un puissance-mètre (Edmunds). Les spots laser ont été focalisés sur la surface d'or pour minimiser leur taille et maximiser la puissance.

En mesurant la perte de puissance et la taille effective des spots laser sur la surface d'or, le maximum de la puissance surfacique déposée a été estimé à  $1,9 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$  pour le premier dispositif (diode laser) et à  $1 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$  pour le second (laser fibré).

La position relative du faisceau focalisé était contrôlée par des moteurs externes pas à pas (Oriel 18011) ou avec des supports manuels de translations linéaires, permettant un déplacement précis de la trace du laser sur la surface du prisme. Un microscope (Olympus BXFM) associé à un objectif approprié (10X/0.33 Olympus UPlanFLN et X4/0.1 Edmund Micro plan), placé au-dessus du prisme, nous a permis de visualiser les étapes de capture-relargage des cellules par microscopie optique classique. Les acquisitions ont été réalisées avec une caméra Lumenera Infinity2-3C. Afin de visualiser par microscopie la trace du laser, la lumière du microscope a été réduite quasiment à son minimum. Malgré l'importante puissance surfacique du faisceau laser, comme l'incidence correspond à une réflexion totale, l'intensité de la lumière transmise était très faible (quelques  $\mu\text{W}$ ).

#### 3.3.4. *Chambre de réaction microfluidique*

La chambre de réaction est de forme rectangulaire, avec des coins arrondis et sa zone de travail mesure  $140 \mu\text{m}$  de profondeur et  $9 \text{ mm}$  de largeur (figure 4). La longueur entre les entrées et sortie du fluide est de  $15 \text{ mm}$ . Les observations et traitements ont été effectués sur une zone centrale du prisme de  $9 \times 9 \text{ mm}^2$ .

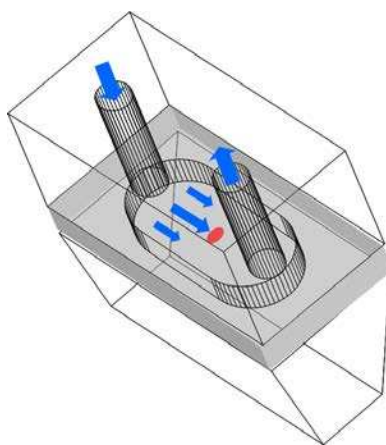


Figure 4. *Illustration du dispositif microfluidique*

Le système microfluidique était muni d'une boucle d'injection de  $200 \mu\text{L}$ , d'une pompe seringue de  $50 \text{ mL}$  (A-99, razel Scientific Instruments Inc.) et de tuyaux en polyéthylène ( $\text{ID} = 760 \mu\text{m}$ ).

### 3.3.5. Déroulement de l'expérience de capture/relargage

Avant l'expérience, la puce à ADN a été nettoyée aux ultra-sons dans un bain d'eau déionisée pendant 1 à 2 minutes. La biopuce a ensuite été assemblée dans le dispositif microfluidique. Les étapes nécessaires à la conversion de la puce à ADN en puce à anticorps ont été effectuées sur la puce sous un flux de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Tout d'abord, afin de réduire les interactions non spécifiques, la surface de la biopuce a été bloquée par une injection de BSA à 10  $\mu\text{M}$  et de cytochrome c à 5  $\mu\text{M}$  dans du PBS de pH 7.4. Les échantillons moléculaires ont été préparés dans le tampon (PBS, pH 7.4 complété avec 20% de DMF) et injectés manuellement. Les brins d'ADN complémentaires (brins intermédiaires Zip1\*-ZipI, Zip2\*-ZipII, Zip3\*-ZipIII) ont été introduits dans le tampon à une concentration de 200 nM (200  $\mu\text{L}$ ). L'hydratation des brins complémentaires a été suivie par l'injection des conjugués ADN-IgG (anti-CD19IgG-ZipI\*, anti-CD90IgG-ZipII et anti-HcBIgG-ZipIII\*) à 50 nM. Dans le cas des expériences sur les cellules, les injections de splénocytes ( $5 \times 10^6$  cellules/mL) ont été réalisées juste après l'assemblage moléculaire. Le flux de ces injections a été au départ fixé à 80  $\mu\text{L}/\text{min}$  pour empêcher la sédimentation des cellules dans les tuyaux microfluidiques et réduit ensuite à 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  lorsque les cellules arrivaient sur la puce afin de minimiser les forces de cisaillement et favoriser leur capture. La capture spécifique des cellules a été suivie par microscopie optique, sous des grossissements de 4 ou 10 fois et enregistrée par une caméra (Infinity2-3C, Lumenera). Pour induire la désorption, la source laser a été manuellement introduite entre la caméra et le prisme et le flux a été augmenté à 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Le spot laser a balayé la surface d'or à une vitesse comprise entre 10 et 200  $\mu\text{m}/\text{s}$  afin de ne pas détériorer la surface d'or. Nous ne souhaitons pas récupérer les cellules dans ces expériences. Pour la seconde capture de cellules, toutes les étapes de préparation de la biopuce ont été faites de la même façon. A la fin, la biopuce a été régénérée par une solution de soude à 0,1 M pendant 2 à 3 minutes, lavée à l'eau déionisée et séchée sous un flux d'argon. Le système microfluidique a été nettoyé avec de l'eau de Javel à 2 % pendant 30 minutes et lavée avec du SDS 1 % puis rincée à l'eau déionisée. Toutes les expériences ont été réalisées en chambre noire à température ambiante (25°C).

### 3.3.6. Analyse et traitement des données SPRi

Les données d'imagerie SPR (SPRi) ont été acquises à l'aide du logiciel SPRi-ViewL3.1.2 (Horiba Scientific-GenOptics) que nous avons adapté à notre dispositif expérimental. L'acquisition du signal de réflectivité, enregistré avec une caméra haute fréquence F-145B, a démarré après l'injection de cytochrome c et la stabilisation de la ligne de base. Les images ont été enregistrées dès le début de chaque injection afin de suivre chaque étape de l'expérience. Les valeurs de réflectivité ont été moyennées sur chaque famille de sonde et tracées en fonction du temps après correction. La correction a consisté à retirer à chaque signal SPRi moyenné le signal du plot de référence. Cela a permis d'éliminer les décalages de réflectivité dus aux changements d'indice global du milieu suite aux injections des

différentes solutions (données brutes non fournies). Les images SPRI différentielles, les images des cellules et les films ont été obtenus par optimisation du contraste à l'aide du logiciel de traitement d'image ImageJ (ImageJ v1.43u, National Institutes of Health, USA).

### 3.3.7. *Analyse d'images pour la détermination de la densité cellulaire*

Afin de quantifier les efficacités des captures (première et seconde) et du relargage des cellules, nous avons analysé avec ImageJ (ImageJ v1.43u, National Institutes of Health, USA) les images des cellules prises au microscope. Les images couleur ont été converties en niveau de gris et nous avons appliqué un filtre passe bande afin de détecter les cellules sur les images. Le nombre de cellules a été déterminé à l'aide du module « particule analysis » d'ImageJ. La surface de chaque zone analysée a été calculée pour obtenir la densité surfacique des cellules. Les taux de désorption et de seconde capture ont été calculés en prenant en compte uniquement les zones de désorption. Ces analyses ont été menées sur 2 à 4 réplicas afin d'évaluer la dispersion des résultats.

### 3.3.8. *Test de résistance à la température*

Afin de déterminer l'impact du traitement thermique sur les cellules et de réaliser des mesures de viabilité statistiquement significatives, nous avons mis au point un dispositif permettant de chauffer une quantité importante de splénocytes. Les conditions expérimentales ont été choisies au plus près des conditions réelles mises en œuvre par la désorption photothermique. Afin d'obtenir une élévation rapide de température jusqu'à 65°C, nous avons utilisé une lame de microscope recouverte sur un côté d'oxyde d'indium-étain (Indium Tin Oxide, ITO) (Aldrich). Le chauffage a été réalisé en appliquant une tension à la couche d'ITO entre deux électrodes parallèles. Nous avons contrôlé et mesuré en temps réel l'évolution de la température de la surface d'ITO grâce à un logiciel Labview de régulation thermique pilotant une alimentation électrique réglable.

Les splénocytes primaires ont été collectés comme décrit en 3.3.1 et resuspendus dans du milieu de culture RPMI à une concentration de  $2.0 \cdot 10^6$  cellules/mL. Deux séries de mesures de viabilité ont été effectuées par l'analyseur de viabilité Vi-Cell XRcell (Beckman Coulter) à partir de 100  $\mu$ L de suspension cellulaire par série. Pour la condition « sans chauffage », l'échantillon (100  $\mu$ L) de cellules a été déposé sur la surface de verre et collecté par rinçage dans 1,9 mL de milieu RPMI. Pour la condition « avec chauffage », l'échantillon a été chauffé à 65°C pendant 3 secondes et collecté de la même façon.

## **4. Résultats et discussion**

La faisabilité de la désorption a tout d'abord été démontrée sur l'assemblage moléculaire (ADN/ADN intermédiaire/ADN complémentaire-anticorps). Des anticorps modèle (IgG de lapin) ont été utilisés et incorporés sur la biopuce dans cet

objectif. L'imagerie par SPR a permis la visualisation en temps réel des étapes de construction de l'assemblage moléculaire sur la puce (figure 5a). Une fois les assemblages moléculaires ADN-IgG terminés, la désorption spécifique de certaines sondes a été induite par chauffage laser. Le relargage a été réalisé en concentrant le faisceau laser sur une zone ciblée de la biopuce. Afin de réduire la température de dissociation des ADN double brins et d'assurer une dénaturation efficace des substrats, nous avons utilisé un tampon composé de PBS (Phosphate salin buffer) comprenant 20 % (v/v) d'agent déstabilisant N,N-diméthylformamide (DMF). Le DMF permet d'abaisser la température de dissociation des ADN double-brin d'en moyenne  $0,58 \pm 0,05$  °C/%DMF (Bressan *et al.*, 1974). Nous avons vérifié qu'il n'affectait pas la survie cellulaire. La libération des anticorps a été réalisée pour les sondes (Zip2 et Zip3) en focalisant la source laser sur les plots correspondant à la surface de la biopuce. On observe une diminution de la réflectivité correspondant au relargage adéquat des composants ciblés. Cette observation est confirmée par l'image SPR qui révèle les zones où le matériel biologique a été enlevé (figure 5b). Une fois la désorption terminée, de l'ADN complémentaire correspondant au matériel désorbé a été réintroduit dans le système et correctement ré-hybridé. Les architectures moléculaires ont donc été restaurées ainsi que le signal SPR, prouvant ainsi l'intégrité et la capacité de régénération de la biopuce.

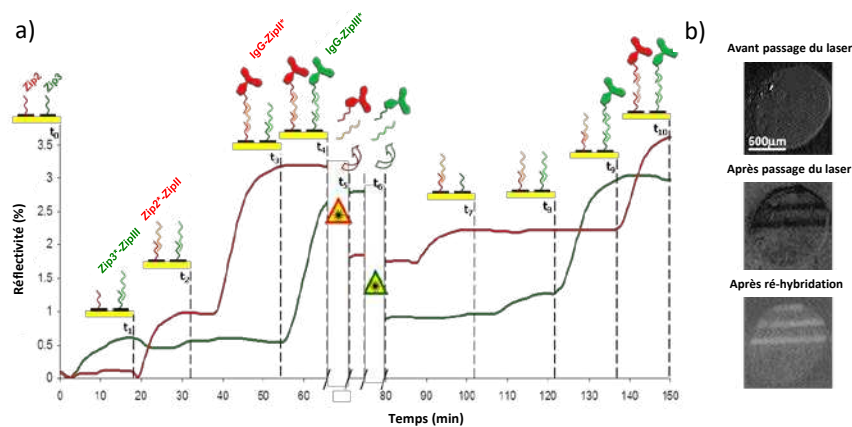


Figure 5. Contrôle en temps réel de la construction moléculaire de la biopuce et de la désorption induite par chauffage laser localisé. a) Réflectivité enregistrée pour les sondes Zip2 et Zip3 :  $t_0$  : puce originale à ADN (Zip2 et Zip3);  $t_1, t_2$  : hybridation des brins intermédiaires ;  $t_3, t_4$  : hybridation des anticorps conjugués à l'ADN ;  $t_5$  : désorption de Zip2 ;  $t_6$  : désorption de Zip3 ;  $t_7-t_{10}$  : re-hybridation des brins complémentaires conjugués aux anticorps. b) Image SPR d'un plot d'ADN avant et après désorption laser suivie de l'étape de ré-hybridation

Les résultats précédents ayant validé le concept de la désorption localisée des assemblages moléculaires, nous avons ensuite testé la désorption de cellules vivantes. Des splénocytes de souris, contenant à la fois des lymphocytes B et T, ont été immobilisés à la surface de la biopuce grâce à des anticorps spécifiques : anti-CD19 et anti-CD90 respectivement. Ces anticorps ont été au préalable conjugués avec les oligonucléotides ZipI\* et ZipII\* (respectivement complémentaires des brins intermédiaires ZipI et ZipII) puis immobilisés sur les plots Zip1 et Zip2. L'oligonucléotide ZipIII\* (complémentaire de ZipIII) a été conjugué avec un anticorps anti-HcB incapable de reconnaître les cellules B et T et a servi de contrôle négatif. La suspension de splénocytes a été injectée dans le circuit de microfluidique et mis en contact avec la puce à anticorps. L'immobilisation des cellules a été imagée par microscopie (figure 6,  $t_0$ ). L'introduction de la suspension cellulaire a entraîné une capture efficace des lymphocytes B et T sur les plots Zip1 et Zip2 respectivement ( $\sim 300$  cellules/plot) et pas de capture significative sur le plot contrôle Zip3. Après immobilisation des lymphocytes sur la puce, nous avons procédé au détachement des cellules par illumination laser et sous flux. La désorption photothermique a été induite localement sur chaque plot et suivie en temps réel par microscopie (figure 6,  $t_1$  à  $t_3$  et vidéos (information complémentaire)). Les images suggèrent que le passage du laser induit un détachement instantané des cellules. Le contrôle à distance de la trajectoire du faisceau laser permet les relargages successifs et indépendants des lymphocytes B et T. Le taux de détachement a été mesuré et estimé à  $89 \pm 6\%$  (figure 7) pour les deux types cellulaires. La seconde capture semble être légèrement plus efficace que la première. Cela est probablement dû à la variabilité intrinsèque de l'efficacité de capture.

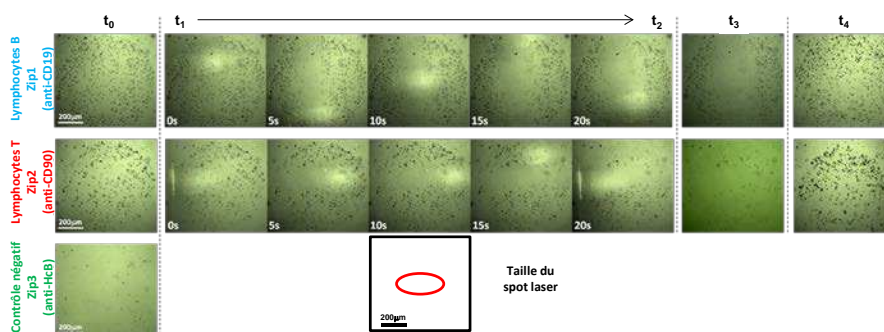


Figure 6. Désorption localisée de lymphocytes par chauffage local.  $t_0$ ) image au microscope de cellules capturées sur leurs plots spécifiques ADN/anticorps ;  $t_1$ ,  $t_2$ ) relargage localisé des cellules durant le passage du laser (le plot Zip1 est balayé verticalement, le plot Zip2 horizontalement) ;  $t_3$ ) plots ADN/anticorps observés après le passage du laser ;  $t_4$ ) ré-hybridation de cellules sur leurs plots « sonde » spécifiques après reconstruction de l'assemblage moléculaire

Finalement, la biopuce a été régénérée avec succès et des cellules spécifiques ont à nouveau été efficacement capturées. La seconde capture, réalisée après ré-

hybridation, montre que le chauffage induit seulement l'ouverture de l'ADN double brin et que le système de tri cellulaire proposé est réutilisable (figure 6, t<sub>4</sub>).

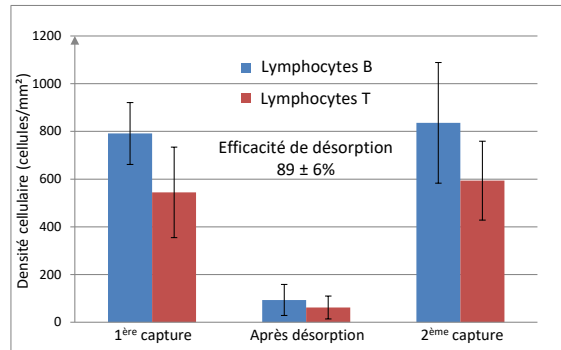


Figure 7. Efficacité de capture et de désorption des lymphocytes B et T. Les barres d'erreur représentent la déviation standard des densités cellulaires entre les répliques

Afin de déterminer la température à laquelle étaient exposées les cellules lors du chauffage, nous avons mesuré les températures de dissociation des doubles brins utilisés pour la capture cellulaire : Zip1/Zip1\* et Zip2/Zip2\*. Les courbes de dénaturation (figure 8) indiquent une température de dissociation égale à  $63 \pm 3$  °C. La température à laquelle sont exposées les cellules est très probablement équivalente. Cependant le détachement est rapide, grâce au flux les cellules restent exposées moins de 3 secondes (estimation effectuée par l'analyse des séquences des désorptions).

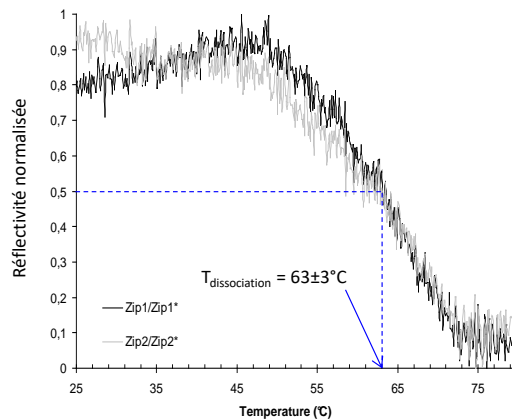


Figure 8. Courbes de dénaturation pour Zip1/Zip1\* et Zip2/Zip2\* obtenues dans du PBS 20 % DMF

Afin d'estimer l'impact sur les cellules de la température induite par le chauffage laser, nous avons exposé des splénocytes à 65°C pendant 3 secondes. Nous avons ensuite mesuré les proportions de cellules vivantes dans les échantillons chauffés et non chauffés (figure 9). Le taux de cellules vivantes est de 95 % dans l'échantillon non chauffé et passe à 75 % dans l'échantillon chauffé. On constate donc que le taux de (sur)mortalité dû au chauffage n'excède pas 16 points. Pour des développements futurs, d'autres solutions pourraient être envisagées pour réduire la température à laquelle sont exposées les cellules. Par exemple, nous pourrions utiliser un laser pulsé afin d'augmenter le gradient de température entre la surface et les cellules. Nous pourrions également utiliser des séquences d'ADN présentant des défauts d'appariement et donc des températures de dissociation plus faibles.

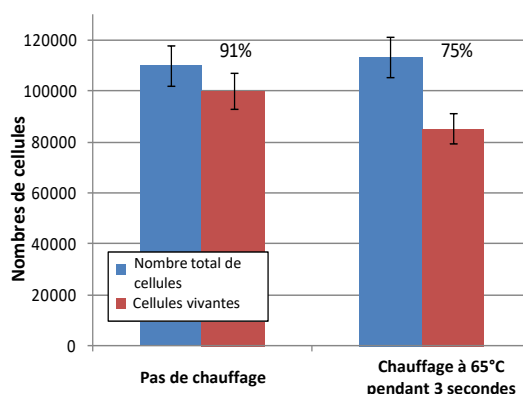


Figure 9. Comptages cellulaires et mesures de viabilité sur les échantillons chauffés à 65°C et non chauffés. Les barres d'erreur représentent la déviation standard entre trois mesures indépendantes (7 %)

## 5. Conclusion

Nous avons développé une micro-plateforme capable de réaliser la capture multiplexée de cellules vivantes spécifiques et leur désorption contrôlée. Ce système est basé sur la conjugaison d'anticorps et de brin d'ADN et tire profit des propriétés thermodynamiques de l'ADN. Cette approche innovante constitue une méthode précise, économe (en réactif) et non invasive pour le tri cellulaire multiplexé. Dans l'avenir, cette biopuce pourrait être adaptée pour capturer et relâcher plus de deux types cellulaires et permettre l'analyse d'échantillons biologiques bruts tels que le sang. Cela nécessiterait l'intégration d'acides nucléiques stabilisés chimiquement afin d'améliorer la résistance de l'ADN aux nucléases présentes dans le sang. Ces modifications n'engendreraient pas de changements significatifs des propriétés thermodynamiques de la molécule. Notre approche pourrait alors être utilisée pour étudier par exemple des phénomènes immunologiques complexes : les cellules, tout



d'abord identifiées et triées, pourraient être individuellement détachées pour des analyses ultérieures telles que le séquençage d'ADN ou d'ARN.

#### *Remerciements*

*Les auteurs remercient l'Agence Nationale pour la Recherche pour le financement de ce projet (Multicells, ANR-BLANC-1519-01) ainsi que la fondation Nanosciences RTRA pour le financement de la thèse de R.B. Ce travail a également été soutenu par le Labex ARCANE (ANR-11-LABX-0003-01).*

#### **Bibliographie**

- Adams J.D., Kim U., Soh H.T. (2008). Multitarget magnetic activated cell sorter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105, p. 18165-18170
- Anderson N.L., Anderson N.G. (2002). The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics*, 1, p. 845-867
- Bombera R., Leroy L., Livache T., Roupioz Y. (2012). DNA-directed capture of primary cells from a complex mixture and controlled orthogonal release monitored by SPR imaging. *Biosensors and Bioelectronics*. 33, p. 10-16. doi.org/10.1007/978-1-61779-373-8\_5
- Bressan G., Rampone R., Bianchi E., Ciferri A. (1974). DNA conformation in N,N-dimethyl formamide-H<sub>2</sub>O solutions. *Biopolymers*, 13, p. 2227-2240.
- Chen Q., Fisher D.T., Kucinska S.A., Wang W.C., Evans S.S. (2006). Dynamic control of lymphocyte trafficking by fever-range thermal stress. *Cancer Immunol Immunother*, 55, p. 299-311.
- Dexter D.L., Barbosa J.A., Calabresi P.N. (1979). N,N-dimethylformamide-induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Res*. 39, p. 1020-1025.
- Didar T.F., Tabrizian M. (2010). Adhesion based detection, sorting and enrichment of cells in microfluidic Lab-on-Chip devices. *Lab Chip*. 10, p. 3043-3053
- Fiche J.B., Buhot A., Calemczuk R., Livache T. (2007). Temperature effects on DNA Chip Experiments from Surface Plasmon Resonance imaging: *Isotherms and Melting Curves Biophys. J.* 92, p. 935-946.
- Fuchs J., Dell'Atti D., Buhot A., Calemczuk R., Mascini M., Livache T. (2010a). Effects of formamide on the thermal stability of DNA duplexes on biochips. *Anal. Biochem.* 397, p. 132-134.
- Fuchs J., Fiche J.B., Buhot A., Calemczuk R., Livache T. (2010b). Salt concentration effects on equilibrium melting curves from DNA microarrays. *Biophys J.* 99, p. 1886-1895. doi: 10.1016/j.bpj.2010.07.002
- Grunt T.W., Somay C., Ellinger A., Pavelka M., Dittrich E., Dittrich C. (1992). The differential effects of N,N-dimethylformamide and transforming growth factor-beta 1 on a human ovarian cancer cell line (HOC-7). *J. Cell Physiol.* 151, p. 13-22.

- Guedon P., Livache T., Martin F., Lesbre F., Roget A., Bidan G., Levy Y. (2000). Characterization and optimization of a real-time, parallel, label-free, polypyrrole-based DNA sensor by surface plasmon resonance imaging. *Anal. Chem.* 72, p. 6003-6009.
- Hatakeyama H., Kikuchi A., Yamato M., Okano T. (2007). Patterned biofunctional designs of thermoresponsive surfaces for spatiotemporally controlled cell adhesion, growth, and thermally induced detachment. *Biomaterials.* 28, p. 3632-3643.
- Kajiyama T., Miyahara Y., Kricka L.J., Wilding P., Graves D.J., Surrey S., Fortina P. (2003). Genotyping on a thermal gradient DNA chip. *Genome Res.* 13, p. 467-475.
- Kim S.M., Lee SH, Suh KY. (2008). Cell research with physically modified microfluidic channels: a review. *Lab Chip.* 8, p. 1015-1023
- Kretschmann E., Raether H. (1968). Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light. *Zeitschrift Fur Naturforschung Part a-Astrofysik Physik Und Physikalische Chemie* A23, p. 2135-2136.
- Kwong G.A., Radu C.G., Hwang K., Shu C.J.Y., Ma C., Koya R.C. (2009). Comin-Anduix B, Hadrup SR, Bailey RC, Witte ON, Schumacher TN, Ribas A and Heath JR. Modular nucleic acid assembled p/MHC microarrays for multiplexed sorting of antigen-specific T cells. *J Am Chem Soc.* 131, p. 9695-9703. doi: 10.1021/ja9006707.
- Leroy L., Bombera R., Engel E., Calemczuk R., Laplatine L., Baganizi D.R., Marche P.N., Roupioz Y, Livache T. (2014). Photo-thermal Effect for Localized Desorption of Primary Lymphocytes Arrayed on an Antibody/DNA-based Biochip. *Lab Chip.* 14, p. 1987-1990.
- Li X.N., Du ZW, Huang Q., Wu J.Q. (1997). Growth-inhibitory and differentiation-inducing activity of dimethylformamide in cultured human malignant glioma cells. *Neurosurgery.* 40, p. 1250-1258; discussion p. 1258-1259.
- Liotta LA, Ferrari M, Petricoin E. (2003). Clinical proteomics: Written in blood. *Nature.* 425, p. 905. doi:10.1038/425905a
- Liu J., Bombera R., Leroy L., Roupioz Y., Baganizi D.R., Marche P.N. Haguët V., Mailley P., Livache T. (2013). Selective individual primary Cell capture Using locally bio-Functionalized Micropores, *Plos One.* 8, DOI 10.1371/journal.pone.0075717
- Livache T., Roget A., Dejean E., Barthet C., Bidan C., Teoule R. (1994). Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group. *Nucleic Acids Res.* 22, p. 2915-2921.
- Mailley P., Roget A., Livache T. (2005). Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins *Perspectives in Bioanalysis.* Palecek E., Scheller F., Wang J. (Eds), Elsevier. vol. 1, p. 297-330.
- Niemeyer CM, Sano T, Smith CL, Cantor CR. (1994). Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA--streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and the construction of supramolecular bioconjugates. *Nucleic Acids Res.* 22, p. 5530-5539.
- Pozhitkov A.E., Stedtfeld R.D., Hashsham S.A., Noble P.A. (2007). Revision of the Nonequilibrium Dissociation Approach For Identifying Mixed Microbial Communities Using Oligonucleotide DNA Arrays, *Nucleic Acids Res.* 35, e70.

- Roupioz Y., Berthet-Durore N., Leïchlé T., Pourciel J.B., Mailley P., Cortes S., Villiers M.B., Marche P.N., Livache T., Nicu L. (2009). Individual Blood-Cell Capture and 2D Organization on Microarrays. *Small*. vol. 5, n° 1, p. 493-1497
- Urakawa H., Noble PA, El Fantroussi S, Kelly JJ, Stahl DA. (2002). Single-Base-Pair Discrimination of Terminal Mismatches by Using Oligonucleotide Microarrays and Neural Network Analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, p. 235-244.
- Wang Y., Phillips C., Xu W., Pai J.H., Dhopeswarkar R., Sims C.E., Allbritton N. (2010). Micromolded arrays for separation of adherent cells. *Lab Chip*. 10, p. 2917-2924. doi: 10.1039/c0lc00186d
- Xiao X.J., Gao Y., Xiang J.A., Zhou F.M. (2010). Laser-Induced Thermal Effect in Surface Plasmon Resonance. *Anal. Chim. Acta*, 676, p. 75-80.
- Yeo W.S., Mrksich M. (2006). Electroactive Self-Assembled Monolayers that Permit Orthogonal Control over the Adhesion of Cells to Patterned Substrates. *Langmuir*, 22, p. 10816-18820.
- Zhu H., Yan J., Revzin A. (2008). Catch and release cell sorting: electrochemical desorption of T-cells from antibody-modified microelectrodes. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 64, p. 260-268. doi: 10.1016/j.colsurfb.2008.02.010.

