

Projet de recherche MICROBE

Du tissu aux microparticules : caractérisation multi-échelles, qualification et fonctionnalité de systèmes biologiques.

AAP 2013 Région Franche-Comté

Compte rendu scientifique.

Ce projet s'inscrit dans l'axe transverse Biom'@x (Sciences et Technologies vers une médecine personnalisée) de l'institut FEMTO-ST. Cet axe est un axe de recherche structurant pluri-science qui vise au développement de dispositifs intelligents, capables de comprendre de la façon la plus complète possible un système biologique à l'étude. Cette compréhension doit aboutir à la mise en évidence de lois de comportement qui, par des approches pronostiques, permettent une anticipation de l'évolution des systèmes biologiques visant à personnaliser les stratégies thérapeutiques.

Ce projet porte sur la caractérisation multi-échelles, la qualification et l'établissement des fonctionnalités de deux systèmes biologiques : les ovocytes humains manipulés en Procréation Médicalement Assistée (PMA) et les microparticules. Ces systèmes biologiques font l'objet d'actions de recherche collaboratives qui font intervenir FEMTO-ST et ses interlocuteurs dans le milieu médical Bisontin : CHRU de Besançon, SFR, UMR 1098, CIC, EFS, ...

Bilan des travaux effectués sur la caractérisation des ovocytes humains

Cette action pluridisciplinaire s'inscrit dans le cadre du développement des *Smart Systems d'aide à l'expertise des systèmes biologiques à l'échelle cellulaire*. Elle est focalisée sur l'expertise *in vitro* des cellules navigantes de type ovocyte humain et vise deux fonctionnalités :

(i) une fonctionnalité axée « mesure » permettant d'établir une caractérisation multimodale des ovocytes en phase de maturation sur une base de critères morphologiques, morphométriques, optiques et mécaniques.

(ii) une fonctionnalité axée « diagnostic automatique » permettant de déterminer grâce à la caractérisation qui précède le degré de maturité des ovocytes humains afin de procéder à la qualification des ovocytes matures.

Pour obtenir ces fonctionnalités, il est nécessaire à la fois d'étudier diverses modalités de caractérisation de l'ovocyte et de développer un nouvel instrument biomédical à usage unique et multimodal qui les intègre.

Les travaux menés se sont principalement appuyés sur trois axes de travail.

Le premier axe a consisté à utiliser une plateforme de mesure de nanoforce déjà existante (cf. figure 1) pour continuer à étudier la modalité de caractérisation mécanique sur des ovocytes à trois stades différents de maturité (VG, MI, MII). Cette plateforme a été fiabilisée au niveau de la mesure de force, son système de vision a été amélioré et son interface de pilotage a été modifiée pour pouvoir faire de la caractérisation en mode automatique avec des temps de cycles plus ou moins longs pour l'établissement des courbes de chargement et de déchargement mécanique (cf. figure 2). L'hystérésis présente dans ces courbes a permis de confirmer la nature visco-élastique du comportement de l'ovocyte humain. La plateforme a également permis de tester un modèle mécanique de l'ovocyte présent dans la littérature qui repose sur une indentation avec une pipette de microinjection. Ce modèle a été testé en déterminant le module de Young des ovocytes pour différentes déformations lors des sollicitations mécaniques (charges-décharges). Ces expérimentations, menées sur plusieurs dizaines d'ovocytes, ont permis de montrer que ce modèle n'est pas adéquat lorsque l'indenteur utilisé pour exercer une force sur l'ovocyte a le même diamètre qu'une pipette de contention (grand diamètre qui fait environ la moitié de l'ovocyte). Etant donné que des indenteurs de diamètre similaire à une pipette de contention seront utilisés sur le dispositif de caractérisation multimodale, il est nécessaire de développer un nouveau modèle mécanique de déformation. Une étude bibliographique a été menée et

il semble qu'aucun modèle dans la littérature ne corresponde aux hypothèses associées à la caractérisation des ovocytes lors du début de l'indentation (déformation entre deux plaques, cytoplasme présentant un volume constant (liquide incompressible) qui induit une augmentation de la surface membranaire et une augmentation de la pression du cytoplasme pendant l'indentation). Un nouveau modèle de déformation mécanique est par conséquent en cours de développement et devra être validé par une nouvelle campagne de mesure.

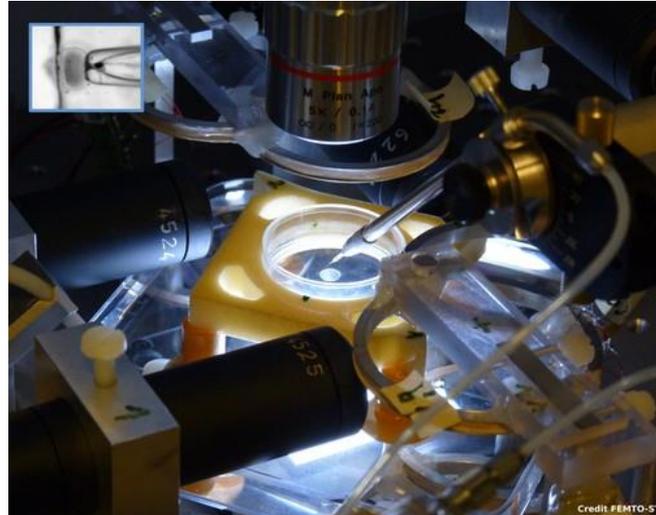


Fig.1 – Plateforme de mesure de nanoforce pour la caractérisation mécanique des ovocytes.

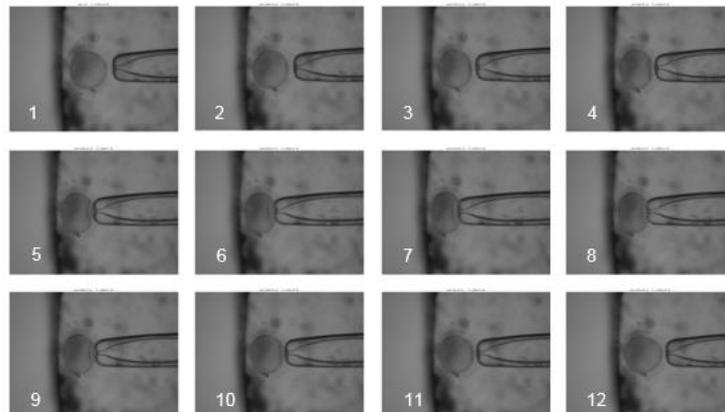


Fig.2 – Exemple de chargement et déchargement mécanique avec mesure simultanée de la force exercée sur l'ovocyte.

Le deuxième axe a consisté à démarrer le développement de l'instrument de caractérisation multimodal à usage unique. Les modalités intégrées sont la caractérisation morpho-optique, la caractérisation spectrale et la caractérisation mécanique. Seule les deux dernières modalités ont été intégrées car la première a déjà fait l'objet d'études par le passé et son intégration future ne posera pas de difficulté. Le prototype développé (cf. schéma de principe sur la figure 3) utilise des fibres optiques pour la caractérisation spectrale : un flux lumineux incident (lumière blanche) amené par une fibre optique émettrice traverse l'ovocyte et est récupéré par une fibre collectrice, puis le spectre de transmission correspondant est mesuré à l'aide d'un spectromètre. Tous les dispositifs optiques correspondants (source, atténuateur, fibres optiques et spectromètre), ont été acquis à l'aide du financement du projet et trois stagiaires ont travaillé sur cette tâche, dont un payé sur le projet qui a développé les logiciels d'acquisition et de post-traitement des mesures fournies par le spectromètre. Un nouveau prototype

utilisant des fibres amagnétiques (afin de ne pas perturber la caractérisation mécanique qui utilise un principe magnétique) est actuellement en cours de développement et remplacera prochainement le premier prototype développé (cf. figure 4).

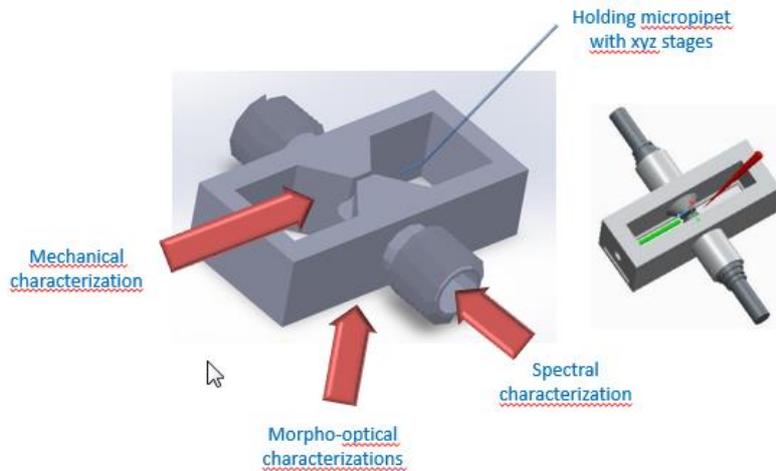


Fig. 3 – Schéma de principe du dispositif de caractérisation multimodale.

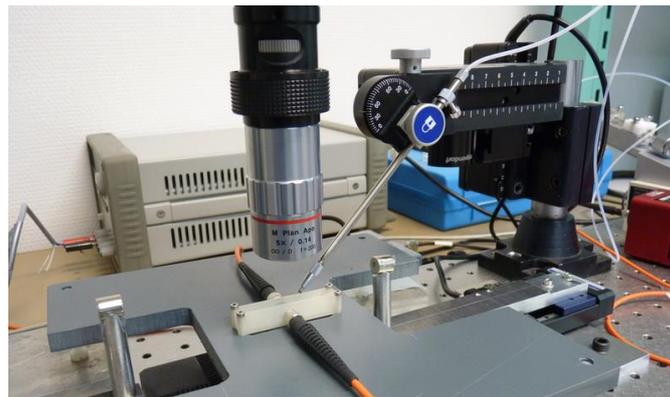


Fig. 4 – Intégration de la modalité spectrale sur le premier prototype du dispositif multimodal.

La modalité de caractérisation mécanique est quant à elle étudiée dans la thèse de doctorat financée sur le projet MICROBE. La prise en compte d'un cahier des charges très contraint (faible encombrement, très faible coût, usage unique, gamète-compatibilité) a conduit à concevoir un capteur de nanoforce reposant sur un concept nouveau qui n'a pas d'équivalent à l'échelle internationale. Contrairement à tous les capteurs de nanoforce qui utilisent des configurations stables dans l'espace, ce capteur utilise des ressorts magnétiques de très faible raideur (0.01 N/m typiquement) qui sont instables selon un axe et stables selon les autres. L'instabilité a été placée le long de l'axe de mesure et peut se basculer d'un côté ou de l'autre de cet axe. D'un côté elle permet de mettre un micro-indenteur en butée contre une paroi, de l'autre elle permet au micro-indenteur de venir effectuer un chargement mécanique sur l'ovocyte. La réaction mécanique du cytoplasme de l'ovocyte induit alors un équilibre mécanique stable de l'ensemble ovocyte-indenteur. Autrement dit, c'est l'élément caractérisé (l'ovocyte) qui stabilise le dispositif de caractérisation mécanique. Ce concept a été validé et dimensionné en simulation (cf. figure 5).

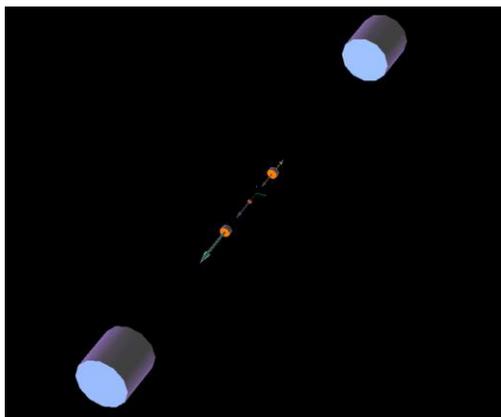


Fig.5 – Simulateur du transducteur force-déplacement instable selon un axe.

Le dispositif final est constitué de 2 « piscines » communicantes de part et d'autre de la zone de caractérisation spectrale (cf. figure 3). Elles sont remplies de liquide de culture. La première permet de manipuler l'ovocyte par aspiration, grâce à une micropipette de contention, pour l'amener puis le maintenir entre les fibres optiques transversales. La deuxième piscine contient le micro-indenteur piloté magnétiquement par un dispositif externe qui vient indenter l'ovocyte.

Les micro-indenteurs constitués d'un microcapillaire d'un centimètre de long avec à l'intérieur deux micro aimants de 500 μ m de diamètre ont été fabriqués et équilibrés en terme de répartition de masse pour pouvoir être stabilisés en immersion dans le liquide de culture des ovocytes. Le dispositif complet de caractérisation mécanique est en cours de montage et sera testé lors du dernier trimestre 2015. La table anti-vibration sur laquelle est le dispositif ainsi que la platine permettant de micropositionner la pipette de contention qui maintient l'ovocyte devant le micro-indenteur ont été acquis à l'aide du financement du projet.

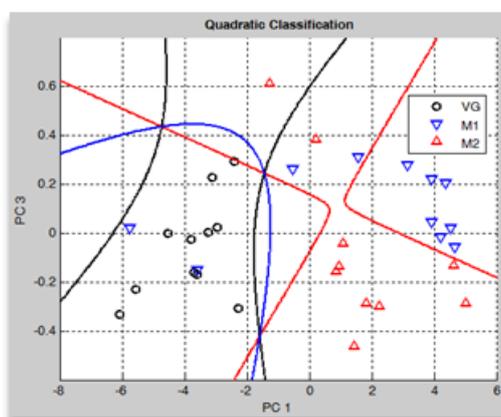


Fig. 6. Classifieur supervisé développé pour la caractérisation spectrale.

Le troisième axe, encore embryonnaire, a consisté à commencer à préparer le diagnostic automatique du degré de maturité des ovocytes. Comme le dispositif de caractérisation multimodale en cours de développement ne permet pas encore d'obtenir des données, les algorithmes de diagnostic ont été développés à partir d'anciens jeux parcellaires de données spectrales obtenus par le département d'Optique à l'aide d'un dispositif développés précédemment. Les premiers résultats de classification automatique des ovocytes en classes VG, MI, MII à l'aide d'une analyse en composantes principales (ACP) puis de nouvelles approches de diagnostic supervisés (développées par le département AS2M et combinant plusieurs classifieurs, cf. figure 6) semblent encourageants mais demandent à être poursuivis sur un nombre de mesures spectrales plus important. Il conviendra également d'étendre ces approches de classification à l'ensemble des modalités intégrées sur le dispositif.

L'ensemble de ces travaux n'a pas encore donné lieu à publications car il est nécessaire de disposer d'un prototype multimodal fonctionnel pour cela. Le démarrage de l'activité de publication est prévu pour le 3^e trimestre 2015.

Bilan des travaux effectués sur la qualification et la quantification des microparticules sanguines circulantes

Les microparticules (MPs) sont des microvésicules, mesurant de 100 nm à 1 µm, qui émanent des membranes de tous les types cellulaires, et sont présentes physiologiquement dans le plasma. L'étude des microparticules sanguines circulantes présente un intérêt croissant notamment dans le domaine de l'hémostase et de l'immunologie. En effet, ces MPs véhiculent de véritables fonctions biologiques et/ou pathologiques et peuvent correspondre à un marqueur de réponse à certains traitements. Il est d'un intérêt majeur de doser, de caractériser et d'évaluer l'impact en santé de ces populations de microparticules sanguines. En associant, pour la première fois, les savoir-faire de deux laboratoires participants (équipe MIMU /dpt MN2S de l'Institut FEMTO-ST et équipe TIT de l'UMR INSERM/EFS/UFC n°1098), ce projet a pour ambition la caractérisation quantitative et fonctionnelle de microparticules de taille submicronique au contact de cellules du sang, en particulier de cellules dendritiques. Cette étude est envisagée selon deux approches complémentaires : 1) la microscopie à force atomique (AFM) pour a) qualifier les MPs, b) étudier leurs mécanismes d'interaction et d'internalisation cellulaire et 2) des tests fonctionnels biochimiques, effectués au sein de l'EFS, pour étudier l'incidence de leur internalisation sur l'activité des cellules.

La demande faite à la région, et relative à cette partie du projet MICROBE sur la caractérisation fine et complète des microparticules, concernait exclusivement de l'équipement, et en particulier un microscope à force atomique (AFM) combiné à un microscope de fluorescence (fluo). Cet appareil, combinant la microscopie optique de fluorescence et la microscopie à force atomique (AFM/fluo), permet de caractériser (par imagerie) et de qualifier (par imagerie et spectroscopie de force) avec une très haute résolution, et en conditions quasi-physiologiques, des systèmes biologiques allant des tissus aux cellules et aux MPs, disposés soit à la surface d'un biomatériau, d'une biopuce mais aussi dans une boîte (multi-puits) de culture cellulaire.

L'enveloppe financière obtenue par la région dans le cadre du présent projet MICROBE a contribué à l'achat, après de sérieuses négociations, et avec la participation de la plateforme DIMACELL dans le cadre de l'appel Région 2014, du système AFM/fluo dans sa configuration de base, début 2015.

Cet investissement renforce non seulement le potentiel en nanobiosciences de l'Institut FEMTO-ST mais également les projets de l'axe transverse BIOM'@X (exemple : Qualification d'ovocytes, de microparticules, ...) dans le domaine de l'analyse des cellules et systèmes biologiques plus complexes.

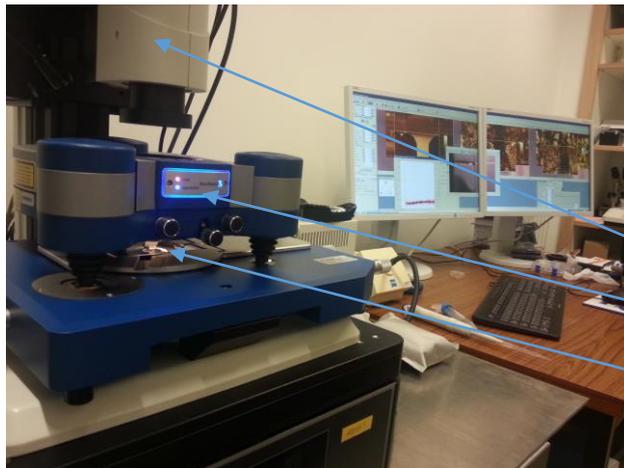


Figure : Photographie du système AFM/fluo acheté dans le cadre du projet MICROBE, installé à l'Institut FEMTO-ST, salle 022 (RDC). AFM de marque JPK (Nanowizard 3 Bioscience) couplé à un microscope Z16 APOA de chez Leica, upgradé en fluorescence, appelé donc MacroFluo.

Macrofluo Z16APOA Leica

Tête de l'AFM JPK Nanowizard 3 (ou se loge la pointe AFM)

Echantillon, sur platine de déplacement JPK

L'investissement n'ayant pu avoir lieu plus tôt, et le système n'étant opérationnel que depuis fin mars, les expériences sont en cours et les résultats en train d'être obtenus, sur la caractérisation métrologique des microparticules d'origine plaquettaire capturées sur puce. D'autre part, notre approche consiste à combiner cette partie « caractérisation fine et nanométrique » à une approche de capture préalable de MPs sur puce et suivi par une approche optique de type Surface Plasmon Surface (SPR). Cette

technique SPR permet, lorsque la puce est biofonctionnalisée par des ligands spécifiques, de capturer dans un fluide un ou des analytes spécifiques (ici les MPs et calibrants) et ainsi de doser ces analytes.

Ici, dans le but de quantifier ces MPs, nous mettons au point des calibrants internes, qui doivent mimer au mieux les MPs : 1) couvrir la gamme de taille et donc représenter les différentes sous-populations de MPs présentes dans l'échantillon biologique, 2) être idéalement aussi « souples » que les MPs, et 3) interagir par le même type d'interaction moléculaire avec la surface de la puce.

Dans ce cadre donc, les travaux sont menés par Sameh Obeid, doctorant en 2^{de} année, coencadré par W. Boireau et C. Elie-Caille (Dpt MN2S, Institut FEMTO-ST) et ont porté sur la mise au point de calibrants internes. Les résultats ont permis de choisir 3 types de particules, couvrant la gamme de taille des MPs présentes dans les échantillons de type MPs plaquettaires ou plasmatiques, et il s'agit des VLP pour Virus Like Particles, et de billes de mélamine résine biofonctionnalisées en surface par une protéine, nommé Lag3. Les VLP sont des particules constituées uniquement de protéines GP1, associées entre elles sous forme de particules de 35nm de diamètre ; nous travaillons d'autre part sur les billes de mélamine résine, d'une taille de 480 nm et de 920 nm , qui sont biochimiquement fonctionnalisées pour présenter en surface une protéine, lag3, reconnue spécifiquement par un anticorps A9H12. Ainsi , ces 3 calibrants réunis couvrent le domaine de taille 35nm à 920 nm, soit le domaine de taille des MPs, et un de ces calibrants mime réellement les MPs puisqu'étant de nature protéique donc plutôt souple.

Les résultats majeurs obtenus sont présentés ci-dessous, et concernent surtout des résultats de SPR et de microscopie de fluorescence.

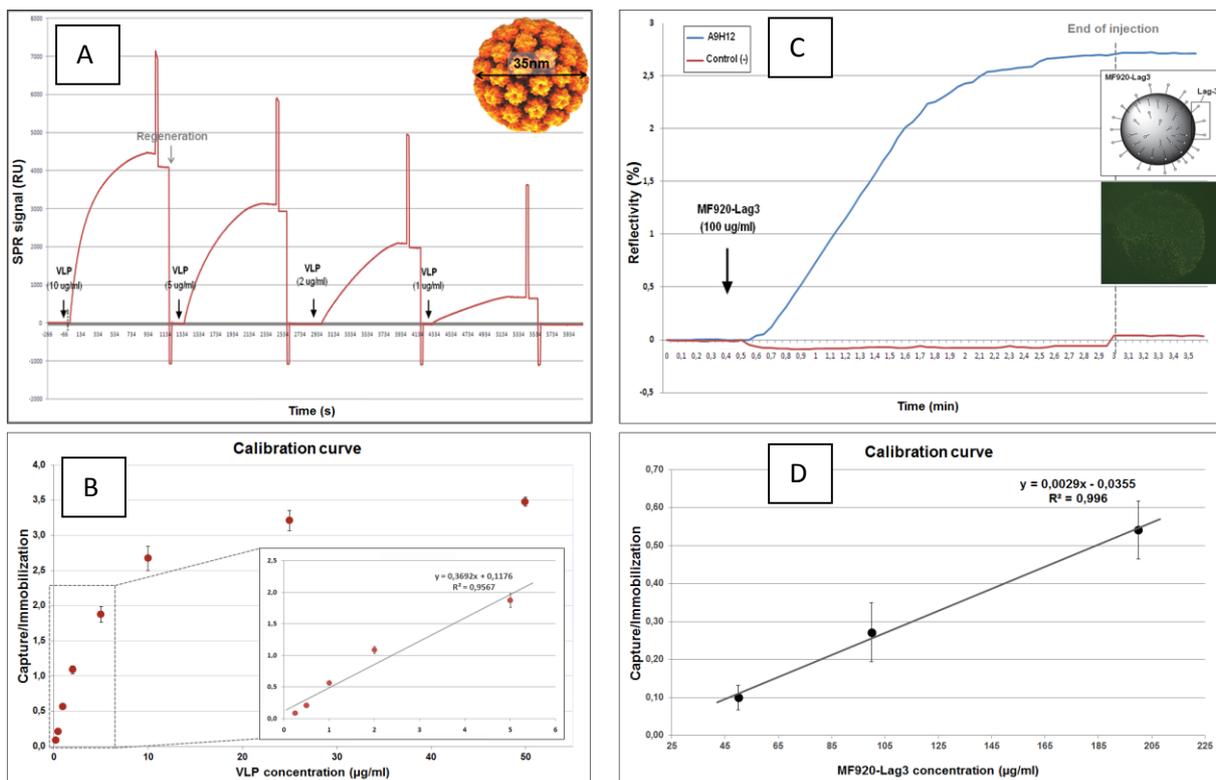


Figure : Capture des calibrants sur puce. VLP injectées à différentes concentrations (courbe rouge) sur puce présentant les anticorps spécifiques (alpha GI4) versus sur puce contrôle (courbe grise) (A) et détermination de la courbe de calibration correspondante (B). Microbilles de 920 nm biofonctionnalisées par du lag3 injectées à 100µg/ml sur puce présentant les anticorps spécifiques (A9H12) (courbe bleue) versus une puce contrôle (courbe rouge) (C) et courbe de calibration correspondante à ces microbilles (D).

Ainsi, les VLP (calibrant de 35nm) présentent une réponse linéaire de capture sur puce dans la zone 0,25 µg/ml à 2 µg/ml et les microbilles de 920 nm dans la zone 20 à 200µg/ml. Les travaux sont en train d'être poursuivis pour déterminer les limites supérieures et inférieures de la courbe de calibration pour ces microbilles. D'autre part ces billes une fois capturées, peuvent être visualisées sous le microscope de fluorescence (microscope qui a été « upgradé » en fluorescence grâce à l'obtention de ce financement MICROBE), afin d'être comptabilisées, et ainsi d'établir une relation/corrélation entre la

quantité de matière déterminée sur puce par la technique de SPR et le nombre de particules dénombrables sur puce (cf image de fluorescence dans l'encart du graph C).

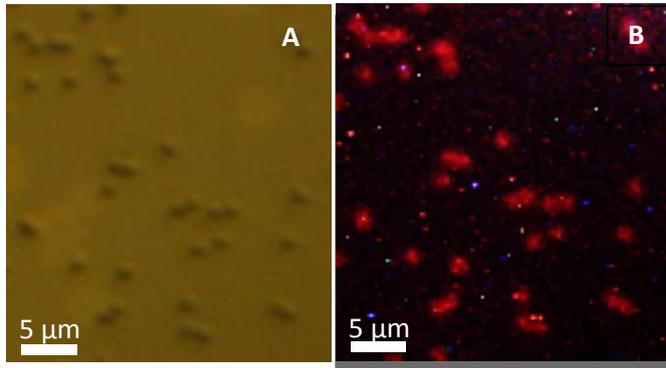


Figure : Billes de 920 nm biofonctionnalisées Lag3 et capturées sur puce A9H12, observées sur une même zone en lumière blanche (A) et en fluorescence (filtre Y5 / exc 620nm) (B) sous le microscope de fluorescence (MacroFluo Leica).

Les travaux sur les calibrants se terminent, un article sur ce point est en cours d'écriture et l'objectif est de soumettre cet article courant de cet été 2015.

La capture de microparticules biologiques se poursuit dans le but d'atteindre leur qualification puis leur quantification. De très bons résultats (cf figure ci-dessous) de capture sur puce de microparticules plaquettaires ont pu être obtenus, et vont s'en suivre très prochainement des caractérisations en taille (par AFM/flu) et en contenu protéique (par spectrométrie de masse) de ces MPs capturées.

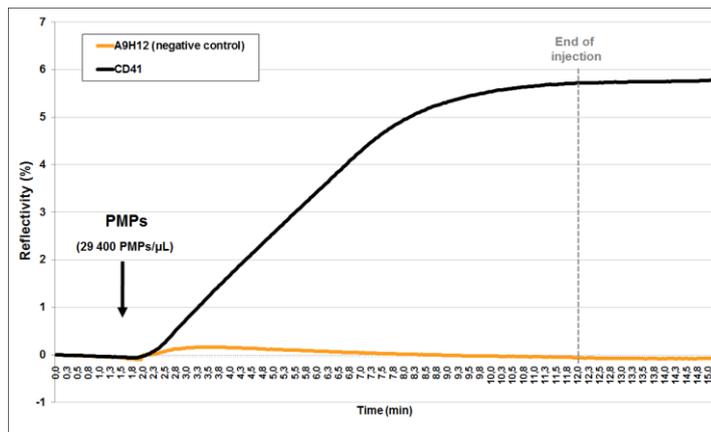


Figure : Capture spécifique de MPs plaquettaires sur puce présentant des anticorps spécifiques antiCD41. Injection de MPs plaquettaires (en noir) sur antiCD41 versus sur puce contrôle (en orange).

Une fois ces MPs qualifiées en taille, par AFM/flu, ces travaux seront très vite valorisés, sous forme d'un second article, pour la fin d'année 2015.