

Laboratoire sur puce pour la détection d'événements cellulaires rares

M. Valette ^{ab}, R. Courson ^{ab}, C. Blatché ^{ab}, A. M. Gué ^{ab}

^aL'AAS-CNRS, University of Toulouse, 7 Avenue du Colonel Roche, BP 54200, 31 031 Toulouse cedex 4, France

^bUniv de Toulouse, L'AAS, F-31400 Toulouse, France

Mots clés: cellules souches adipeuses, ASCs, déformabilité, filtration hydrodynamique, tri immunologique

1. Introduction

L'objectif du projet est de développer un système d'analyse miniaturisé permettant d'isoler spécifiquement des espèces cellulaires présentes en très faible proportion dans les milieux liquides. Les cellules d'intérêt sont les cellules souches adipeuses (ASCs), cellules souches multipotentes qui ont la capacité de se différencier en de nombreuses cellules telles que les chondrocytes, les adipocytes et les ostéoblastes. Ces cellules se trouvent en grande majorité dans le tissu adipeux mais peuvent également être retrouvées dans le sang (elles sont alors dites circulantes). La séparation de ces cellules du milieu sanguin ouvrirait de nombreuses perspectives dans le diagnostic précoce du diabète de type II ou en médecine régénérative.

2. Approche retenue pour un LOC de séparation des ASCs en milieu sanguin

La taille des cellules cibles est un critère essentiel pour le choix des techniques de tri à employer. Des caractérisations effectuées par FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) calibré avec des billes de diamètres 5, 10, 15 et 20 μ m (figure 1) montrent que les ASCs ont un diamètre supérieur à 10 μ m, avec une grande variété de tailles et ne se distinguent donc pas des leucocytes hors lymphocytes.

Par ailleurs les antigènes CD45 et CD31 exprimés par les leucocytes sont discriminants puisqu'ils ne sont pas exprimés par les ASCs.

Compte-tenu de ces caractéristiques, nous avons donc décidé de développer un dispositif comportant 2 étapes de tri complémentaires et successives. La première étape consiste à éliminer les éléments dont le diamètre est inférieur ou égal à 10 μ m, dont en particulier les globules rouges. Pour ce faire, nous utilisons un principe de filtration hydrodynamique.

La seconde étape aura pour but d'éliminer toutes les cellules hématopoïétiques par exclusion des cellules exprimant l'antigène CD45 et/ou CD31. Cette étape sera réalisée en utilisant une technique de type « cell rolling ».

3. Premiers résultats

Une première génération de puces de séparation hydrodynamique a été réalisée. Elle montre bien la séparation des particules autour du rayon critique choisi mais avec une efficacité insuffisante. La caractérisation des écoulements à l'aide de particules fluorescentes submicrométriques montre des effets de recirculation pénalisants à l'intersection des canalisations de filtration. Une étude par simulation numérique a permis de modifier le design des puces afin d'éliminer ces effets. Les dispositifs sont en cours de test.

La première étape pour la mise en œuvre du principe de séparation par « cell rolling » est la mise au point d'une technologie de greffage localisée d'anticorps CD45. La méthode retenue utilise le dépôt d'une première couche de SAMs (11-mercaptopundecanoïque (MUA) et 6-mercaptophexanol (MH)) sur laquelle les anticorps sont greffés. Ces travaux sont en cours.

Indépendamment, nous avons choisi d'évaluer les propriétés de déformabilités des ASCs afin de savoir si ce critère était discriminant et pouvait être utilisé pour la séparation des ASCs. Un dispositif microfluidique a été développé permettant de piéger une cellule (unique) dans un réservoir et d'appliquer différentes pressions afin d'en déterminer le module d'Young et/ou la tension corticale. Le dispositif a été testé sur des cellules souches adipeuses mises en culture. Les expériences mettent en évidence la déformation marquée des cellules. Les résultats sont en cours d'exploitation.