



HAL
open science

Microfluidique pour la mesure de bio-molécules secrétées

Adrien Saint-Sardos

► **To cite this version:**

Adrien Saint-Sardos. Microfluidique pour la mesure de bio-molécules secrétées. Mécanique des fluides [physics.class-ph]. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT: 2019SACLX094 . tel-03041540

HAL Id: tel-03041540

<https://theses.hal.science/tel-03041540>

Submitted on 5 Dec 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Microfluidique pour la mesure de biomolécules sécrétées

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à L'École Polytechnique

École doctorale n°573 Interfaces – Approches interdisciplinaires :
Fondements, applications et innovations
Spécialité de doctorat : Physique

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 4 Décembre 2019, par

Adrien Saint-Sardos

Composition du Jury :

Clément Nizak Professeur, ESPCI Paris (Laboratory of Biochemistry -Biology-Innovation)	Rapporteur
Jean-Christophe Baret Professeur, CNRS, Univ. Bordeaux, CRPP, (JCBLab)	Rapporteur
Séverine Le Gac Professeur, Univ. de Twente (Applied Microfluidics for BioEngineering Research)	Examineur
Yves Fouillet Ingénieur-Chercheur, CEA, Leti, (Département Technologies pour la Biologie et la Santé)	Examineur
Myriam Taverna Professeur, Univ. Paris-Sud (Institut Galien Paris-Sud)	Présidente du Jury
Gabriel Amselem Professeur, Ecole Polytechnique, (Département de Mécanique, Ladhyx)	Directeur de thèse
Charles Baroud Professeur, Ecole Polytechnique, (Département de Mécanique, Ladhyx)	Directeur de thèse

UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY

THÈSE DE DOCTORAT

Microfluidique pour la mesure de
biomolécules sécrétées

Auteur:
Adrien SAINT-SARDOS

Superviseur:
Dr. Charles BAROUD

*Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Ecole Doctorale No. 573 Interfaces
Spécialité Physique et Biotechnologies
préparée dans le laboratoire*

Physical Microfluidics and Bioengineering
Ecole Polytechnique

4 Décembre 2019

“Je revendique le droit à l’ignorance.”

Roland Barthes

Remerciements

J'adresse ici mes remerciements à mon directeur Charles Baroud, pour m'avoir engagé, et pour avoir parcouru avec moi les chemins parfois obscurs de la biochimie. Charles sait toujours regarder une expérience avec un œil clairvoyant, faussement naïf, parfois sans concession mais toujours juste. Sa présence communique un élan et un optimisme indispensables au cheminement d'un jeune chercheur, et je souhaite, à lui et à son équipe, tous les succès possibles. Mes pensées vont ensuite à Gabriel Amselem, oncle universel des thésards de l'équipe, qui ne compte ni son temps ni son énergie pour venir à bout d'une question scientifique, et irradie de sérénité ceux qu'il guide. Gardien du savoir biologique de l'équipe, Sébastien Sart est son pendant pasteurien, et je le remercie infiniment de m'avoir communiqué son enthousiasme pour les cellules souches et les voies de signalisation cellulaires. Je ne terminerai ce premier paragraphe qu'après avoir exprimé ma profonde gratitude pour Caroline Frot : son professionnalisme, sa bienveillance, son soutien sans faille, elle est un atout scientifique et humain inestimable pour notre laboratoire.

Ensemble, tout devient possible, disait un candidat aux élections présidentielles. La vérité, c'est plutôt que tout seul, on arrive à rien. J'adresse donc ici ma sincère reconnaissance à mes partenaires et soutiens scientifiques de ces trois dernières années, à commencer par Elodie Brient-Litzler, marraine officieuse du 'projet microbilles'. Merci également à Serge Amselem et à ses équipiers pour leur intérêt au projet, à Pierre Lafaye pour son accueil de l'été 2017, à Hubert Becker pour ses conseils en matière de protéines. Mes amitiés à mon complice Kévin Lippera, qui m'a ramené avec patience dans le monde des équations, de même qu'à son co-thésard Akil Vaarma. Une pensée pour Tharshana Stefen, qui a pris de son temps pour nous introduire aux problématiques de cytométrie, et à qui je souhaite le meilleur pour sa thèse à venir.

Je n'oublie pas les bons moments passés avec mes camarades de l'équipe PuB et du Laboratoire Ladhyx. Mon arrivée aux côtés des thésards chevronnés Raphaël et Cyprien, qui ont placé la barre très haut, mais tendent toujours une main secourable à ceux qui leur succèdent. Mes débuts, sur les hauteurs de Palaiseau, au côté des physiciens du Ladhyx - trop nombreux pour que je les nomme tous, mais que je porte dans mon cœur. Notre déménagement à l'Institut Pasteur, mené avec calme et bonne humeur aux côtés d'Aude et d'Antoine. L'arrivée de la nouvelle vague, de Gustave, de Christelle, de Salomé, avec lesquels j'ai passé des moments stimulants à parler de science, de jardinage, de géopolitique, de sombres backgrounds, et d'avenir lumineux.

Je tiens enfin à exprimer toute mon affection à mes soutiens de cœur, qui sont au combien importants pour tenir la distance et vivre sa thèse en Homme heureux. À mes parents, à ma tante, et à mes grands-mères, je dis merci pour leurs nombreuses formes de soutien, affectif, logistique, financier, qu'ils m'ont apporté pendant ces longues études. Merci aux femmes de ma vie parisienne, à Kenza pour son amour et sa constante bonne humeur, à Tiphaine ma fée du logis, à Ambre et à Laurène mes amies pour longtemps. Je salue aussi mon parrain Mathias et sa femme Sara, les Mélodies de mes choristes Manon, Ludo et Thomas, et tous les amis que je ne pourrai pas citer faute de papier.

Enfin à vous, qui ouvrez ce manuscrit, je souhaite bonne lecture.

Sommaire

Remerciements	iii
Liste des Figures	xiii
Liste des Tableaux	xiii
Liste des Acronymes	xv
1 Dosage d'une biomolécule en microfluidique	3
1.1 Contexte biologique : Cytokines et Chimiokines sécrétées	3
1.1.1 Langage de communication intercellulaire	3
1.1.2 Interleukine 1-Bêta, une cytokine pro-inflammatoire	4
1.1.3 Chimiokine VEGF : molécule signal de l'angiogénèse	6
1.2 Mesurer des Cytokines en microfluidique	7
1.2.1 Nanopuits et mesures d'épifluorescence	7
1.2.2 Gels fonctionnalisés et mesure d'un volume fluorescent	11
1.2.3 Billes fonctionnalisées et méthodes de détection	12
1.2.4 Emulsion simple pour la mesure de sécrétions cellulaires	15
1.3 Créer, manipuler et piéger des microgouttes d'eau	17
1.3.1 Microfluidique de gouttes, fondations	18
1.3.2 Guider des gouttes	20
1.3.3 Immobiliser des gouttes	21
1.4 Une plateforme microfluidique pour la culture de sphéroïdes	27
1.4.1 Géométrie et fluidique de la puce Double-pièges	27
1.4.2 Gouttes de gels	29
1.4.3 Provoquer la fusion de deux gouttes	30
2 Détection et quantification de cytokine humaine	35
2.1 Fonctionnalisation de billes micrométriques	35
2.1.1 Greffage d'anticorps	35
2.1.2 Tester la fonctionnalisation	37
2.2 Test ELISA dans des puces microfluidiques	39
2.2.1 Suivi d'une réaction enzymatique	39
Activité enzymatique dans une goutte	39
Approche de la cinétique chimique Mickaelienne	43
2.2.2 Mesure d'IL-1 β on-chip	45
Premières Mesures	45
2.2.3 Discussion : Limitations de l'ELISA on-chip	47
2.3 Mesure de fluorescence ponctuelle pour doser IL-1 β	48
2.3.1 Relocalisation de la fluorescence	48
Expérience et microscopie	48
Détection des billes sans Cytomètre de Flux	50
Résultats et Discussion	51

2.3.2	Niveaux de détection : faites appel à des professionnels	53
	Observation en microscopie	53
	Confirmation en cytométrie	54
	Bilan partiel	55
2.3.3	Calibration sur des billes du commerce	56
2.3.4	Cinétique du test et modèles de diffusion	59
	Etude expérimentale	59
	Modèle de Diffusion 1D	60
2.4	Conclusions et choix de la cible biologique	62
3	Mesurer les sécrétions de sphéroïdes uniques	65
3.1	Former un sphéroïde de MSC	65
3.1.1	Du cordon à la goutte : voyage d'une MSC	65
	Cellules Souches Mésoenchymateuses	65
	Sécrétions de MSC	66
	Sphéroïdes de MSC	67
3.1.2	Dynamique de compaction : de l'agrégat au sphéroïde	69
3.1.3	Viabilité dans notre puce microfluidique	74
3.2	Mesurer ses sécrétions	77
3.2.1	Mesures d'IL-1 β : Premières mesures de sécrétions	77
3.2.2	Mesures de VEGF : Calibrations	79
3.2.3	Mesures de VEGF : Mesures à différents temps	79
3.2.4	Impact d'un médicament sur les niveaux de sécrétion	84
3.2.5	Niveaux d'expression intracellulaires	86
3.2.6	Impact de la taille du sphéroïde sur sa sécrétion	90
3.3	Modèle de sphéroïde sécrétant dans une goutte	92
3.3.1	Profil de concentration : effet du confinement	92
3.3.2	Capture de VEGF sur la bille	97
3.3.3	Pistes d'amélioration du modèle	100
	Une dynamique de sécrétion qui évolue dans le temps	100
	Une cytokine qui se dégrade en solution	102
	Traduire un effet autocrine	102
4	Quantifier l'hétérogénéité dans une population de sphéroïdes	105
4.1	Hétérogénéités inter-sphéroïdes	105
4.1.1	Hétérogénéité dans les sécrétions	105
4.1.2	Hétérogénéité des signaux intracellulaires	107
4.2	Hétérogénéités intra-sphéroïdes	108
4.2.1	Analyse des cellules dans un sphéroïde	108
4.2.2	Confirmation en cytométrie	110
4.3	Discussion et modèles	111
4.3.1	Loto cellulaire	111
4.3.2	Mot de conclusion sur l'hétérogénéité sur puce	114
A	Une plateforme microfluidique frugale	121
B	Plateforme microfluidique à taille réduite	125
B.1	Fabrication de la puce	125
B.2	Formation de nos gouttes	126
B.3	Manipuler des gouttes	127
B.4	Immobiliser les gouttes	131

C Quelques codes utiles	133
C.1 Code Matlab pour la détection de billes barcodées	133
C.2 Code pour lire la fluorescence d'une goutte entière	137
C.3 Code Matlab pour la lecture des caractéristiques d'un sphéroïde	142
D Phénomènes d'agrégation cellulaire	145
D.1 Introduction	145
D.2 Protocole	145
D.3 Resultats	145
D.3.1 Condition Statique	145
D.3.2 Cas dynamiques	146
D.4 Discussion et Perspectives	148
Bibliographie	151

Liste des Figures

1.1	Les cytokines, langage universel de communication cellulaire.	4
1.2	Interleukine IL-1 β , principale cytokine de l'inflammation.	5
1.3	VEGF, la chimiokine de la vascularisation	6
1.4	Nanopuits pour la quantification des sécrétions d'une cellule unique	8
1.5	Nanowells pour la mesure de l'hétérogénéité.	9
1.6	Nanowells et immuno-hybridation pour la mesure multiplexée de cytokines.	10
1.7	Gel Micro Droplets pour la mesure de sécrétion.	11
1.8	Les GMD revisités par la Microfluidique.	13
1.9	Histoires de billes.	14
1.10	Un système pour mesurer les sécrétion de cellules individuelles.	16
1.11	Etalonnage et spécificité de la mesure de sécrétion en gouttes.	17
1.12	Un tensioactif	18
1.13	Les tensioactifs, gage de stabilité des émulsions contre la coalescence.	19
1.14	Gradient de confinement pour un déplacement spontané des gouttes.	20
1.15	Gradient de confinement pour la chimie en microgouttes.	21
1.16	Piégeages actifs par des ondes acoustiques.	22
1.17	Piégeage passif de gouttes microfluidiques.	22
1.18	Piégeage efficace par un puits capillaire.	24
1.19	Design de la puce microfluidique pour cultiver des sphéroïdes.	27
1.20	Des gouttes visibles à l'oeil nu.	28
1.21	Formation de la goutte et serpent microfluidique.	29
1.22	Bousculade de l'entrée de chambre.	30
1.23	Double piège.	30
1.24	Electrofusion de gouttes microfluidiques.	32
1.25	Courbure spontanée de l'interface.	33
2.1	Cherchez l'Anticorps.	37
2.2	Détecter la présence de protéine à la surface de billes fonctionnalisées.	37
2.3	Orientations d'anticorps.	39
2.4	Des "ELISA sur billes" pour vérifier leur fonctionnalisation.	40
2.5	Complexe immunitaire sur bille avec amplification enzymatique.	41
2.6	Suivre la coloration de l'ELISA sur puce.	42
2.7	Quantifier la coloration de l'ELISA sur puce.	44
2.8	Indépendance à la quantité de substrat apportée.	45
2.9	Micropuits ELISA avec suspension de billes fonctionnalisées.	46
2.10	Relocaliser un signal fluorescent, expérience modèle.	49
2.11	Schéma de l'attachement de la biotine sur les billes.	50
2.12	D'une image illisible à l'extraction d'une mesure physique.	50
2.13	Suivi de la relocalisation de fluorescence dans le temps.	52
2.14	Distribution des pixels fluorescents de l'image.	52
2.15	Calibration après relocalisation.	53
2.16	Complexe immunitaire complet avec reporter fluorescent.	53

2.17	Première détection de l'IL-1 β sur de billes micrométriques, en puce. . .	54
2.18	Billes modèles, fonctionnalisées par anticorps fluorescent.	55
2.19	Une détection difficile, même en CMF.	56
2.20	Optimiser la distribution de bille dans les gouttes.	57
2.21	Calibration on-chip sur des billes commerciales.	58
2.22	Suivi de la formation du complexe immunitaire sur une des billes micrométriques.	59
2.23	Croissances normalisées de la fluorescence pour plusieurs concentrations de cytokine.	60
2.24	Résolution numérique du problème de diffusion 1D.	61
3.1	Le processus mésengénique.	66
3.2	La cellule-pharmacie.	67
3.3	Vascularisation de tissus cardiaques induite par la présence de MSC. . .	68
3.4	Approches théoriques et expérimentales de l'hypoxie dans les sphéroïdes.	70
3.5	Hanging Drops, culture de sphéroïde à une échelle mésoscopique.	71
3.6	Organisation dynamique des MSC en sphéroïde.	72
3.7	Distribution de taille des sphéroïdes.	73
3.8	Une population de cellules primaires hétérogène en taille.	74
3.9	Contrôle de la taille du sphéroïde par la concentration en cellules.	74
3.10	Un tableau de sphéroïdes de MSC.	75
3.11	Viabilité des sphéroïdes de MSC dans des gouttes fermées.	76
3.12	Première mesure de cytokine sécrétée à côté d'un sphéroïde de MSC.	77
3.13	Distribution de fluorescence des billes.	78
3.14	Calibration de l'expérience microfluidique pour la quantification de VEGF.	80
3.15	Distribution intra-puce de niveaux de sécrétion.	81
3.16	Des mesures sur des puces entières contenant un tableau de sphéroïdes.	82
3.17	Mesures de sécrétion sur de multiples sphéroïdes individuels.	82
3.18	Mesures de sécrétion sur de multiples sphéroïdes individuels, bis.	83
3.19	Distributions de niveaux de sécrétion selon le temps d'incubation.	84
3.20	Comparaison des sécrétions de sphéroïdes uniques, effet de l'indométacine.	85
3.21	ELISA classique VS bead-ELISA sur puce.	85
3.22	Relier indométacine et downregulation de VEGF.	87
3.23	Indométacine : un effet sur la compaction ?	87
3.24	Une mesure du VEGF intracellulaire dans les sphéroïdes.	88
3.25	L'effet de l'indométacine s'étend au VEGF intracellulaire.	89
3.26	L'effet de l'indométacine s'étend au VEGF intracellulaire à temps d'incubation longs.	90
3.27	Corrélation intra-extra.	91
3.28	La taille du sphéroïde n'influe pas directement sur sa sécrétion.	92
3.29	La production de VEGF est la responsabilité de quelques cellules en périphérie du sphéroïde.	93
3.30	Modèle sécrétion-diffusion-capture pour notre système.	94
3.31	Profil de concentration en VEGF dans la goutte, effet du confinement.	95
3.32	Convergence vers le profil pseudo-stationnaire.	96
3.33	Evolution de la concentration de VEGF sur la bille, effet du confinement.	97
3.34	Temps caractéristique du test Luminex en goutte.	99
3.35	Un temps de préincubation diminue artificiellement le temps de réponse du test en goutte.	99
3.36	Distincts niveaux de fluorescences sur la bille pour des temps d'incubation différents.	100

3.37	Sécrétion changeante du sphéroïde dans le temps.	101
3.38	Effet du temps de vie de VEGF en solution.	102
3.39	Rétroaction négative de la concentration locale sur la sécrétion du sphéroïde.	103
4.1	Caractère universellement non gaussien des distributions de sécrétome.	106
4.2	Production intracellulaire de VEGF.	107
4.3	Validation avec réplicat biologique.	109
4.4	Découpage Voronoï du sphéroïde à partir de son marquage nucléaire.	110
4.5	Distribution des intensités ICC reliées au VEGF dans les cellules qui composent notre population de sphéroïdes.	110
4.6	Cytométrie de flux pour constater une hétérogénéité de l'expression de VEGF entre les cellules.	111
4.7	Plus de cellules considérées, moins d'hétérogénéité à l'échelle du sphéroïde.	112
4.8	Asymétrie évanescence.	113
4.9	Le nombre de cellules imagées est une variable aléatoire.	114
4.10	Vers des mesures multiplexées sur nos sphéroïdes.	118
A.1	Une boîte thermostatée pour la microfluidique.	121
A.2	Elements constitutifs de la boîte à chargement.	122
A.3	Gestion simultanée de la température et des débits fluidiques.	123
A.4	Spoutnik et un doctorant.	123
A.5	Spoutnik et un post-doctorant.	123
B.1	Design de la puce.	125
B.2	Miniaturisation.	126
B.3	Step Emulsification.	128
B.4	La monodispersité, deuxième garantie de stabilité pour les émulsions.	129
B.5	Guider des gouttes microfluidiques.	130
B.6	Piège 1.	131
B.7	Piège 2.	132
D.1	Analyse d'image et isolation dynamique des agrégats cellulaires.	146
D.2	Agrégation efficace en conditions statiques.	146
D.3	Experiences d'agrégation sous écoulement visqueux.	147
D.4	Agrégation en conditions dynamiques.	148
D.5	Temps caractéristique de l'agrégation de cellules.	148
D.6	Schéma d'une goutte d'eau soumise à un écoulement d'huile.	149
D.7	Effet de la concentration d'ensemencement sur la formation d'agrégats de MSC.	149

Liste des Tableaux

1.1	Quelques études typiques de secrétomes en microfluidique.	17
1.2	Piéger des gouttes en grand nombre, un état de l'art.	26
2.1	Passer des plaques 96 puits à un test microfluidique.	57
3.1	Sécrétions d'IL-1 β , comparaison avec la littérature.	79
3.2	Adapter un test de quantification de VEGF.	81
3.3	Raccourcir par le confinement les temps de capture de VEGF par la bille.	98

Liste des Acronymes

VEGF	V ascular E dothelial G rowth F actor
MSC	M esenchymal S tem C ell
IL-1B	I nterleukine 1B éta
HRP	H orse R addish P eroxydase
PBMC	P eripheral B lood M ononuclear C ell.
GMD	G el M icro D roplet
STD	S tandard D eviation of a distribution
CV	C oefficient of V ariation.
PFO	1H,1H,2H,2H-Perfluoro-1-octanol
PBS	P hosphate B uffer S aline, solution tampon.
RAN	Surfactant copolymère qui stabilise nos gouttes microfluidiques
CMF	Cytométrie de flux.
FC-40, HFE	Deux huiles fluorées.
PCR	P olymerase C hain R eaction.
PDMS	Polydiméthylsiloxane, polymère siliconé.
ELISA	E nzyme- L inked I mmuno S orbent A ssay.
FRET	F örster R esonance E nergy T ransfer.
NHS	N-hydroxysuccinimide. Composé organique de formule $C_4H_5NO_3$.

à mes grands-mères.

Introduction

Les inquiétudes du grand public sont focalisées sur les cellules tumorales, pour leur capacité à se répliquer à grande vitesse et à coloniser les différents tissus par des métastases. Pourtant, les cellules somatiques, non cancéreuses, peuvent en elles-mêmes présenter de graves dysfonctionnements, en particulier dans leur phénotype de sécrétion, et engendrer de pénibles maladies. Ainsi, dans les pays occidentaux, on s'inquiète de l'épidémie de diabète à venir, qui tient à une sécrétion insuffisante de l'hormone insuline [1]. De la montée des maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques [2], qui tiennent à une sur-expression des molécules de signalisation de la défense immunitaire [3]. De l'obésité [4, 5], pour laquelle on soupçonne un déficit de sécrétion des neurotransmetteurs associés à la satiété [6] et une sur-expression de facteurs d'inflammation [7].

Dans les recherches sur ces maladies du secrétome, deux grandes pistes ont été suivies : d'un côté on propose d'utiliser des modèles animaux, qui sont censés représenter au mieux la complexité de l'organisme humain, de ses organes, de ses tissus, et du cocktail de molécules qu'il contient. Les résultats sur de tels modèles sont ensuite difficiles à transposer d'une espèce à l'autre, du fait de la trop grande spécificité de chaque espèce : il n'y a qu'à noter que 50% des tests de médicaments en phase préclinique ne passent pas la phase 3 des essais humains [8, 9].

De l'autre côté, on peut choisir de considérer uniquement les populations de cellules impliquées dans le dysfonctionnement. Ces populations sont cultivées sous forme de monocouches de plusieurs millions de cellules, dans des conditions très éloignées de l'*in vivo*, et il est relativement aisé d'y analyser des voies de signalisation et des valeurs moyennées de sécrétion [10]. Parmi les expériences de routine effectués sur ces populations, on peut citer le test sandwich-ELISA*, décrit pour la première fois dans les années 70, qui permet de quantifier la présence de molécules sécrétées dans des surnageants de culture ou des échantillons liquides issus de l'*in vivo* [11].

Mais une population de cellules, mêmes issue de lignées, présente des hétérogénéités de génome, de transcriptome, de secrétome, qu'aucune mesure "grossière" sur population entière ne peut révéler [12, 13]. L'intérêt de la communauté scientifique, ces dix dernières années, s'est donc porté sur l'analyse de grands nombres de petits échantillons, en vue d'isoler des comportements individuels au sein d'un ensemble macroscopiquement homogène de cellules [14].

Tout le jeu de la première partie de ce manuscrit sera ainsi de montrer comment cette curiosité pour les petits échantillons a été attisée et assouvie par les avancées de la microfluidique, science des écoulements sub-millimétriques, qui permet l'isolation et la parallélisation des expériences de biochimie sous forme de micro-réacteurs indépendants. On insistera en particulier sur la pertinence de la microfluidique dans la mesure quantitative des concentrations de cytokines – des facteurs sécrétés à très faibles concentrations jouant un rôle prépondérant dans la défense de l'organisme et la communication cellule-cellule.

Par la suite, nous mettons en place nos propres méthodes de quantification des

cytokines dans une puce microfluidique d'échelle intermédiaire, qui permet la culture compartimentée de plusieurs centaines de cellules [15]. Derrière la problématique technique, nous serons amenés à parler de problèmes plus fondamentaux, allant de l'orientation des anticorps adsorbés sur une surface, à la diffusion confinée des molécules dans une goutte de taille non négligeable.

Pour valider ces méthodes, nous cultivons ensuite, en microfluidique, des cellules souches mésenchymateuses (MSC) sous forme de structure tri-dimensionnelles, dont mesurons alors, toujours en microfluidique, les sécrétions de cytokines. On s'intéresse en particulier à l'IL-1 β , cytokine fondamentale de l'inflammation, et à VEGF, molécule-signal de la vascularisation des tissus. Au delà des mesures de sécrétomes, la morphologie du sphéroïde, et ses productions intra-cellulaires nous intéressent, et peuvent compléter nos interprétations biologiques.

Dans le dernier chapitre de ce manuscrit, nous utilisons des données obtenues sur des populations de sphéroïdes, et donnons quelques pistes pour en tirer des informations sur la population des cellules qui les composent, en soulignant l'extrême hétérogénéité de ces populations dans leurs productions de biomolécules.

Chapitre 1

Dosage d'une biomolécule en microfluidique

Gnothi seauton

Proverbe Grec

Dans ce chapitre, on cherche à détecter et à quantifier la présence d'une molécule biologique dans une goutte microfluidique. Après quelques éléments de contexte biologiques sur les cytokines et les chimiokines, on s'intéresse aux différentes stratégies, en particulier aux stratégies microfluidiques, mises en place pour mesurer des taux de cytokines dans de petits volumes de surnageants de culture et de liquides biologiques. On s'attache ensuite à présenter les différents éléments de notre propre plateforme de culture cellulaire 3D, que l'on utilisera ensuite dans les deux chapitres suivants, avec ou sans cellules.

1.1 Contexte biologique : Cytokines et Chimiokines sécrétées

1.1.1 Langage de communication intercellulaire

A la fin des années 60, on commence à soupçonner l'existence de facteurs hydrosolubles avec lesquels les différents globules blancs communiquent lors d'une lésion [16]. Ces facteurs, encore non identifiés, sont appelés Lymphokines, du grec *lympho* l'eau, et *kiné* le signe. Au début des années 70, des études remettent en question la production exclusive de ces facteurs par des cellules périphériques [17]. Dès 1974, Cohen et al. terminent ainsi leur revue en remarquant que des cellules "non lymphatiques" pouvaient générer des lymphokines, et que ces dernières, loin de se limiter à une communication spécifique entre lymphocytes B et T, jouaient un rôle beaucoup plus général dans la défense de l'organisme : ils proposent alors pour ces molécules de communication inter-cellulaire le nom plus générique de cytokines [18]. Petit à petit, les cytokines sont isolées et classées en familles et sous-familles. En 2018, une étude de Big Data dénombrait 140 cytokines, dont la production par 340 types cellulaires était cause de dysfonctionnement dans l'organisme [19].

Ces cytokines ont surtout une action cruciale dans la réponse immunitaire de l'organisme, pouvant induire l'activation et la différenciation de cellules lors d'une agression [20, 21], mais aussi favoriser la croissance, la réparation ou la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans des tissus pré-existants [22, 23, 24]. Leur message peut être transmis sur de longues distances par les flux de l'organisme, et leur effet est alors systémique. Cela étant, il est montré que l'action des cytokines est aussi locale, sur les cellules voisines (action paracrine) mais aussi sur la cellule sécrétante (action autocrine) [25, 26].

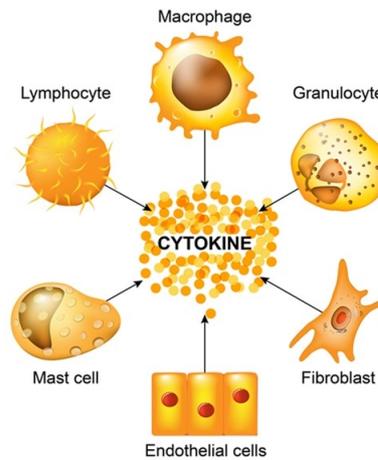


FIGURE 1.1: **Les cytokines, langage universel de communication cellulaire.** www.news-medical.net/health/What-are-Cytokines

Les cytokines sont des molécules de petite taille, typiquement quelques dizaines de kDa. À l'instar des hormones et des neurotransmetteurs, elles jouent un rôle prépondérant dans la communication des cellules entre elles, mais se démarquent par leur universalité : de nombreux types cellulaires très différents secrètent en effet les mêmes cytokines, à des concentrations variables (Figure 1.1).

Autre différence majeure, la concentration des cytokines dans les milieux physiologiques est plutôt de l'ordre de la femtomole par litre, avec des variations de plusieurs décades en cas d'inflammation, quand celle des hormones se cantonne à de petites variations autour de la nanomole par litre. Ces faibles concentrations ont retardé la découverte des cytokines, et font de leur quantification un réel défi scientifique et technologique (voir Section 1.2).

Ce sont en particulier les interleukines (IL), les facteurs de nécrose (TNF), et les interférons (IFN) qui sont porteurs de l'information immunitaire. Les cytokines de ces trois familles sont donc parmi les plus étudiées, en particulier dans la réaction de l'organisme à des agents pathogènes ou des cellules cancéreuses. Dans les deux sections qui vont suivre, nous allons entrer dans le détail de deux cytokines qui nous ont intéressé pendant cette thèse.

1.1.2 Interleukine 1-Bêta, une cytokine pro-inflammatoire

La cytokine interleukine-1 Beta notée $IL-1\beta$ (Figure 1.2A) est une protéine sécrétée par de multiples cellules de l'organisme, en particulier par les cellules immunitaires type monocytes ou macrophages, mais aussi par des cellules mésenchymateuses comme on le verra au chapitre 3. Elle tient un rôle crucial dans la défense de l'organisme contre les blessures et les infections, ayant une action inflammatoire, pyrétique, et agissant lors de la différenciation et l'activation de certains types cellulaires [21, 28].

À la différence des sécrétions classiques qui passent par le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, et l'exocytose de vacuoles, le mécanisme de sécrétion de l' $IL-1\beta$ est lié à la formation d'un complexe moléculaire NLRP3 appelé inflammasome. Ce complexe, montré sur la Figure 1.2B, s'active en présence de stimuli extérieurs, et participe à la fabrication de l'enzyme intracellulaire Caspase-1. Cette Caspase-1 vient

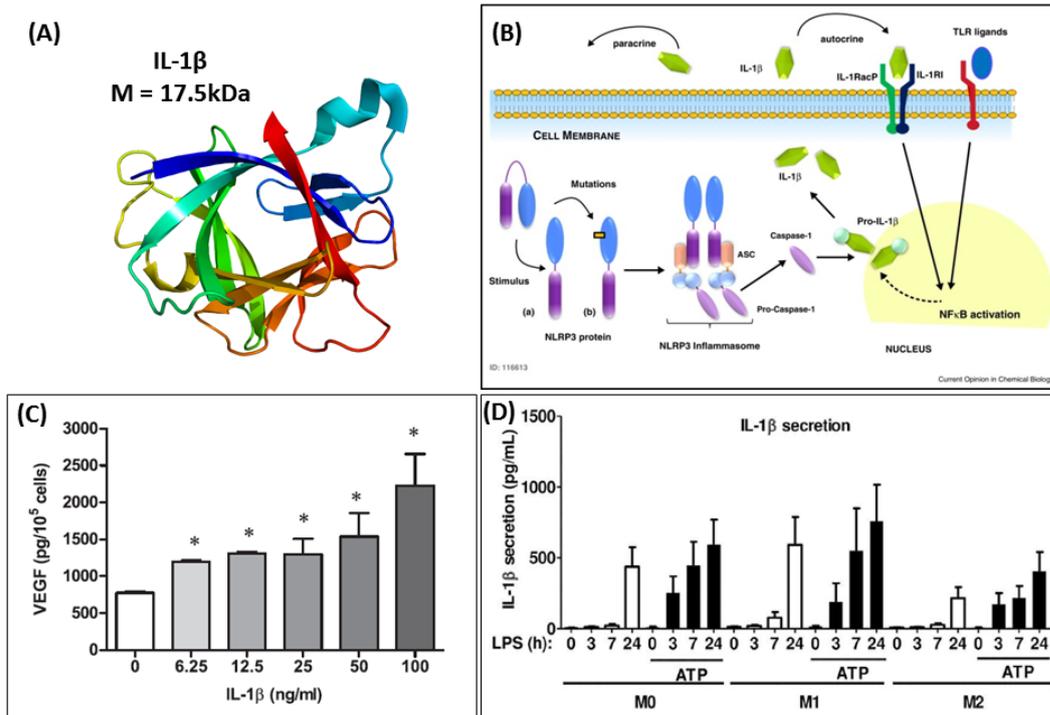


FIGURE 1.2: **Interleukine IL-1 β , principale cytokine de l'inflammation.** (A) Structure quaternaire de la protéine IL-1 β par Wikipedia. (B) Mécanisme d'activation et de sécrétion de l'IL-1 β par le complexe inflammasome via les caspases : un stimulus extérieur vient activer la protéine NLRP3, qui recrute le complexe inflammasome. L'inflammasome fait mûrir l'enzyme Caspase-1 qui à son tour vient terminer la production d'IL-1 β . La cytokine une fois sécrétée peut diffuser en vue d'une action systémique, ou directement activer des récepteur de la cellule sécrétrice pour une action autocrine. Adapté de [27]. (C) Dosage ELISA de la sécrétion de VEGF par des cellules souches mésenchymateuses de souris cultivées en 2D et traitées avec des quantités croissantes d'IL-1 β . Adapté de [23] : la production de VEGF est up-régulée par la présence d'IL-1 β . (D) Niveaux de sécrétion d'IL-1 β par différents macrophages activés par LPS (inducteur d'inflammation), avec ou sans ATP (activateur de l'inflammasome), de l'ordre de la centaine de pg/mL, mesurés dans 100 μ L de surnageant de culture par un immuno-essai. Adapté de [28].

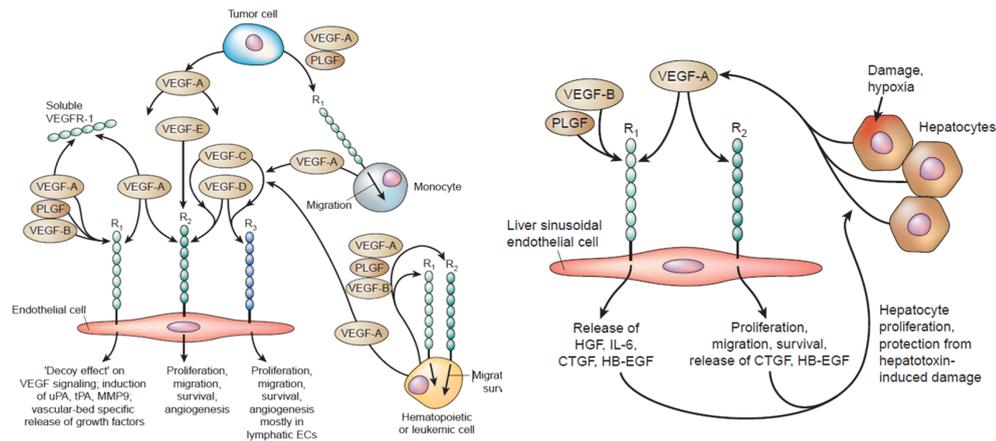


FIGURE 1.3: **VEGF, la chimiokine de la vascularisation** (A) Les différentes protéines de la famille VEGF interagissent avec les récepteurs spécifiques pour faire migrer les monocytes, cellules hématopoïétiques et cellules endothéliales. (B) Les cellules hépatiques en état d'hypoxie recrutent des cellules endothéliales pour former des capillaires sinusoides. Adapté de [33]

ensuite traduire en $IL-1\beta$ sécrétable les précurseurs générés lors d'une inflammation par le facteur de transcription $NF\kappa B$ [29, 30].

On l'a dit, $IL-1\beta$ joue un rôle-clé dans les réactions de défense de l'organisme. On associe d'ailleurs plusieurs disfonctionnements graves du système immunitaire avec une surproduction de cette cytokine [30, 31]. Sa sécrétion est corrélée avec celle de nombreuses autres cytokines. Par exemple, Luo et al. [23] cultivent des cellules souches de murins en présence de quantités connues d' $IL-1\beta$, et mettent en évidence, en dosant le surnageant de culture, que l' $IL-1\beta$ augmente la production du facteur de l'endothélium vasculaire VEGF (Figure 1.2C). Elle joue donc un rôle dans la formation de vaisseaux sanguins, et participe ainsi à la diffusion de cellules tumorales [22, 24, 23].

Sur la Figure 1.2D, on s'intéresse aux niveaux de sécrétion typiques de plusieurs monocytes (M1, M2, M3) stimulés soit par un ajout de LPS (inducteur d'inflammation), soit par l'action combinée de LPS et d'ATP (activateur de l'inflammasome). Ces monocytes ont été préalablement conditionnés par la présence de différentes cytokines, en vue de moduler leur réponse inflammatoire. En l'absence de stimulation, une telle cellule immunitaire libère typiquement 1pg/mL d' $IL-1\beta$ par heure, mais cette production peut s'amplifier de façon significative en présence d'un agent oxydant, jusqu'à atteindre par exemple les 600pg/mL . Comme énoncé plus haut, on suggère ici que la sécrétion d' $IL-1\beta$ est faible en ordre de grandeur, mais susceptible de varier de presque deux décades en fonction de l'état des cellules et de la stimulation qu'elles subissent [28, 32].

1.1.3 Chimiokine VEGF : molécule signal de l'angiogénèse

Comme mentionné plus haut, la sécrétion d' $IL-1\beta$ participe à un mécanisme d'angiogénèse [22, 24, 23]. Cette régulation passe toutefois par la protéine directement associée à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, qui s'appelle VEGF, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire [34]. Isolée à la fin des années 80, cette molécule - dans ses nombreuses variétés - se classe parmi les chimiokines, des cytokines qui ont pour rôle d'attirer chimiquement des cellules spécifiques.

Sur la Figure 1.3A, on décrit ainsi comment les différentes molécules de la famille des VEGF, en particulier le VEGF-A, sont sécrétées par des monocytes et des cellules hématopoïétiques pour recruter et faire proliférer des cellules endothéliales. A travers leurs récepteurs notés VEGFR1 et VEGFR2, ces mêmes cellules sont également sensibles à la présence du VEGF-A. Elles montrent même un comportement chimotactique, migrant vers les hautes concentrations de VEGF-A [35], illustrant bien le double rôle paracrine-autocrine des cytokines.

Pour des cellules adhérentes, la sécrétion de VEGF est souvent reliée à l'hypoxie, c'est-à-dire la détresse causée par le manque d'oxygène et de nutriments. Sur la Figure 1.3B, on voit ainsi des cellules du foie activant, recrutant, et faisant croître des cellules endothéliales spécifiques des capillaires hépatiques en sécrétant VEGF-A. C'est un mécanisme similaire qui provoque d'importantes pertes d'acuité visuelle chez les diabétiques chroniques : l'occlusion des vaisseaux sanguins provoque une ischémie des cellules de la rétine, qui libèrent du VEGF-A et forment de facto de nouveaux vaisseaux sanguins surnuméraires dans l'oeil, qui gênent la vision [36].

En conclusion de cette première partie de mise en contexte biologique, soulignons qu'autant la lymphokine IL-1 β intéresse pour son rôle dans les inflammations et les désordres immunitaires, autant la chimiokine VEGF est étudiée pour son rôle-clé dans la vascularisation des tumeurs [37, 38, 39]. Mesurer avec sensibilité et précision des concentrations de VEGF dans des milieux biologiques pourrait donc être une voie d'amélioration des diagnostics de cancer. Les années 2000 ont ainsi vu paraître de nombreuses études in-silico [40, 41] ou expérimentales [42, 43] pour élucider les dynamiques de production de VEGF et mesurer ses concentrations.

1.2 Mesurer des Cytokines en microfluidique

Les mesures de niveaux de production de cytokines se font classiquement sur des sur-nageants de populations de plusieurs millions de cellules. On en retire donc une valeur moyenne de production par cellule, supposée représentative du comportement de chacune d'entre elles. A y regarder de plus près, il apparaît pourtant que cette valeur moyenne peut cacher une variabilité importante de comportements biologiques [44]. Plusieurs stratégies ont émergé ces dix dernières années pour réaliser des mesures sur des cellules individuelles. Devant la diversité des montages expérimentaux, des méthodes de capture, de détection et d'amplification des signaux biologiques, on se propose ici de distinguer les grands types de stratégies microfluidiques sur la base de leur phase de capture. On s'attachera à évaluer les performances de sensibilité des différents systèmes, en vue de les traduire pour l'étude de nos cytokines cibles, produits par des sphéroïdes micrométriques.

1.2.1 Nanopuits et mesures d'épifluorescence

Principe. L'une des voies microfluidiques suivies pour mesurer la sécrétion de cytokines est l'utilisation de nanopuits fonctionnalisés. Dans ce type de dispositif expérimental, développé pour la première fois par Love et al. [48] en utilisant les nouvelles techniques de microgravure, on piège des cellules individuelles dans des puits de quelques centaines de micromètres contenant un tampon de culture (Figure 1.4A). Les cellules incubent alors pendant pendant une durée typique de deux heures. Le plus souvent, les micropuits sont fermés par une lame de verre préalablement fonctionnalisée par des anticorps de capture. Pendant l'incubation, les surfaces fonctionnalisées se chargent ainsi des antigènes sécrétés (Figure 1.4B). A la fin de l'incubation, la lame

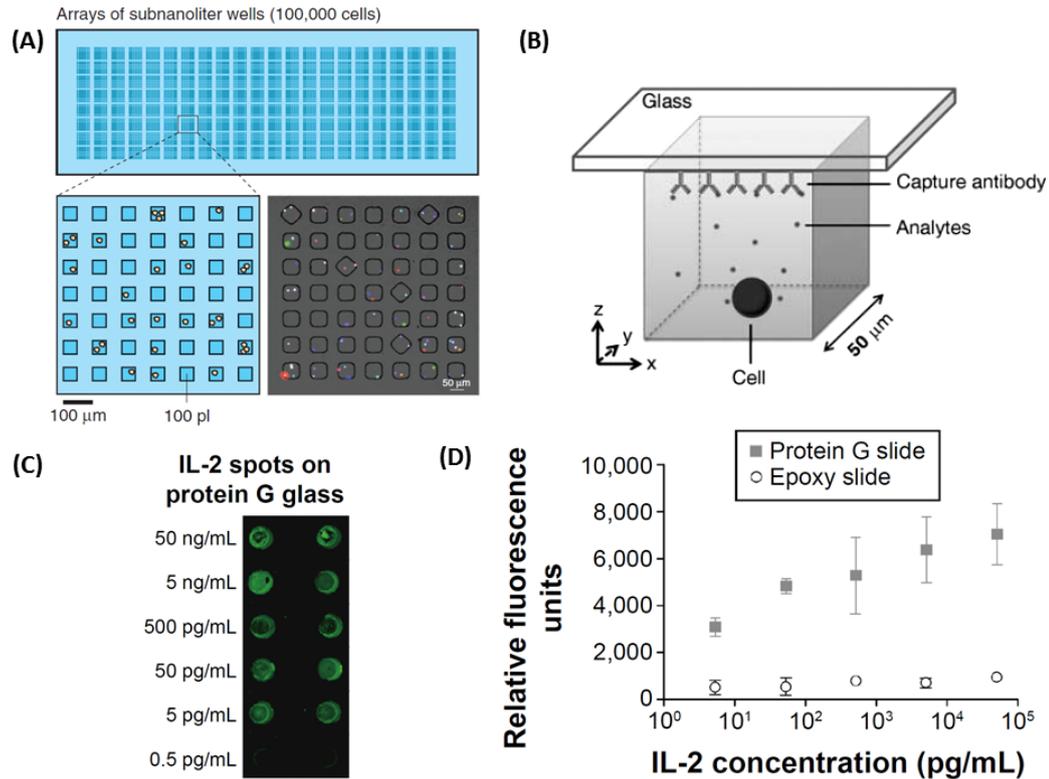


FIGURE 1.4: **Nanopuits pour la quantification des sécrétions d'une cellule unique.** (A) Schéma du montage expérimental typique, vue de haut ; (encart) chaque puits contient 100pL de milieu de culture ; photo composite lumière blanche et fluorescence : les cellules sont barcodées pour distinguer leur échantillon d'origine. Adapté de [45]. (B) Schéma de principe, vue de coupe : la cellule unique est placée dans un puits cubique de 50 μm de côté ; la lame de verre qui ferme le puits est recouverte d'anticorps de capture. Adapté de [46]. (C) Image typique après incubation de la cellule et révélation avec un anticorps secondaire fluorescent. On constatera l'hétérogénéité du signal de fluorescence sur la largeur du puits. (D) Courbe d'étalonnage pour la détection d'une lymphokine. Adapté de [47]

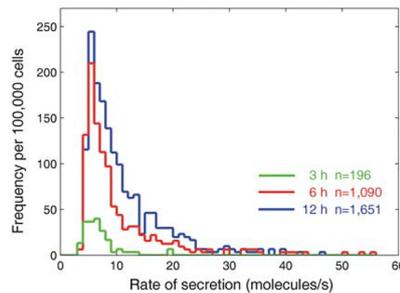


FIGURE 1.5: **Nanowells pour la mesure de l'hétérogénéité.** - Niveaux de sécrétion d'IL-6 pour des lymphocytes T stimulés 3, 6 ou 12 heures par du LPS [46]

de verre est révélée en utilisant des anticorps secondaires fluorescents spécifiques de chaque antigène, puis imagée sur un spectrophotomètre (Figure 1.4C). Sous réserve de se trouver dans la gamme dynamique du système, i.e. d'être au-dessus du seuil de détection sans pour autant saturer les surfaces de capture, la fluorescence de la lame de verre est directement reliée à la quantité d'antigène sécrétée, comme le montre la Figure 1.4D.

Utilisations en biologie. Au départ, les "nano-wells" avaient vocation à quantifier la sécrétion de précieux anticorps monoclonaux par des lymphocytes B immortalisés (hybridomes) [48, 49, 47, 50]. L'outil permet en effet de détecter les sous-populations les plus productives parmi des populations de plusieurs milliers d'hybridomes, ouvrant une voie vers la production massive d'anticorps monoclonaux pour le traitement des cancers [51]. Cette capacité à discriminer les phénotypes de sécrétion a été par la suite utilisée pour détecter des cytokines, en particulier des interleukines, l'interferon gamma, et le Tumor Necrosis Factor TNF-alpha, sécrétées par des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) [52], comme des lymphocytes T [46, 53, 54] ou B [55].

Au sein d'une population de $10^4 - 10^5$ cellules T supposément identiques, Han et al. [46] détectent ainsi de larges variations du taux de production d'IL-6 autour d'une valeur moyenne (Figure 1.5). La majorité des cellules sécrètent 5 molécules par seconde, tandis qu'une minorité peut présenter un taux de sécrétion presque dix fois supérieur. Soulignons le manque de pertinence qu'aurait une mesure sur une population entière : si l'on considère la distribution de sécréteurs marquée en rouge, et que l'on dose le surnageant de la population entière après 1h d'incubation, il apparaît qu'une molécule sur dix d'IL-6 aura été sécrétée par moins d'un centième de la population.

Un avantage majeur des nanopuits est la possibilité de poursuivre l'expérimentation sur les cellules *après* la mesure de leur sécrétome, avec par exemple des tests de cytométrie [46, 53] ou de RT-PCR [49]. Ainsi, par une mesure des niveaux d'expression de mARN, Han et al. expliquent cette hétérogénéité de leur population par l'existence de sous-populations, dont une est particulièrement productive d'IL-6.

Limites et Optimisations. En termes de sensibilité, cette technique permet a priori de distinguer des concentrations sur 4 à 5 décades, avec un seuil de détection typique de quelques pg/mL. Cette concentration ramenée au volume d'un nanowell, le système est donc sensible à la présence de 10^{12} molécules. Cependant, il est à noter que la variation de fluorescence observée sur une large gamme de concentration est souvent confinée à

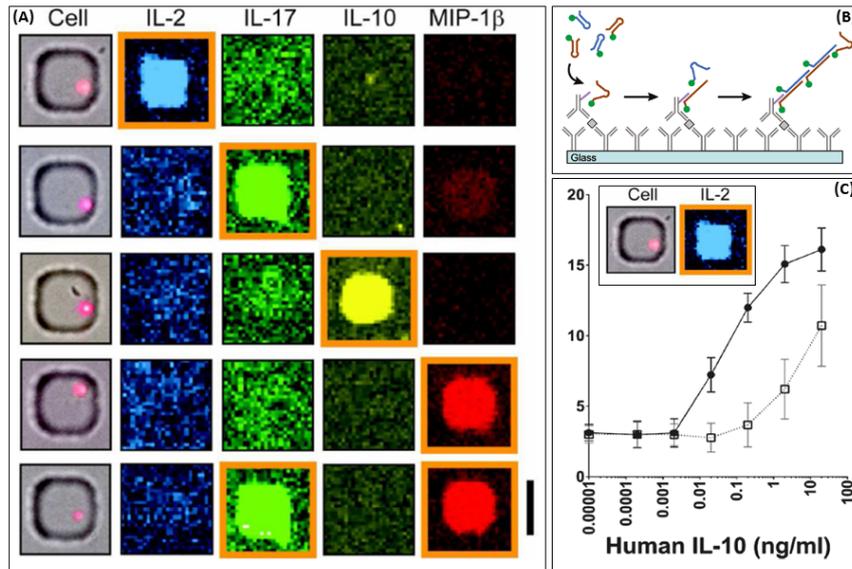


FIGURE 1.6: **Nanowells et immuno-hybridation pour la mesure multi-plexée de cytokines.** (A) Photographie typique de mesure parallèle de quatre lymphokines. (B) Principe de l'immuno-hybridation comme voie d'amplification contrôlée du signal, des brins d'ADN marqués par un fluorophore viennent s'hybrider sur le complexe immunitaire. (C) Fluorescence de la microplaque en fonction de la concentration en interleukine-2, avec amplification par brins d'ADN (marqueurs pleins) ou avec un anticorps fluorescent classique (vide) : l'immuno-hybridation augmente la sensibilité du test. La barre d'échelle représente 50 μm . Adaptée de Choi et al. [52].

une décade (Figure 1.4D), rendant obligatoire un grand nombre de répétitions pour assurer la résolution des mesures. De façon plus générale, c'est l'acquisition d'images de fluorescence de qualité qui semble faire défaut à ce système [53, 50].

C'est pourquoi certains travaux ont montré l'efficacité d'une amplification du signal : Choi et al. [52] décrit par exemple comment un seul complexe anticorps-antigène peut être amené à porter de très nombreuses molécules fluorescentes, (Figure 1.6B), ce qui augmente la fluorescence sur la lame de verre (Figure 1.6A) et donc la gamme dynamique de lecture pour la cytokine IL-10 (Figure 1.6C). Dans une étude de la même équipe, on propose aussi d'améliorer le signal de fluorescence final en imposant l'orientation des anticorps sur le substrat solide pour optimiser sa capacité de capture effective [47]. Visuellement, lorsque les anticorps sont orientés partie variable vers le haut, la figure 1.4C montre immédiatement une augmentation de fluorescence sur la lame, et cela se traduit là-aussi par une courbe de calibration améliorée (Figure 1.4D).

Dans les faits, les dimensions du puits étant comparables à celles de la cellule, la capture de l'antigène sécrété dépend peu de son temps de diffusion jusqu'à la lame de verre fonctionnalisée, ce qui rend la fluorescence finale relativement homogène (Figure 1.6A). Une optimisation numérique et analytique du système des nanowells a toutefois été menée par Torres et al. [50] pour mettre en compétition la sécrétion de cytokine par la cellule, sa diffusion dans le puits, et enfin sa capture par des anticorps placés sur la lame de verre ou les parois du puits. Il apparaît que le confinement du puits par une lame de verre permet de discriminer plus facilement les vitesses de sécrétion des cellules, et dépend moins de l'affinité de l'anticorps de capture pour la cytokine d'intérêt. Les cytokines s'accumulent en effet dans ce système fermé, et parviennent plus rapidement à dépasser le seuil de détection de la microscopie qu'en configuration ouverte.

En diversifiant les anticorps de capture présents sur les surfaces, et les fluorophores attachés aux anticorps de détection, on peut quantifier en parallèle plusieurs antigènes, la seule limite résidant dans la résolution spectrale des différents fluorophores. Cette possibilité de mesure multiplexée [52, 53, 49] est sans aucun doute le plus gros avantage de la technique de microgravure, et permet d'obtenir en une journée une vue à plusieurs facettes des niveaux de cytokines sécrétées par une population de cellules (Figure 1.6A).

1.2.2 Gels fonctionnalisés et mesure d'un volume fluorescent

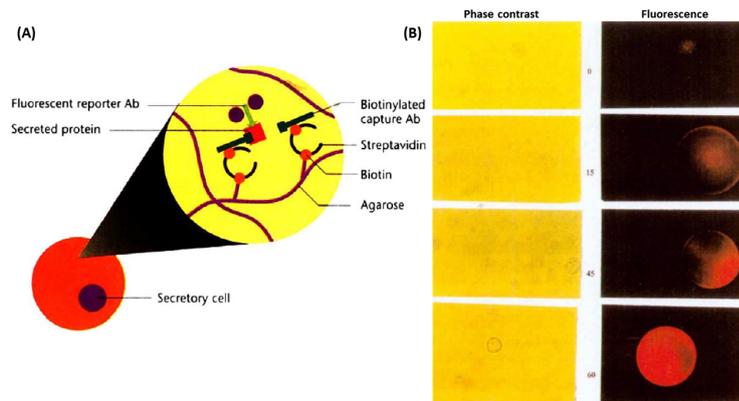


FIGURE 1.7: **Gel Micro Droplets pour la mesure de sécrétion.** (A) Principe de l'utilisation de gels fonctionnalisés : ici l'agarose biotinylée est marquée par de la streptavidine, sur laquelle vient s'attacher un anticorps de capture lui aussi biotinylé. Une fois capté, l'antigène est repérable grâce à l'ajout d'un anticorps secondaire marqué par un fluorophore. (B) Une GMD contenant un Hybridome humain qui sécrète un anticorps IgG, photographiée après 0, 15, 45, 60 minutes en contraste de phase et en fluorescence. Adapté de [56].

Principe et utilisations. Une seconde approche pour mesurer les sécrétions d'une cellule consiste à utiliser un gel perméable comme support de capture de l'antigène à quantifier. Historiquement, ce type d'approche a été développé à la fin des années 80, et visait à détecter la présence de bactéries dans des échantillons biologiques [57, 58, 59] : une bactérie, isolée dans une goutte d'agarose gélifiée contenant un indicateur de pH, trahissait sa présence par son métabolisme acidifiant.

Au début des années 90, on réalise le potentiel de ces GMD (Gel Microdroplets) pour l'étude du sécrétome de cellules eukaryotes [60, 61, 62]. Ainsi, dans le but de détecter la sécrétion d'IgG par des cellules mammifères, on commence par greffer un anticorps de capture sur les mailles d'un gel, souvent en utilisant la combinaison biotine-streptavidine (Figure 1.7A). On piège la cellule sécrétrice dans un gel en phase liquide, on gélifie, puis l'on vient détecter en fin d'incubation en utilisant un anticorps de détection marqué par un fluorophore (Figure 1.7B). Pour la lecture du niveau de fluorescence, la littérature décrit surtout des systèmes en cytométrie de flux [61, 63, 62].

Le gros avantage mis en avant dans la littérature sur les GMD est la non-perturbation du système biologique par l'observateur : les gels sont bio-compatibles, les cellules ne "voient" pas leur confinement, et peuvent être utilisées en aval du test de sécrétome pour des cultures, de l'analyse génomique, ou des mesures intracellulaires.

Les premières études sur les GMD se sont toutefois limitées à de la détection qualitative : on cherche surtout à isoler les cellules les plus productives [64], pas à *quantifier*

la sécrétion, sinon a posteriori par des tests ELISA classiques [65, 66]. Cela s'explique finalement par l'absence des développements de la microfluidique : les gouttes de gels, produites par de violentes méthodes de centrifugation ou de dispersion sous pression, ont de colossales dispersions de tailles [60], et la statistique Poissonnienne rend erratique la présence d'une cellule unique par goutte. La mesure quantitative de cytokines, par exemple de VEGF, sur des gouttes de gels fonctionnalisés et monodisperses apparaît dans la littérature depuis 2010, bénéficiant de fluidiques précises et d'analyse d'image éprouvée [67].

Pour terminer sur cette partie, on décrira par exemple l'utilisation élégante des gels à code-barre développés par Appleyard et al. [68], qui permettent la quantification simultanée de trois cytokines. Dans cette étude, les particules de gels sont fabriquées par une puce microfluidique (Figure 1.8A), puis mises en contact avec des surnageants de culture (Figure 1.8B), avant de passer devant un montage "de lecture" combinant une fluidique contrôlée et une mesure d'intensité de fluorescence (Figure 1.8C). Le montage est sensible sur trois décades de concentration, avec une limite de détection typique de quelques picogrammes par millilitres (Figure 1.8D).

Notons enfin que l'utilisation des gels marqués demande une pré-étape de synthèse assez longue à développer, avec l'utilisation de la microfluidique pour fabriquer les particules de gel, et de la biochimie pour y coupler les anticorps d'intérêt. Des temps d'incubation parfois longs sont nécessaires pour permettre la diffusion des antigènes dans le réseau du gel fonctionnalisé [69, 70] et la complexation anticorps-antigène. Reste que l'idée de phase de capture divisée ouvre la voie vers une utilisation plus variée que la mesure en tube, sous réserve de biocompatibilité des gels avec les cellules cibles.

1.2.3 Billes fonctionnalisées et méthodes de détection

Les deux grandes stratégies évoquées plus haut ont prouvé leur efficacité pour mesurer de larges gammes de concentration en cytokines, avec la possibilité de multiplexer les mesures, et de mettre en contact direct la cellule sécrétrice et la phase de capture. Reste que ces méthodes sont difficilement modulables en fonction de la cible biologique, et demandent une optimisation des procédés de microfabrication, des réactions chimiques, et des méthodes d'observation pour mesurer des signaux biologiques différents. La diffusion apparaît souvent comme un phénomène limitant qu'il s'agit de quantifier pour connaître les temps d'incubation nécessaires à une mesure valable.

Une troisième option est d'utiliser des billes fonctionnalisées pour la capture d'antigène : en tant que solide divisé, elles présentent une grande surface spécifique, peuvent être introduites facilement sous forme de suspension, indépendamment des conditions de culture de la cellule d'intérêt. On remarquera d'ailleurs l'extrême diversité des montages microfluidiques utilisant des billes. La littérature présente l'utilisation de gouttes de toutes tailles, allant de la centaine de picolitres [75], à quelques dizaines de femtolitres [76, 73]. On trouve aussi mentions des nano-wells, dans lesquels sont co-emprisonnés une bille et une cellule individuelle [74]. Il existe aussi des montages plus atypiques, dans lesquels les billes s'immobilisent puis se déplacent entre des pièges hydrodynamiques [77], dans des spirales microfluidiques [78], voire entre des 'raquettes de ping-pong' miniaturisées, comme dans Sochol et al. [79, 80].

L'utilisation de billes fonctionnalisées pour la mesure de cytokine est relativement ancienne : en 1990, Liabakk et al. [71] fonctionnalisent eux-mêmes des billes avec des anticorps monoclonaux produits dans leur laboratoires. Ils mesurent ensuite la TNF produite par des monocytes humains, capturée par leurs billes "maison", et rendue détectable avec un anticorps marqué par un isotope radioactif (Figure 1.9A).

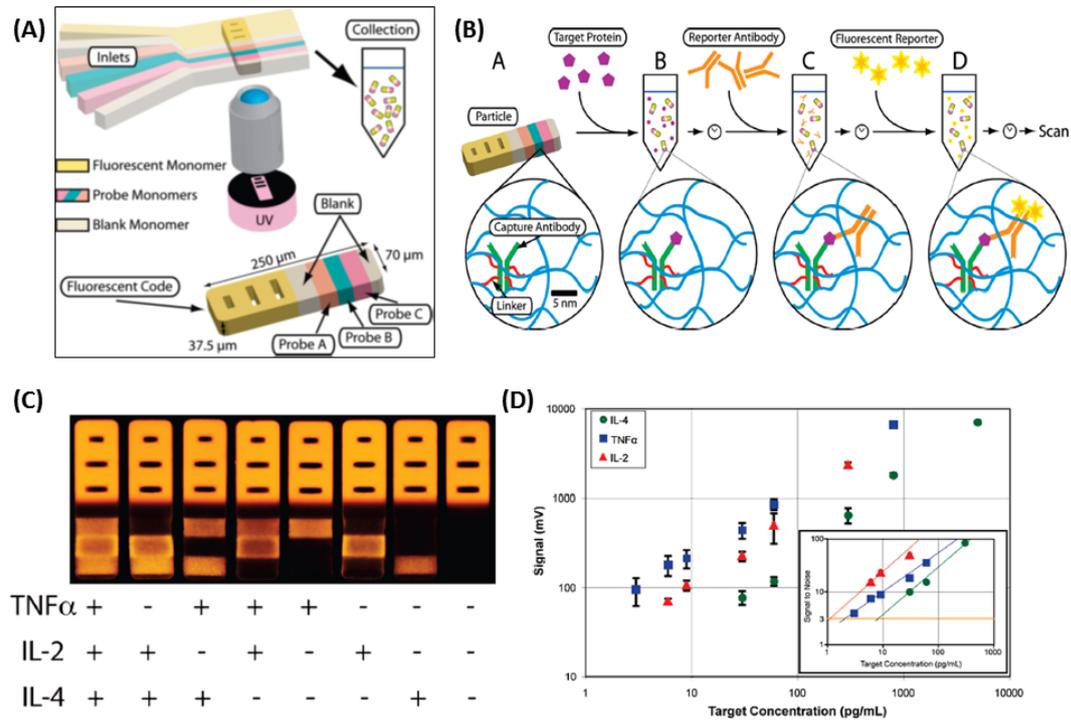


FIGURE 1.8: **Les GMD revisitées par la Microfluidique.** (A) Fabrication de particules de gels par microfluidique : les six entrées de fluides convergent et sont polymérisées par une illumination en UV. Chaque "probe monomer" contient un anticorps spécifique à une cytokine donnée. (B) Lors de la mise en contact avec des échantillons biologiques, les gels réticulés capturent la cytokine, puis son anticorps de détection, et enfin des fluorophores. (C) Photographie de fluorescence des particules soumises à différentes cytokines, en fin d'expérience. (D) La fluorescence des différentes parties de la particule de gel est mesurée avec un laser, et donne une courbe de calibration linéaire sur près de trois décades de concentrations. Adapté de [68].

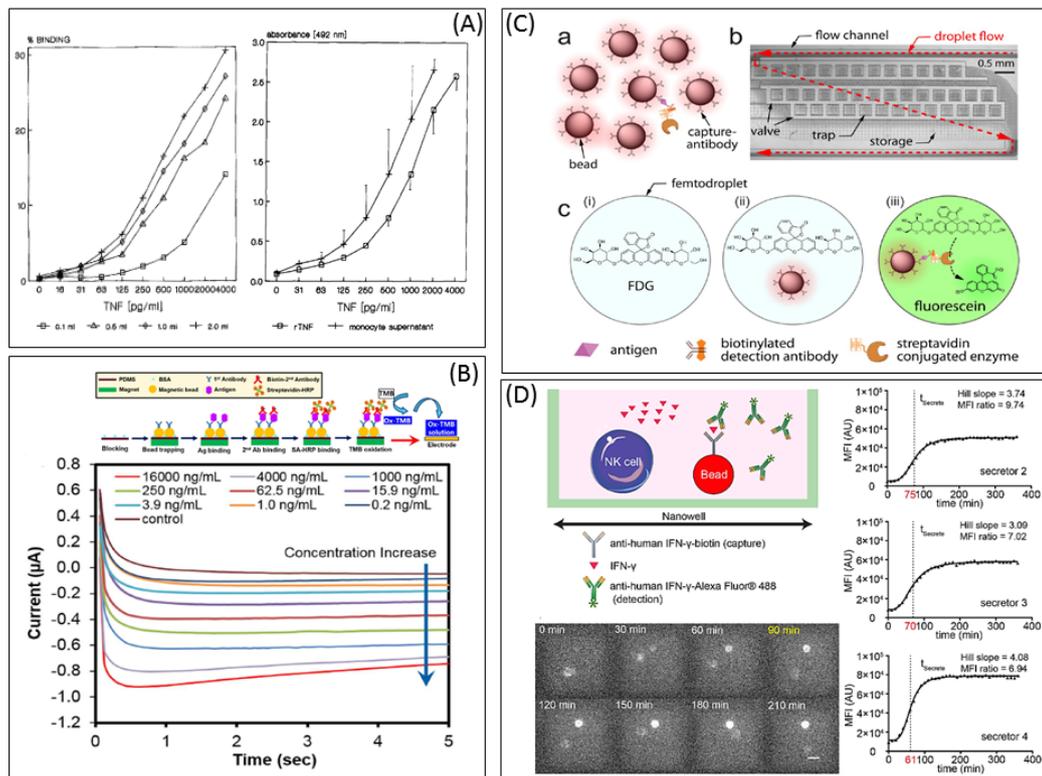


FIGURE 1.9: **Histoires de billes...** (A) Premières mesures immunologiques sur des microbilles : la cytokine TNF est attrapée par des billes fonctionnalisées puis détectée soit par un anticorps marqué par un isotope radioactif (^{125}I) [gauche] soit par l'activité enzymatique d'une peroxydase [droite]. Adapté de [71]. (B) Le complexe immunitaire porté par la bille comporte une enzyme qui change la conductivité du milieu lors de son activation ; ces changements de conductivité sont détectés très précisément par des électrodes incluses dans la puce microfluidique. Adapté de [72]. (C) Test microfluidique sensible à la molécule unique : l'échantillon biologique est divisé en gouttes de 32 femtolitres, dans lesquelles se trouvent une ou plusieurs billes ainsi que le substrat de l'enzyme. Lorsque l'antigène est présent, l'enzyme est activée et colore la goutte. L'ensemble du test prend moins de dix minutes. Adapté de [73]. (D) Mesure de la sécrétion d'une cellule T directement en présence de la bille et des composants de l'immuno-essai. La bille se colore au cours du temps à mesure que la cellule produit l'interféron gamma. Adapté de [74].

Reconnaissant la faible ergonomie des outils radioactifs, l'étude propose de réaliser des mesures colorimétriques, en utilisant les anticorps de détection d'un kit ELISA classique, qui sont couplés à une enzyme. Ils parviennent ainsi à distinguer des concentrations de TNF sur trois décades de concentration.

L'utilisation en routine de billes fonctionnalisées, à travers des kits commerciaux comme Dynabeads, Ademtech ou Luminex, se démocratise à la fin des années 2000, en même temps que les techniques de microfabrication. Les surnageants de culture cellulaires et les échantillons biologiques provenant de patients sont désormais introduits dans des dispositifs microfluidiques contenant les billes, et tous les composants d'un immuno-essai classique. Selon le produit de la réaction enzymatique finale, certains proposent de mesurer la conductivité finale autour des billes [81, 72], ce qui permet de discriminer des concentrations sur plus de 5 décades, comme le montre la Figure 1.9B. Bien que moins précises, ce sont pourtant les mesures de cytométrie de flux [79, 78] et de fluorescence [73, 82, 76] qui sont les plus fréquentes, probablement parce qu'il est plus difficile de développer un montage à électrode que de regarder un échantillon sous la lumière d'un laser ou d'une DEL. Du reste, on peut prendre pour exemple le travail de Shim et al. [73], qui parvient à détecter des molécules uniques isolées dans des gouttes de quelques femtolitres grâce à une amplification enzymatique d'un substrat chémifluorescent (Figure 1.9C).

Pour finir, c'est dans les années 2010 que l'on ose enfin mettre des billes fonctionnalisées au contact direct des cellules vivantes. Il s'agit systématiquement de cellules immunitaires, qui peuvent survivre à l'absence de support d'adhésion (anoïkis), et qui sécrètent des cytokines. Les cibles les plus fréquentes sont une fois encore les Interleukines (notamment IL-6) [75, 83, 84], l'interféron gamma [75, 74, 85], et le TNF [75, 77, 84]. Sur la Figure 1.9D, on décrit la méthode employée par An et al. pour mesurer IFN-gamma produite par un lymphocyte T piégé dans un nanowell. La mesure est ici faite en analysant la fluorescence brute de la bille après marquage par l'immuno-essai. C'est vers ce type de démarche que s'achemine notre étude.

1.2.4 Emulsion simple pour la mesure de sécrétions cellulaires

En générant et en stabilisant des émulsions de solutions aqueuses dans de l'huile fluorée, on peut parvenir à quantifier la présence de molécules sécrétées par des cellules uniques. Eyer et al. [76] proposent ainsi d'accumuler des milliers de gouttes de 40 pL dans une chambre microfluidique, d'isoler dans chacune d'entre elles des cellules immunitaires de souris, et de mesurer la sécrétion d'anticorps IgG par ces cellules directement sur des billes.

Sur la Figure 1.10, on décrit le système en question : après isolation des cellules sécrétrices, une jonction en T permet d'encapsuler des cellules uniques et des billes pouvant attraper des anticorps IgG. Ces gouttes sont envoyées dans une chambre de $6.5 \times 8.6 \text{ cm}^2$ où elles s'organisent en empilement compact. Après attachement des diverses molécules qui constituent l'immuno-essai, l'ensemble des gouttes est analysé par une illumination laser et un traitement d'image pour remonter à des niveaux de sécrétion. Les billes utilisées étant paramagnétiques, l'application d'un champ magnétique sur le système permet d'améliorer l'efficacité des réactions à leur surface [86] et d'aligner les billes pour faciliter l'analyse d'image. Ainsi, le système permet de mesurer des concentrations d'anticorps sécrétés de façon spécifique et quantitative. Sur la Figure 1.11, la courbe d'étalonnage établit une dépendance directe de la fluorescence des billes par rapport à l'isotype de l'anticorps (seuls les IgG sont détectés) et à sa concentration dans la goutte.

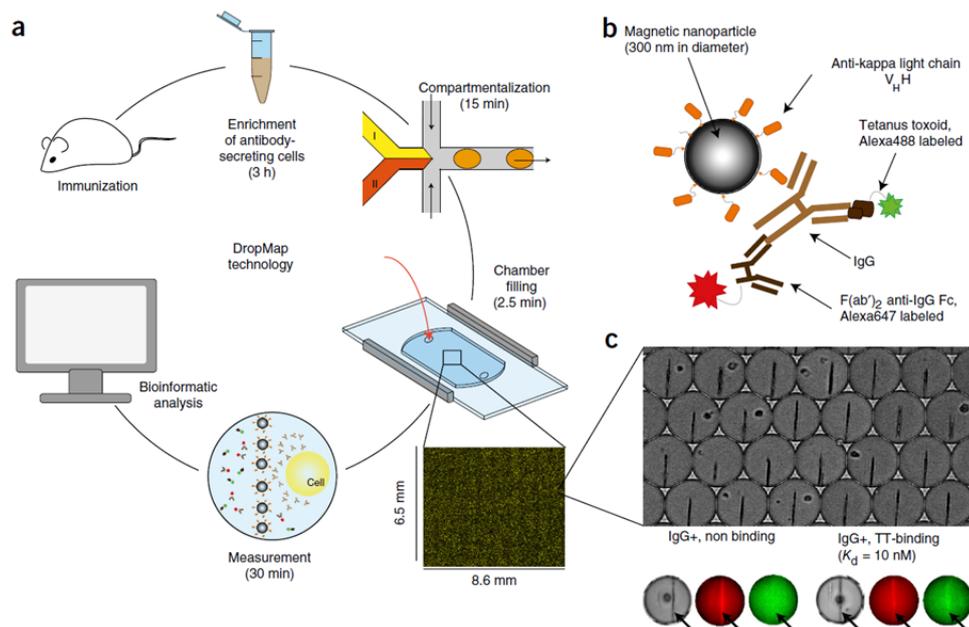


FIGURE 1.10: **Un système pour mesurer les sécrétion de cellules individuelles.** Schéma du montage expérimental : les cellules immunitaires de souris sont isolées, reconcentrées, puis coencapsulées avec une solution contenant des billes paramagnétiques de 200 nm marquées anti-IgG de souris, et des anticorps de détection liés à un fluorophore vert (FITC). Ces gouttes sont accumulées dans un tableau, et incubées pendant 30 minutes. un champ magnétique permet d'aligner les billes pour faciliter l'analyse d'image. Lorsque les billes (repérables par leur code-barre rouge) ont détecté des IgG, elles fluorescent en vert. Tiré de Eyer et al. [76]

Dans un tel système, les temps de diffusion sont extrêmement courts, de l'ordre de la dizaine de secondes pour des IgG [87], de sorte que la mesure en question prend moins d'une demi-heure. Dans ce laps de temps, la cellule ne manque de rien : ni d'un substrat sur lequel adhérer, car ce sont des cellules périphériques, ni d'oxygène, car le PDMS est perméable au gaz, ni de nutriments, n'ayant qu'une seule cellule par compartiment. Dans les informations complémentaires de leur article, les auteurs précisent d'ailleurs qu'au bout de 6 heures d'incubation en goutte, seulement 12,3% des cellules sont mortes.

Dans cette thèse, notre objectif sera de quitter l'échelle microscopique de la cellule unique pour aller vers une échelle intermédiaire et mesurer la sécrétion de plusieurs cellules, organisées sous forme de sphéroïdes. Dès lors, les volumes utilisés se doivent d'être plus importants, de l'ordre de la centaine de nanolitres pour des sphéroïdes de taille raisonnable. De tels réacteurs nécessitent davantage d'opérations microfluidiques qu'une simple accumulation dans un compartiment 2D. Dans le prochain paragraphe, on va donc chercher à manipuler et à immobiliser nos microgouttes d'eau, en particulier par des méthodes dites "passives", qui ne nécessitent pas d'apport permanent d'énergie venant de l'opérateur.

Plusieurs remarques pour conclure sur cet état de l'art. Il existe une extrême diversité dans les méthodes de mesures de sécrétomes, qui se focalisent principalement sur les surnageants de culture, ainsi que sur les cellules immunitaires. Le Tableau 1.1 compile quelques travaux où sont réalisées des mesures de molécules sécrétées. Cette

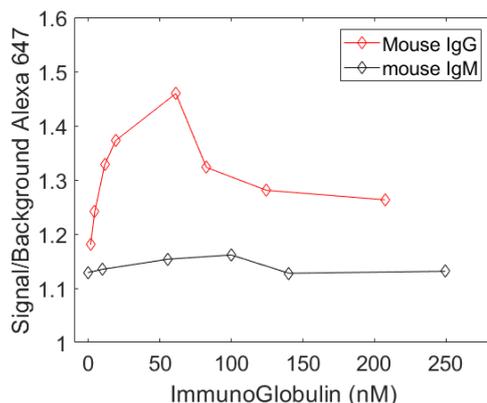


FIGURE 1.11: **Etalonnage et spécificité de la mesure de sécrétion en gouttes.** Rapport signal sur bruit de fluorescence pour des billes mises en contact avec des concentrations croissantes d'anticorps IgG et IgM de souris. Chacun des points correspond à plus de 500 billes lues. Adapté de Eyer et al. [76]

Auteur	Cible	Analyte	Methode	Gamme Conc. (pg/mL)	Temps
Choi et al. 2015	Hybridomes	IFN- γ , IL-2	Nanowells	10 à 105	2h prep + 2h20 essai
Han et al. 2012	T cells CD3+	IFN- γ , IL-2, TNF-	Nanowells	secretion rates	2h
Turcanu et al. 2002	CD14+ monocytes	6 cytokines	GMD	100 à 5000	>12h
Zhao et al. 2015	surnageant	VEGF	GMD	1 à 1000	75min
Sasso et al. 2012	surnageant	IL-6, TNF-	Billes	102 à 104	20min
Cui et al. 2018	PBMCs (suspension)	IL-6, IL-8, TNF-	Billes	10 à 104	3h
Ma et al. 2011	THP-1 monocytes	6 cytokines	Puce	10 à 106	>12h
Lu et al. 2013	monocytes	22 cytokines	Puce	10 à 104	>24h

TABLE 1.1: **Quelques études typiques de sécrétomes en microfluidique.**

revue que nous venons de faire est non-exhaustive, et le choix de partager les technologies existantes en trois catégories – Nanopuits, GMD, et Billes – relativement arbitraire. D'ailleurs, dans les références [88, 89], on retrouve deux montages microfluidiques atypiques dans lesquels la puce elle-même sert de support de capture. Ces études, bien que demandant une grande maîtrise de la microfabrication et du marquage par des anticorps, parviennent à quantifier plusieurs dizaines de cytokines en un seul test sur des cellules uniques. Ces mesures de sécrétomes ne s'applique pas encore au domaine des cellules adhérentes, encore moins à celui des organoïdes 3D. Si beaucoup d'études se limitent à la détection et à la comparaison relative de niveaux de sécrétion, d'autres parviennent à les quantifier par la cytométrie de flux et l'analyse d'image. Nous avons à présent en tête des ordres de grandeurs des concentrations, des temps de diffusion, et des limites de détection mis en jeu. Dans la suite de ce chapitre, nous allons parler davantage de microfluidique, nous familiariser avec les problématiques de manipulation de gouttes, puis présenter le montage que nous utiliserons pour quantifier des cytokines et cultiver des sphéroïdes.

1.3 Créer, manipuler et piéger des microgouttes d'eau

L'objectif de cette troisième partie est de produire puis d'immobiliser de petits réacteurs indépendants sous forme de gouttes d'eau micrométriques entourées d'huile fluorée. Deux challenges apparaissent donc : il faut d'une part maintenir intacte une émulsion, par nature métastable, d'eau dans de l'huile, et de l'autre proposer à ces

gouttes une position d'équilibre mécanique suffisamment basse en énergie pour résister à la poussée d'un fluide environnant.

1.3.1 Microfluidique de gouttes, fondations

Génération de gouttes En vue d'obtenir des micro-réacteurs isolés, on se propose ici de parler de fabrication de gouttes. On part de deux liquides non miscibles : l'un est une huile inerte, l'autre une solution aqueuse qui peut contenir des analytes, des réactifs chimiques, des bactéries, des cellules... L'objectif est de convertir cette phase continue en compartiments isolés. Pour ce faire, les techniques classiques de type "T-junction" ou "Flow Focussing" jouent sur la géométrie des canaux fluidiques, les débits des fluides, voire leurs propriétés physiques pour séparer des gouttes d'eau de sa phase d'origine. Dans le premier cas, un courant d'huile vient plier puis arracher des gouttes [90] d'un jet d'eau qui lui est perpendiculaire. Dans l'autre, on vient pincer le courant d'eau entre deux jets d'huile, qui propulsent ensuite la goutte découpée loin du lieu de découpe [91]. Une troisième méthode dite de "Step Emulsification", que l'on utilisera davantage dans cette thèse et que l'on détaille dans l'Annexe B, permet aussi de créer des gouttes en faisant varier le confinement de la phase à disperser.

Quelle que soit la méthode employée, les dimensions spatiales et les régimes de vitesse employés en microfluidique nous placent en régime bas nombre de Reynolds. Les manipulations microfluidiques sont ainsi affranchies des effets d'inertie et de turbulences. Par ailleurs, les fluides se trouvent en évolution quasi-statique dans la puce, et suivent donc en permanence, et de façon répétable le chemin de moindre énergie, rendant les déplacements peu ou pas variables d'une répétition à l'autre [92]. C'est cette répétabilité microfluidique qui permet de diminuer la dispersité de taille dans nos émulsions [93], les rendant plus stables dans le temps [94].

Les gouttes produites en microfluidique ont des rayons typiques allant de quelques microns à plusieurs centaines de microns, de sorte que les volumes manipulés peuvent aller du femtolitre à la fraction de microlitre. En termes de dispersité de taille, la microfluidique arrive fréquemment à descendre en dessous de 5% de variation sur les rayons des gouttes [95].

Emulsions stables. Créer une interface entre deux fluides a un coût énergétique, qui est proportionnel à la tension de surface entre les deux fluides, et à l'aire de la surface interfaciale engendrée par la création de l'interface. C'est ce déficit énergétique qui rend les émulsions instables dans le temps, et tend à ramener le système vers un état à deux phases non dispersées. En plus de la monodispersité amenée par la microfluidique, le choix des différentes phases et des surfactants utilisés détermine la stabilité des gouttes et les possibles applications des systèmes microfluidiques.

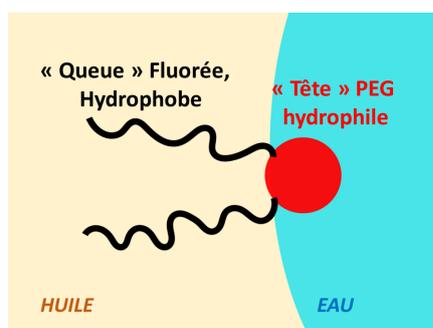


FIGURE 1.12: Un tensioactif.

De très nombreuses combinaisons d'huiles et de surfactants ont été testées dans la littérature [96]. On peut citer l'usage d'huiles minérales type hexadécane, combiné à des surfactants hydrosolubles comme le dodécylsulfate de sodium [97]. Dans ces huiles, les molécules organiques possèdent un coefficient de partage non négligeable, et se solubilisent partiellement dans la phase continue autour des gouttes. En comparaison, les huiles fluorées comme le FC-40* ou le HFE* présentent une extrême imperméabilité aux molécules organiques, au point que l'on a pu y réaliser des réactions très sensibles aux contaminations, comme des qPCR* [98]. Se pose la question de l'effet de ces surfactants sur le contenu des gouttes qu'ils entourent. Il faut en particulier s'assurer qu'ils sont biocompatibles et ne perturbent pas le système chimique ou biologique dans la goutte. Par exemple, Dias et al. montraient récemment qu'un surfactant pouvait modifier les propriétés mécaniques d'une cellule épithéliale soumise à un traitement fluoré [99]. Plus grave, un tensioactif est une molécule labile, qui peut quitter la surface de la goutte par l'action de l'agitation thermique, en emportant de la phase aqueuse sous forme de micelle. Dès lors, les gouttes d'eau, sans coalescer, peuvent échanger des molécules dans le temps [100], rendant illusoire la compartimentation des micro-réacteurs. Ce transport est heureusement mesurable et contrôlable par la composition de la phase huile [101, 102]. Dans l'émulsion d'eau dans l'huile qui nous intéresse, on utilisera la combinaison standard d'un polymère constitué de deux longues chaînes fluorées branchées (des polymères d'éthers fluoro-carbonés type Krytox[®]) sur une tête hydrophile composée de plusieurs unités polyéthylène glycol (PEG) [103], solubilisé dans l'huile fluorée FC-40.

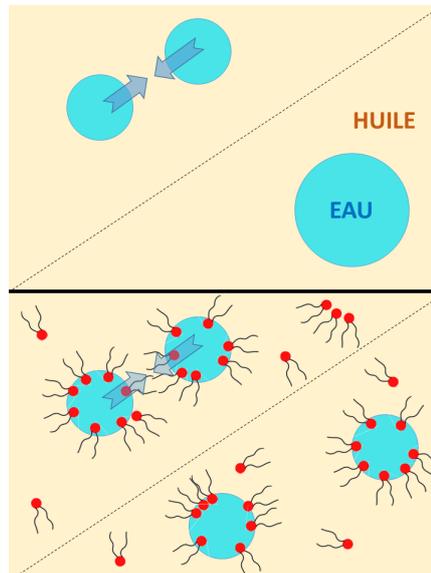


FIGURE 1.13: **Les tensioactifs, gage de stabilité des émulsions contre la coalescence.** (A) En l'absence de surfactant, les gouttes minimisent leur énergie de surface par coalescence. (B) En présence d'un surfactant adapté, la coalescence est empêchée par deux mécanismes complémentaires : d'une part la barrière d'énergie à franchir est renforcée par la gêne stérique (ou des répulsions électrostatiques) entre les queues des surfactants, d'autre part, le mouvement de deux gouttes proches induit un écoulement Marangoni qui contrarie le rapprochement.

L'utilisation de surfactants et la monodispersité des gouttes produites en microfluidiques rend donc possible la création d'un grand nombre de micro-réacteurs qui gardent leur intégrité pendant le temps de l'expérience. La question est maintenant de

savoir manipuler ces réacteurs pour réaliser des expériences de biologie et de biochimie.

1.3.2 Guider des gouttes

Une fois générés, il s'agit de savoir déplacer puis immobiliser nos micro-réacteurs aqueux. Parmi les solutions les plus précises proposées par la littérature, on peut citer l'usage d'ondes acoustiques [104], de champs électriques [105], ou de LASER [106, 107] pour manipuler des gouttes uniques et les amener d'un point à l'autre d'un micro-système. Dans notre étude, les puces microfluidiques sont amenées à changer de position - de la station de chargement, au microscope en passant par l'incubateur - on souhaite donc se cantonner à de la fluidique pour manipuler les gouttes.

De simples écoulements de phase continue permettent de déplacer, de dévier, d'arrêter les gouttes. De façon plus passive encore, on peut utiliser la géométrie de la puce pour engendrer des mouvements : Dangla et al. [108] décrivent ainsi comment des gradients de hauteurs au sein de la puce microfluidique peuvent guider les déplacements de gouttes. Ces gradients de hauteur permettent en effet à la goutte de diminuer son confinement, et de réduire ainsi son énergie de surface. Spontanément, la goutte va ainsi se déplacer vers les zones les moins confinées (Figure 1.14).

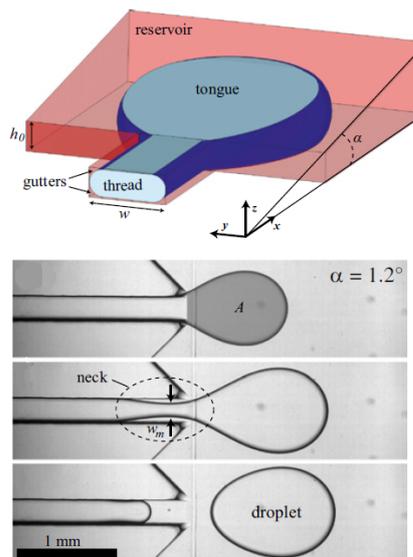


FIGURE 1.14: **Gradient de confinement pour un déplacement spontané des gouttes.** Schéma-Principe de l'arrivée d'une phase à disperser dans une chambre à gradient de confinement. Avancée spontanée d'une goutte dans une chambre à gradient de confinement.

Tiré de Dangla et al. [108]

Partant de ce principe, on peut créer des encoches de largeurs ou de profondeurs variables, qui apparaissent comme des rails capillaires pour guider le mouvement des gouttes. Si la largeur du rail augmente, on peut s'attendre à ce que la goutte se déplace *spontanément* vers les zones de moindre confinement, sans la poussée d'un fluide extérieur. C'est ce qui permet par exemple à Fradet et al. [109, 110] d'amener, sans écoulement, deux gouttes à proximité l'une de l'autre, en vue de réaliser des réactions chimiques en parallèle (Figure 1.15). Dans ce système, la rangée supérieure de gouttes est générée par step emulsification, puis guidée jusqu'à une zone de taille adaptée à la goutte, sans qu'un écoulement soit appliqué dans la direction du rail.

S'il est important de pouvoir transporter nos bioréacteurs d'un bout à l'autre de la puce, il apparaît également primordial de pouvoir les immobiliser de façon contrôlée. Nous allons donc, dans la prochaine section, donner une vue d'ensemble des stratégies utilisables pour y parvenir.

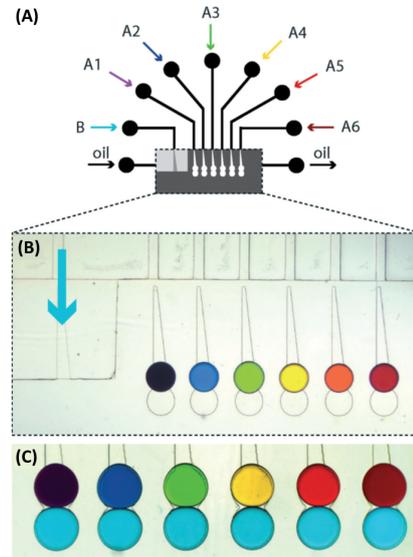


FIGURE 1.15: **Gradient de confinement pour la chimie en microgouttes.** Montage microfluidique pour la génération parallèle de 6 gouttes, guidées par un rail capillaire jusqu'à un piège capillaire. L'entrée montrée en bleu crée une goutte secondaire amenée par un écoulement d'huile jusqu'à la rangée inférieure de pièges. Tiré de [109]

1.3.3 Immobiliser des gouttes

Vue d'ensemble. Plusieurs méthodes de piégeage existent dans la littérature. La plupart du temps ce sont des méthodes qualifiables d'*actives*, dans le sens où il est nécessaire d'apporter de l'énergie (du mouvement, des ondes) à la puce microfluidique pour lui permettre de capturer la goutte d'intérêt. On citera par exemple l'usage de microvalves activables [111, 112], ou de pièges acoustiques [113] (Figure 1.16).

Ces technologies actives deviennent cependant coûteuses quand il s'agit de piéger un grand nombre de gouttes. En comparaison, il apparaît plus simple d'utiliser la géométrie de la puce pour réaliser des piégeages de gouttelettes basés sur la résistance à l'écoulement (*flow resistance-based droplet-trapping*) [114, 115]. On peut aussi prendre l'exemple du montage à "by-pass", introduit en 2006 par Tan et al. [116] : les gouttes circulent dans un microcanal en S, et prennent la première voie de garage disponible sur leur chemin. Dans ce type de montage, que l'on décrit par exemple Figure 1.17A, le flux de phase continue plaque des gouttes d'une centaine de nanolitres dans des encoches en PDMS, et les y maintient tant que dure le flux. Dès lors, il apparaît possible de réaliser de larges assemblées de gouttelettes piégées [117, 118, 119], dans lesquelles il devient plus aisé de paralléliser des expériences de biologie [120].

Si ces méthodes sont qualifiées de passives, elles nécessitent néanmoins l'application constante d'un débit de phase continue pour maintenir les gouttes dans leur piège. En comparaison, il existe des techniques de piégeage dans de véritables minima d'énergie : on peut par exemple utiliser la différence de densité entre les gouttes et la phase continue pour les piéger dans de petites cavités, simplement en laissant la sédimentation ou la poussée d'Archimède faire leur œuvre [122, 123, 121]. La Figure 1.17B montre

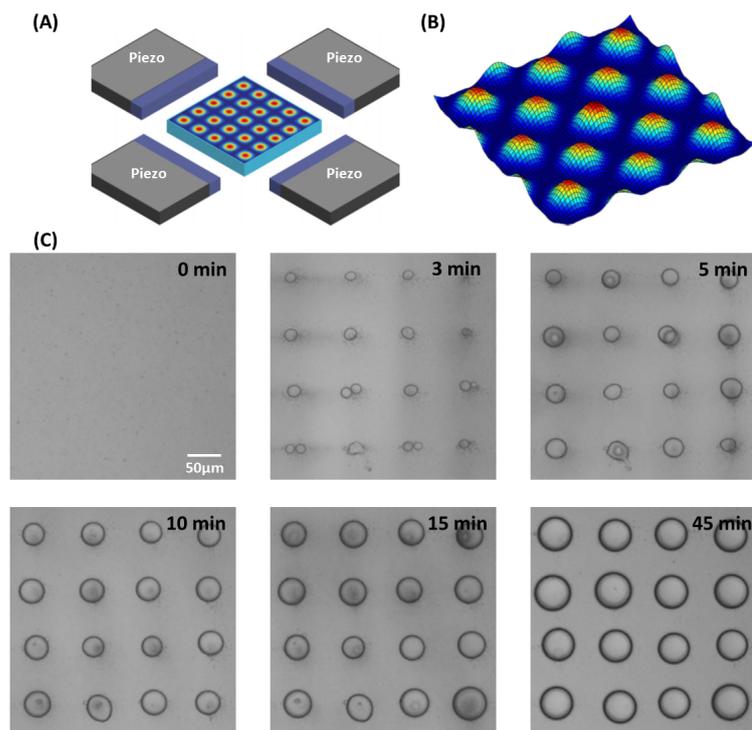


FIGURE 1.16: **Piégeages actifs par des ondes acoustiques.** (A) Montage expérimental typique, vue 3D : des piézo-électriques vibrent en phase autour de la chambre microfluidique pour créer (B) des puits de potentiel acoustique. (C) Au cours du temps, on peut rassembler in-situ des gouttes de petite tailles, jusqu'à obtenir une assemblée de gouttes. Adapté de [113]

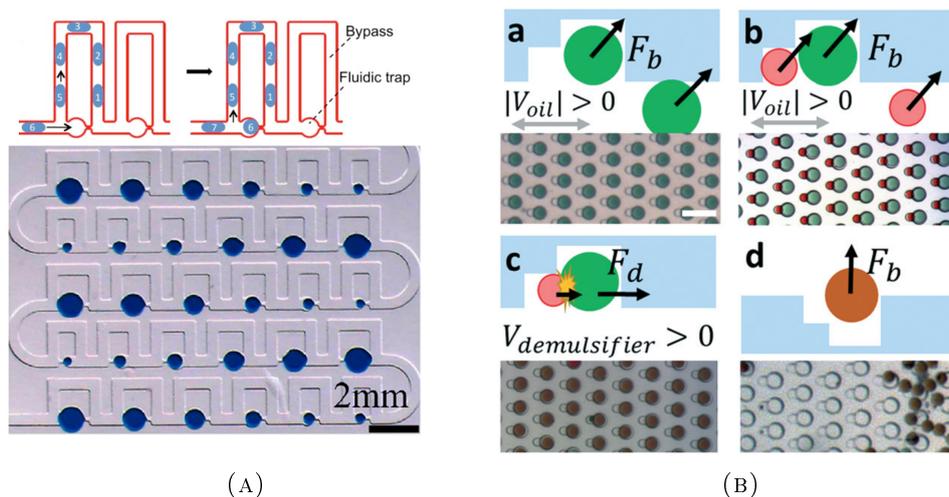


FIGURE 1.17: **Piégeage passif de gouttes microfluidiques.** (A) Montage à by-pass utilisé pour compartimenter des suspensions de cellules : les cellules sont introduites sous forme de suspension, et les gouttes sont formées in-situ, par cassage. Adapté de [120]. (B) Pièges gravitaires. a) Étant moins dense que la phase huile, les gouttes viennent occuper le piège principal. b) Une goutte secondaire de taille inférieure peut être piégée à son côté par le même processus. c) Ces gouttes peuvent être fusionnées, d) puis libérées de leur piège en renversant la puce. Adapté de [121].

que cette méthode de piégeage est non seulement réversible – retourner la puce libre des gouttes – mais permet aussi de piéger plusieurs gouttes côte à côte.

Pièges capillaires. Dans la Figure 1.15 de la partie précédente, on constatait que les gouttes suivaient le rail puis s'immobilisaient dans une encoche creusée dans le PDMS. Là encore, il s'agit pour la goutte de minimiser son énergie de surface en réduisant son aire. Sur la base des mêmes éléments de mécanique des fluides, il est donc possible d'immobiliser des gouttes microfluidiques dans des creux baptisés "pièges capillaires". Voyons comment fonctionne ce type de pièges et quelle géométrie choisir pour réaliser un piégeage efficace de la goutte, capable en particulier de résister à la force hydrodynamique produite par un éventuel flux de phase continue autour de la goutte [107, 124].

On considère une goutte écrasée de rayon R dans un canal microfluidique de hauteur H . On représente les différentes étapes de son entrée dans un piège capillaire sur la Figure 1.18. Lorsque la goutte est écrasée par les parois de la chambre, on peut évaluer ses différentes courbures : celle qui est dans le plan peut s'écrire $\pi/4R$, celle imposée en z par la faible hauteur du canal s'écrit $2/H$.

$$p_{squeezed\ drop} = p_0 + \frac{\pi}{4R} + \frac{2}{H} \quad (1.1)$$

A l'approche d'un piège, la goutte se déforme en rentrant dans le piège de largeur d et de hauteur ΔH , et acquiert une troisième courbure dans le plan xz notée $2/r$, que l'on montre Figure 1.18. La valeur de cette courbure est bornée, son maximum étant imposé par la largeur du puits, de sorte que $r > d/2$. Cette courbure est à multiplier par deux pour tenir compte de la déformation dans le plan yz non représenté. Dans la situation illustrée par la Figure 1.18B, les pressions de Laplace engendrées par ces courbures sont en compétition. Pour s'assurer de l'entrée de la goutte dans le piège, il suffit donc de prendre :

$$p_0 + \frac{\pi}{4R} + \frac{2}{H} > p_0 + \frac{2}{d_x} + \frac{2}{d_y} \quad (1.2)$$

Pour des gouttes suffisamment grosses - comprendre $R \gg H$ - la condition de piégeage irréversible s'écrit donc simplement $H < d/2$. Le fluide de la goutte vient alors spontanément remplir la zone de dépression au niveau du piège car il est énergétiquement plus rentable d'être confiné par la largeur du puits que par la hauteur de la chambre. Dans le cas de la Figure 1.18, on vérifie sur un cas concret la validité de cette condition, avec un ratio $d/2H$ de l'ordre de 2.

Pour terminer cette discussion sur l'immobilisation des gouttes, on se propose de comparer quelques technologies de piégeage microfluidique dans le Tableau 1.3.3. On y retrouve des méthodes actives, utilisant des écoulements de phase continue ou des ondes acoustiques, mais aussi des méthodes passives, dans lesquelles la géométrie de la puce est seule garante de l'immobilisation de la goutte. Il y apparaît par exemple que, malgré la grande diversité des méthodes de piégeages, ce sont les techniques de piégeages passives (gravité, capillarité) qui permettent d'obtenir les assemblées de gouttes les plus denses et les plus modulables.

Un mot de conclusion pour cette partie microfluidique. Nous savons à présent fabriquer des émulsions de microgouttes stables dans le temps en utilisant notamment des techniques de flow-focusig ou de step-emulsification en présence d'un surfactant fluoré. Ces gouttes peuvent être acheminées d'un point à l'autre de la puce microfluidique par un jeu de débits d'huile et de rails capillaires. Ces mêmes effets de tension

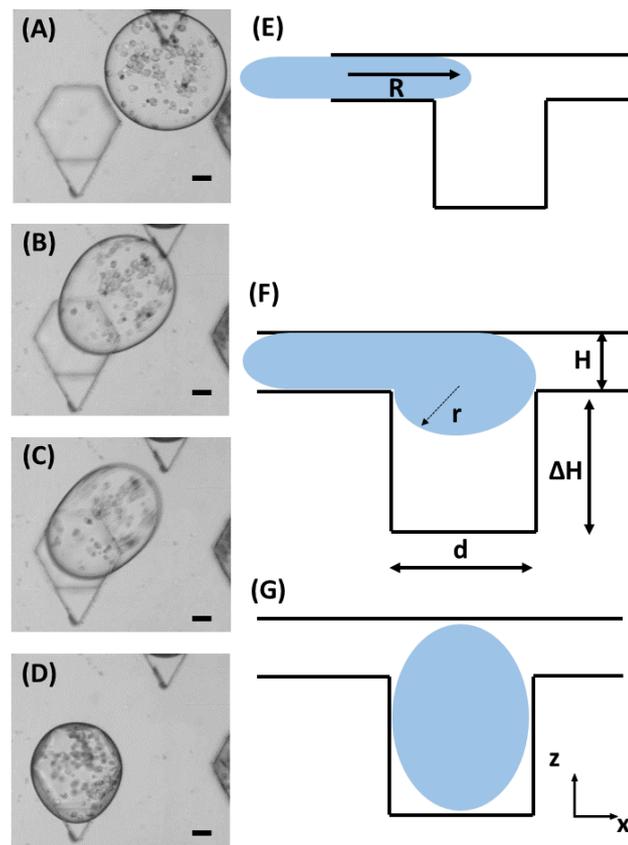


FIGURE 1.18: Piégeage efficace par un puits capillaire. (A-D) Microphotographies du piégeage d'une goutte de 50 nL, vu de haut. La barre d'échelle représente 200 μm . (E-G) Schéma du piégeage, vu en coupe. Dans le cas des photo, $H = 165 \mu\text{m}$, $\Delta H = 388 \mu\text{m}$, $d = 400 \mu\text{m}$.

de surface nous permettent de piéger les gouttes de façon quasi irréversible, dans des encoches pratiquées à même le PDMS. Avant de clore ce chapitre, nous allons introduire l'outil microfluidique le plus utilisé pendant cette thèse : il fait appel à toutes les techniques de manipulation de goutte que nous venons de voir, en y ajoutant une option de fusion contrôlée dont nous parlerons brièvement.

Source	Méthode	Diamètre Goutte	Densité de pièges du tableau	Application biologique
Babahosseini et al. Lab Chip,(2019)[112]	<i>Rés. à l'écoulement</i>	70-110µm	1 mm ⁻²	Formation contrôlée de mélanges cellulaires
Bithi et al. Sci Rep,(2017)[120]	<i>Montage à by-pass</i>	450 µm	60 cm ⁻²	Encapsulation de cellules tumorales
Boukellal et al. Lab Chip,(2009)[117]	<i>Montage à by-pass</i>	300 µm	90 cm ⁻²	Non
Chung et al. Lab Chip,(2017)[121]	<i>Gravité</i>	40 et 80µm	1152 pièges sur 1 cm ²	Non
Labanieh et al. Micromachines, (2015)[123]	<i>Gravité</i>	19-145 µm	8457-109,569 pièges sur 6 cm ²	Détection d'une enzyme fixée à une bille
Shi et al. Lab Chip, (2010)[122]	<i>Gravité</i>	1 mm	80 pièges sur 12 cm ²	Réponse de C.Elegans à une neurotoxine
Tian et al. Nat. Com. (2016)[113]	<i>Acoustique</i>	100 µm	Limited by transducer size.	suivi d'activité enzymatique
Zhang et al. RSC Adv. (2018)[119]	<i>Montage à by-pass</i>	200 µm	25 pièges sur 25 mm ²	non
Leung et al. PNAS (2011)[125]	<i>pressure driven</i>	200 µm	95 pièges sur 8 cm ²	culture de bactéries.
Huebner et al. Lab Chip (2009)[126]	<i>Rés. à l'écoulement</i>	30 µm	1500 sur 2 cm ²	Culture Bact et suivi enzymatique
Bai et al. Lab Chip (2009)[127]	<i>Rés. à l'écoulement</i>	30 µm	1500 paires sur 2 cm ²	Communication inter-goutte
Ruiter et al. Lab Chip (2014)[128]	<i>Electromouillage</i>	100 µm	24 sur 6 mm ²	Non

TABLE 1.2: Piéger des gouttes en grand nombre, un état de l'art.

1.4 Une plateforme microfluidique pour la culture de sphéroïdes

1.4.1 Géométrie et fluidique de la puce Double-pièges

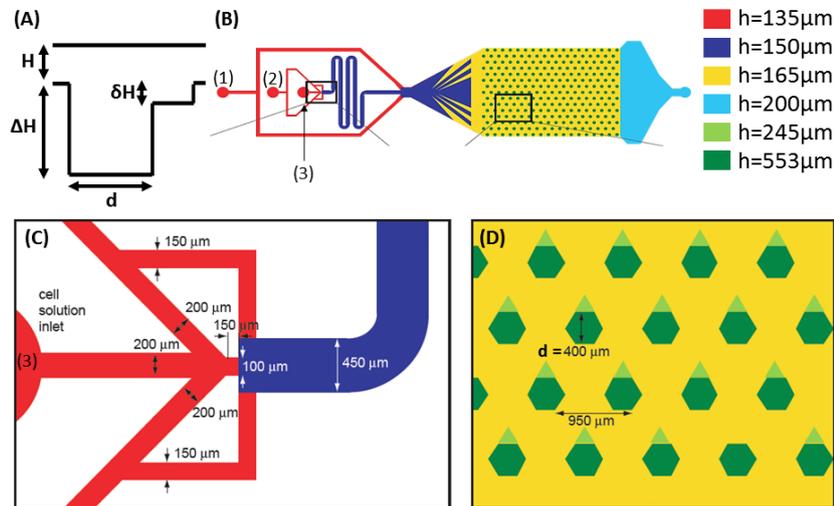


FIGURE 1.19: **Design de la puce microfluidique pour cultiver des sphéroïdes.** (A) Vue en coupe d'un piège capillaire. Les deux encoches permettent de piéger côte à côte des gouttes de tailles différentes. (B) Schéma de la puce, avec les hauteurs associées. (C) Zoom sur la zone de formation des gouttes : on combine ici le flow-focusing et la step-emulsification. (D) Zoom sur une partie de la chambre de culture : 252 double-pièges sont répartis sur 2.4 cm. Adapté de [129].

La plateforme microfluidique que nous allons utiliser dans les différents chapitres de cette thèse a été développée au sein de l'équipe, et a été extensivement décrite et utilisée dans les travaux de R.Tomasi et S.Sart [15, 130]. Elle combine tous les aspects de mécanique des fluides à petite échelle précédemment décrits. Les tailles typiques sont cependant supérieures à celles mises en jeu dans la plupart des plateformes microfluidiques prises en exemple : on voit d'ailleurs les gouttes les plus grosses à l'œil nu (voir <https://figshare.com/s/d921e5aba79941d36ccf>). Cela tient à une raison biologique : la culture de cellules mammaliennes demande une quantité suffisante de nutriments pour être durable dans le temps.

La puce est d'abord composée par ses trois entrées : deux pour la phase continue, notées (1) et (2) sur la Figure 1.19B, et une pour la phase à émulsifier notée (3). Ces entrées sont reliées à des canaux de largeur $200\mu\text{m}$, profonds de $135\mu\text{m}$, dans lesquels circulent des fluides à des vitesses typiques de quelques centimètres par seconde.

À la jonction entre les canaux d'huile et l'entrée aqueuse, les gouttes sont produites par la présence d'une marche de $15\mu\text{m}$, puis poussées par l'huile dans le serpentin (Figure 1.21). On notera que la génération des gouttes est en fait le fruit de la présence de la marche (*step emulsification*), mais aussi du flux d'huile, qui vient "couper" celui d'eau (*flow focusing*). Dans le serpentin, les gouttes finissent de se recouvrir de surfactant [131], puis sont projetées dans la chambre de culture, où la combinaison des chocs entre elles et des rails capillaires les répartissent latéralement de façon uniforme (Figure 1.22).

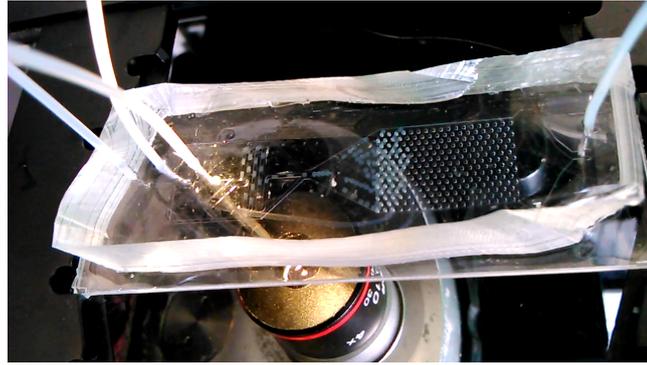


FIGURE 1.20: **Des gouttes visibles à l'oeil nu.** Photographie de la puce en cours de chargement microfluidique. Les gouttes contiennent des billes micrométriques pour une meilleure visualisation.

L'entrée dans cette chambre haute de $165\ \mu\text{m}$ est encouragée par une diminution du confinement des gouttes. Des rails de largeur croissante permettent de répartir ces gouttes sur toute la largeur de la chambre, selon le processus décrit dans la Section ???. La sortie de chambre est également $35\ \mu\text{m}$ plus haute que celle de la chambre, ce qui a pour double effet de favoriser la sortie des gouttes surnuméraires, mais aussi de diminuer la résistance hydrodynamique du montage microfluidique. L'écoulement d'huile aura moins tendance à s'accumuler dans la chambre en faisant gonfler le PDMS.

Dans la chambre se trouvent les pièges capillaires pour immobiliser les gouttes produites à la jonction. Ces pièges sont profonds de $\Delta H = 388\ \mu\text{m}$ et larges de $d = 400\ \mu\text{m}$. En arrivant dans ces puits, comme précédemment, les gouttes retrouvent une forme sphérique en se piégeant. Le piégeage est ici si fort qu'il résiste à des débits de phase continue jusqu'à $500\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$. On peut vérifier que le piégeage des gouttes est efficace en s'appuyant sur la section précédente. Pour des débits typiques, le rayon R de la goutte dans le plan de la chambre $330\ \mu\text{m}$ est grand devant la hauteur H du canal $165\ \mu\text{m}$. On vérifie donc la condition de piégeage capillaire efficace :

$$H < d/2 = 200\ \mu\text{m} \quad (1.3)$$

Sur chaque piège, il y a en fait deux profondeurs différentes (Figure 1.19A) : au niveau de l'hexagone principal, la goutte dispose de $388\ \mu\text{m}$, alors qu'au niveau du triangle secondaire, la hauteur δH est seulement de $80\ \mu\text{m}$. Cette configuration permet de réaliser deux piégeages différents, l'un fort, pour une grosse goutte, l'autre plus faible, pour une goutte plus petite.

Dans la Figure 1.23, on montre ainsi le résultat d'un double piégeage réussi : la première goutte, de $50\ \text{nL}$, contenant du PBS*, s'est enfoncée dans le piège principal. La seconde, de $10\ \text{nL}$, contient des billes en oxyde de fer et un colorant fluorescent, et s'est piégée en périphérie de la première.

On va à présent décrire l'éventail des techniques microfluidiques disponibles sur cette plateforme. La première d'entre elles concerne l'utilisation d'hydrogels biocompatibles, qui permet d'immobiliser complètement les échantillons encapsulés dans les gouttes. On cherche ensuite à mélanger efficacement les contenus de ces deux microgouttes piégées en contact l'une avec l'autre. Pour cela, il s'agit de déclencher de façon contrôlée la coalescence des paires de gouttes contenues dans les doubles-pièges capillaires.

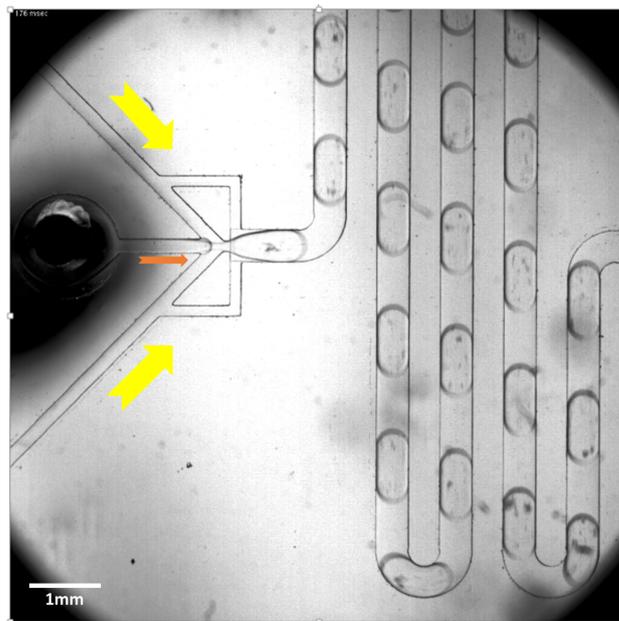


FIGURE 1.21: **Formation de la goutte et serpentin microfluidique.** Instantané de la formation successive de gouttes (50nL). Au niveau de la marche (au centre de la photo), une suspension de cellules (fibroblastes WI-38) est émulsionnée puis poussé par l'huile. Dans le serpentin, la goutte se recouvre de surfactant, diminuant sa tendance à coalescer dans le reste de la puce.

1.4.2 Gouttes de gels

Dans leur étude du sécrétome des lymphocytes T, Chokkalingam et al.[75] co-encapsulent une cellule unique et des billes fonctionnalisées anti-cytokine au sein d'une même goutte d'hydrogel. Ce compartiment solide est d'abord maintenu fermé, pendant que les cellules sécrètent et que les billes capturent des biomolécules. Après cette phase d'incubation, l'émulsion est cassée, c'est à dire que l'on remplace la phase huile par une phase aqueuse sur laquelle les gouttes sont "ouvertes". Cette phase aqueuse de remplacement sert d'abord de solution de lavage, pour éliminer les molécules sécrétées mais non-attachées aux billes, puis permet d'apporter des anticorps de détection fluorescents sous forme de solution. Les auteurs utilisent alors la microscopie pour imager chacune des cellules immunitaires, et font passer l'ensemble de la solution dans un cytomètre de flux pour analyser la fluorescence des billes immobilisées dans chacune des gouttes de gel.

Cet article résume parfaitement l'avantage d'utiliser des hydrogels dans les applications biologiques : les échantillons biologiques sont physiquement immobilisés, et donc facilement imagés en microscopie champ large [132]; la phase huile peut être retirée sans perdre l'intégrité de la goutte, ce qui permet de les envoyer en cytométrie, mais aussi de leur apporter des molécules par diffusion à travers les pores du gel [133]. Dans les travaux menés dans la plateforme R.Tomasi et S.Sart [15, 130], ce point est d'ailleurs utilisé pour renouveler le milieu de culture des cellules.

Dans les travaux de ce manuscrit, la phase aqueuse qui constitue les gouttes contient, lorsque c'est nécessaire, de l'agarose à basse température de fusion (entre 8 et 17°C), que l'on introduit sous forme liquide à une concentration de 0.9% sous un incubateur à 37°C, et que l'on peut gélifier par un passage au réfrigérateur à 4°C.

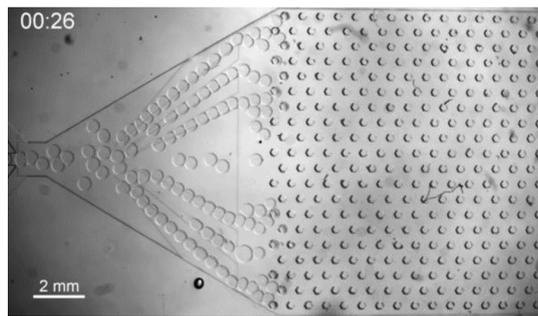


FIGURE 1.22: **Bousculade de l'entrée de chambre.** Les gouttes de 50 nL sont propulsées dans la chambre de culture par un débit de phase huile.

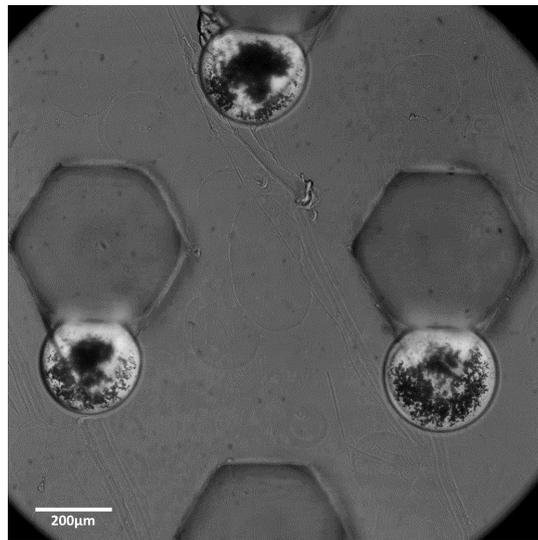


FIGURE 1.23: **Double piège.** Piégeage de deux gouttes de solutions aqueuses, la plus petite contient des billes et un anticorps fluorescent.

Dans la Figure 1.23, on pouvait ainsi s'étonner que les billes ne sédimentent pas davantage dans la goutte secondaire. C'est qu'elle contient de l'agarose, à 0.9%, que l'on a gélifiée dès la fin de l'étape de piégeage capillaire.

Notons finalement que l'utilisation du gel d'agarose est un choix parmi d'autres, beaucoup d'études préférant par exemple utiliser un gel biocompatible comme l'alginate pour réaliser leurs encapsulations à température ambiante [134, 135]. Là encore, le choix du gel est déterminé par ses propriétés physiques (rigidité, température de fusion, taille des pores) [136], sa compatibilité avec les cellules et les molécules présentes [137, 138], et ses propriétés de diffusion [69].

1.4.3 Provoquer la fusion de deux gouttes

On cherche maintenant à provoquer la coalescence de deux gouttes placées en contact dans les double-pièges présentés plus haut. Il s'agit donc de déstabiliser localement l'émulsion pour fusionner le contenu des deux gouttes, en vue de réaliser des réactions chimiques ou d'apporter des produits biologiques dans le micro-compartiment. En l'absence de perturbation, on a vu plus haut que la présence de surfactants compromet la probabilité de coalescence. Pour fusionner, il faut donc enlever localement ou totalement les molécules de surfactant de leur interface.

Laser. Toujours dans le système décrit plus tôt par la Figure 1.15, Fradet et al. [109] provoquent la fusion de deux micro-réacteurs en utilisant la chaleur d'un laser à infra-rouge. Au niveau de l'interface, la chaleur du spot de lumière induit la création d'un flux de surfactant loin du laser. Localement, la surface de la goutte est beaucoup plus sensible à la coalescence. Si une autre goutte se trouve en contact à ce moment là, elle fusionnera. Cette technique est extrêmement sélective : elle permet de décider précisément du moment et du lieu de la coalescence [139, 107]. Pour le cas d'études de réactions enzymatiques par exemple (comme celles que nous mènerons dans le Chapitre 2) cela permet de démarrer l'acquisition d'images dès le début des réactions chimiques [110].

En termes de limitations, on notera que le lieu de la coalescence est ponctuel : on ne peut fusionner qu'à l'endroit du spot laser, ce qui limite le nombre d'expériences réalisable. Plus grave, la chaleur induite par le laser peut dégrader l'échantillon biologique ou chimique présent dans la goutte.

Electrocoalescence. Pour fusionner simultanément un grand nombre de double gouttes, nous utiliserons parfois le phénomène d'électrocoalescence. En appliquant un champ électrique, on induit la polarisation du liquide à l'intérieur des gouttes (voir Figure 1.24A-C). En s'inspirant de l'étude de Karbaschi et al. [140], on utilise un pistolet anti-poussière commercial pour fusionner des gouttes, sous réserve qu'elles soient assez proches (Figure 1.24D-F).

Un nouveau problème apparaît cependant dans le cas de gouttes gélifiées comme celles vues au paragraphe précédent. L'électro-coalescence y apparaît difficile, voire aléatoire. La tension de surface n'est pourtant pas sensiblement modifiée par la présence d'agarose [141]. On peut proposer une explication mécanique de cette résistance à la coalescence, en considérant que pour coalescer, il y a nécessité d'une déformation élastique des interfaces, provoquée par le court laps de temps où le champ électrique est actif. Dans le cas d'un fluide, cette déformation est seulement relaxée par la viscosité. Dans le cas d'un gel comme l'agarose, il y a certes une viscosité supérieure ($\eta_{\text{agarose}} \approx 1000 \cdot \eta_{\text{eau}}$), mais aussi un module élastique ($E_{\text{agarose}} \approx 10^5 \text{ Pa}$). Le temps de relaxation de l'interface est donc

$$\tau \sim \frac{\eta}{E} \approx 10^{-5} \text{ s} \quad (1.4)$$

En comparaison, le temps de relaxation dans un liquide comme l'eau ($\eta = 0.001 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) apparaît beaucoup plus long. Pour le montrer, on propose de partir de l'équation de Navier-Stokes. Dans le cas d'un écoulement microfluidique, on peut écrire, en loi d'échelle, que la vitesse v se dissipe sur un temps caractéristique τ sur une longueur typique $l \sim R_{\text{goutte}}$, selon :

$$\rho \frac{v}{\tau} \sim \eta \frac{v}{l^2} \quad (1.5)$$

Soit :

$$\tau \sim \frac{\rho}{\eta} l^2 \approx 10^{-2} \text{ s} \quad (1.6)$$

En loi d'échelle, on montre ainsi qu'une déformation de la goutte s'estompe en mille fois moins de temps dans le cas d'un gel que dans un cas liquide. Les gouttes gélifiées ont donc une probabilité de coalescence très inférieures aux gouttes liquides. On cherche donc à imposer une condition favorable à la fusion sur une période de temps plus longue. Pour cela, on va jouer sur les surfactants qui protègent la goutte pour créer un effet de déstabilisation non-transitoire.

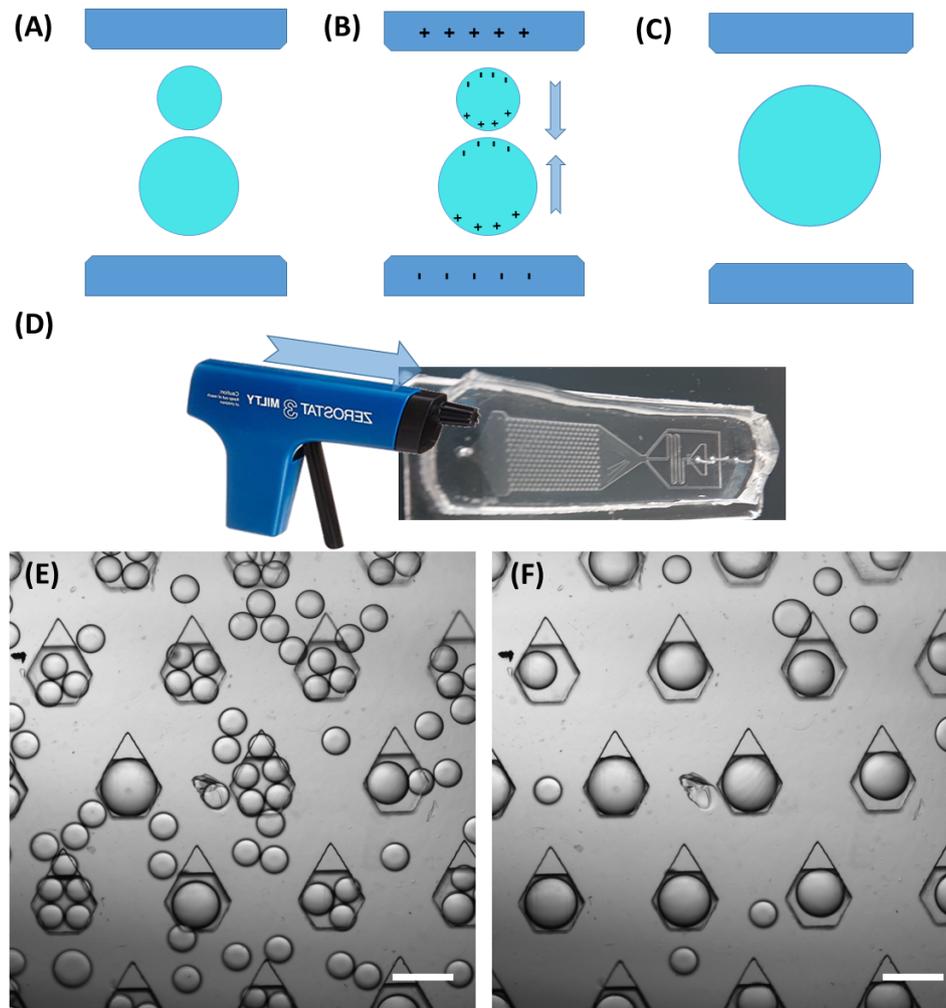


FIGURE 1.24: **Electrofusion de gouttes microfluidiques.** (A) Deux gouttes aqueuses protégées de la coalescence par des surfactants. (B) Lors de l'application d'un champ électrique, les gouttes se polarisent. (C) L'attraction électrostatique provoque la coalescence. (D) Protocole macroscopique d'électrofusion. (E-F) Images prises avant et juste après pression sur le pistolet électrostatique. La barre d'échelle représente $400\ \mu\text{m}$

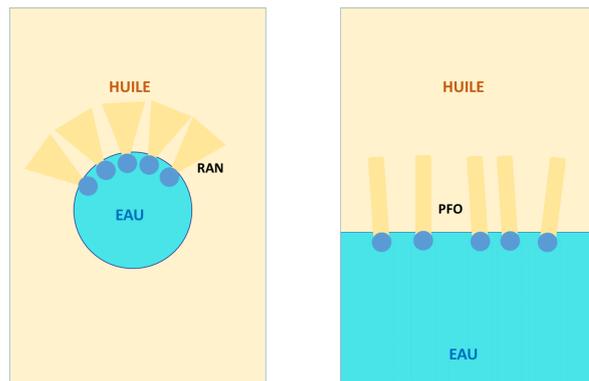


FIGURE 1.25: **Courbure spontanée de l'interface.** (A) La présence du surfactant induit une courbure naturelle de l'interface, favorisant l'existence des gouttes. (B) En comparaison, une molécule non-orientée comme le PFO ne donne pas de courbure à l'interface : le système tend donc vers un état biphasique non dispersé.

Inverser la courbure naturelle Dans la toute première partie de cette section, on a décrit les surfactants comme des molécules qui abaissent l'énergie de surface des gouttes. Dans notre protocole de fusion, on se débarrasse du surfactant RAN, et on le remplace par une petite molécule amphiphile, le perfluoro-octanol (PFO). A la différence des deux autres méthodes, cette technique de fusion par ajout de PFO ne permet de contrôler précisément le moment de la fusion : on voit d'ailleurs qu'au sein d'une même puce parcourue par un flux de PFO, les événements de fusion paraissent aléatoires (<https://figshare.com/s/68d5cf75545fb972d5e1>).

Pour essayer de comprendre le phénomène, on peut s'appuyer sur la littérature des émulsions [142]. Considérons, comme le font Kalbanov et al. [143] que les surfactants sont des molécules orientées en formes de trapèzes. Ces surfactants sont associés à une courbure dite "spontanée", liée à la géométrie de la molécule. Dans la vision de Kalbanov et al., c'est l'écart entre cette courbure spontanée et les courbures effectives de la goutte qui est source de stabilité ou d'instabilité de l'émulsion. Pour illustration, on voit sur la Figure 1.25A, que le surfactant favorise une courbure naturelle concave qui favorise l'existence de l'émulsion eau-dans huile. C'est sans doute ce qu'il se passe dans le cas d'un surfactant copolymère à double-chaine comme le RAN utilisé dans nos émulsions.

On remplace le RAN par une molécule qui n'a pas d'orientation spécifique vers l'une ou l'autre des phases liquides. Au cours de ce remplacement, la courbure naturelle de l'interface tend petit à petit vers zéro. On voit parfois la zone de contact entre les gouttes s'aplatir quelques instants avant la fusion. Il y a donc un double effet : d'une part la conformation énergétiquement stable n'est plus celle de l'interface courbée et donc de la goutte - et d'autre part, l'aplatissement de l'interface augmente la probabilité de coalescence.

Le protocole de fusion par changement de surfactant est celui que l'on utilisera majoritairement dans les chapitres à venir, permettant de provoquer une vague massive de fusion en une minute de temps. Se posera, Chapitre 3, la question de sa biocompatibilité. Nous ferons abstraction de son influence possible sur les cinétiques de réaction, qui n'a été rapportée que pour des réactions fines de PCR [140].

Bilan

Dans ce premier chapitre, nous avons présenté tous les acteurs de cette thèse : les cytokines d'abord, qui régissent les communications entre cellules, et contribuent ainsi aux réponses collectives des tissus. IL-1 β est ainsi le marqueur d'une réponse inflammatoire globale de l'organisme, et déclenche une cascade d'autres mécanismes de sécrétion en vue de protéger les tissus voisins. De même, le VEGF permet le recrutement à distance des cellules endothéliales pour favoriser la création de nouveaux vaisseaux sanguins.

La caractérisation des protéines sécrétées de façon individuelle par les cellules est donc de première importance pour comprendre le lien entre leur phénotype et leur comportement sécrétoire. Plusieurs technologies, en particulier microfluidiques, ont avancé des stratégies à haut débit, sensibles, spécifiques, et parfois multiplexées pour quantifier les sécrétions de cellules individuelles n'ayant pas besoin d'un support physique pour survivre.

Dans la suite de ce manuscrit, nous allons d'abord chercher à développer des tests immunologiques basés sur l'utilisation des anticorps, et ce, dans la géométrie microfluidique présentée à l'instant. Cette géométrie permet de fabriquer des gouttes de taille intermédiaire, puis de les diriger, et de les immobiliser dans des pièges qui minimisent leur énergie de surface. Par le jeu de la fusion de goutte et des hydrogels biocompatibles, il est possible d'amener successivement de nouveaux éléments dans la goutte sans sacrifier son isolation propre.

Cette puce a permis la culture, en grand nombre, de plusieurs types de cellules eucaryotes ayant normalement besoin d'un substrat auquel adhérer pour survivre. On s'attardera sur ce type de culture en ouverture du Chapitre 3. En combinant notre test immunologique avec les capacités de cette plateforme microfluidique, on souhaite développer un test d'un type nouveau, qui quantifie le sécrétome à l'échelle du sphéroïde unique plutôt que de la cellule unique.

Chapitre 2

Détection et quantification de cytokine humaine

Ad augusta per angusta

Proverbe Latin

Au cours de cette thèse, nous avons exploré plusieurs pistes pour mesurer des cytokines en microfluidique dans une géométrie adaptée à la culture de sphéroïdes 3D. Ce chapitre condense cette exploration, qui nous a amenés à notre protocole final de mesure de sécrétion sur des billes micrométriques. Chemin faisant, nous allons expliciter toutes les techniques de microscopie de fluorescence, d'analyse d'image, et de fluidique qui nous seront nécessaires pour les mesures effectuées en présence de cellules.

On s'attache d'abord à développer une phase solide dispersée - des billes - capable de capturer des cytokines en solution. Avec ces billes, dont on vérifie la réactivité par des immuno-essais, on met en place successivement deux tests de quantification des cytokines sur la puce microfluidique décrite au chapitre précédent. L'un utilise une amplification enzymatique, l'autre des anticorps rapporteurs fluorescents. Leurs caractéristiques cinétiques et leurs sensibilités respectives seront étudiées, de façon à pouvoir, dans le chapitre suivant, rajouter sereinement l'aléa biologique à notre montage expérimental.

2.1 Fonctionnalisation de billes micrométriques

On souhaite adapter notre plateforme microfluidique pour pouvoir lire les sécrétions d'agrégats 3D, en se laissant la liberté de changer à tout moment l'antigène cible, pour analyser une autre cytokine, ou un autre marqueur sécrété. Il ne s'agit donc pas de développer des brins d'ADN ou des paires de FRET* par trop spécifiques pour nos dosages, mais bien de s'appuyer sur des réactifs du commerce, en particulier sur des anticorps éprouvés. S'ajoute à cela la volonté de développer un test biocompatible, en vue de détecter la production d'antigènes ou de cellules uniques directement dans les gouttes de test. On se propose dans un premier temps de montrer que l'on peut produire, en quelques heures, de grandes quantités de billes micrométriques fonctionnalisées, et de tester de façon robuste leur capacité à attraper des biomolécules.

2.1.1 Greffage d'anticorps

Il existe plusieurs stratégies pour fixer un peptide, qu'il soit anticorps ou simple protéine, sur une surface physique [144, 145]. Cette fonctionnalisation passe systématiquement par une étape d'activation de la surface, en milieu acide ou basique, et en

présence d'un réactif type carbodiimide, pour obtenir un intermédiaire réactionnel de haute énergie [146, 147, 148]. Cet état de transition étant par nature peu stable, il peut être stabilisé par l'ajout d'un réactif secondaire comme le N-hydroxysuccinimide (NHS) pour rallonger la durée de vie de l'intermédiaire réactionnel. L'ajout final du peptide à fixer fait retomber la surface à un état d'énergie plus stable, et il ne reste alors qu'à revenir aux conditions de pH et de salinité compatibles avec une bonne conservation des propriétés de ce peptide. Dans le cadre de cette thèse, nous avons développé deux protocoles de fonctionnalisation sur des billes de polystyrène, l'un inspiré de la littérature classique, avec utilisation d'activateur chimique, l'autre moins représenté, reposant sur l'adsorption de protéines sur des surfaces en polystyrène.

- **Méthode dite "par activation chimique"**. Des billes en polystyrène 2.88 μm et 0.5 μm (Bang Laboratories Inc., IN 46038, USA) sont d'abord lavées avec une solution tampon carbonate (0.1M, pH 9.6), puis à l'Activation Buffer (Ademtech, 33600 Pessac, France, pH 5.5), avant d'être redispersées dans ce même buffer d'activation additionné d'une solution fraîche de Carbodiimide EDC à 2%. Pour la préparation classique d'un lot de billes, on utilise 1mg de billes. Après quinze à vingt minutes d'incubation à température ambiante, les billes sont débarrassées de l'excès d'EDC, puis mises en contact avec une solution d'anticorps de capture anti-IL1 β monoclonal (50 μL à 480 $\mu\text{g}/\text{mL}$ soit 24 μg) dans du tampon borate. Après une nuit d'incubation sous agitation douce à température ambiante, les billes sont lavées et leurs sites encore actifs bloqués par une solution de glycine (10mg/mL) dans le tampon borate. En fin de réaction, les billes sont stockées dans une solution tampon phosphate contenant 1% glycine, 0.1% d'azide de sodium et 5% de glycerol.

Il existe une seconde manière d'immobiliser des anticorps sur des microsphères, qui n'utilise pas de réactif chimique permettant la formation d'une liaison covalente. Dans les conditions idoines de salinité et de pH, l'adsorption des protéines se fait spontanément, grâce aux forces de Van der Waals qui permettent la fixation des protéines sur la surface également hydrophobe du polymère [149]. Cette fixation est conservée dans des conditions d'utilisation classiques d'immuno-essais, bien qu'étant influencée par le matériau de la bille, les protéines en solution, et les éventuels sels de lavages [150, 151]. Du reste, il faut davantage de temps pour atteindre l'encombrement maximal des surfaces par la protéine à fixer. Les divers protocoles rapportés par la littérature conseillent une nuit d'incubation sous agitation douce, à température ambiante ou au réfrigérateur.

- **Méthode dite "par adsorption"**. Les mêmes billes sont lavées à trois reprises avec un tampon borate (pH=10), qui active la surface des billes, avant d'être mises en incubation avec l'anticorps de capture anti-IL-1 β pour la durée d'une nuit sous agitation douce. Les billes sont ensuite incubées trois fois trente minutes avec une solution de glycine 10mg/mL dans tampon borate pour bloquer les sites actifs restants, puis stockées dans le storage buffer précédemment décrit.

En fonction de la voie d'immobilisation choisie, la question est à présent de s'assurer de la présence d'anticorps sur nos billes, et de leur capacité à capturer leur antigène-cible.

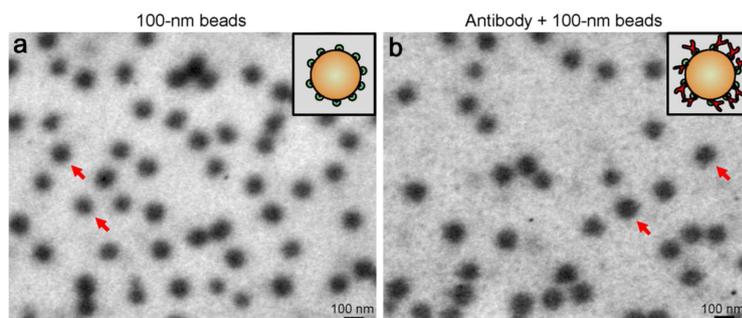


FIGURE 2.1: **Cherchez l'Anticorps.** Des nano-billes de 100nm sont observées au microscope électronique. L'analyse d'image seule permet de distinguer un échantillon nu d'un échantillon avec anticorps surfacique. Tiré de [152]

2.1.2 Tester la fonctionnalisation

Les schémas de la littérature qui représentent des billes hérissées d'anticorps sont hors d'échelle [153]. Il est impossible d'observer directement une molécule d'anticorps en microscopie classique, et même les techniques non-optiques restent peu convaincantes : Okada et Ogura [152] sont ainsi forcés de faire appel à la microscopie électronique combinée à une analyse d'image des plus précises pour distinguer des billes couvertes d'anticorps de billes nues (voir Figure 2.1). Il nous faut donc trouver des moyens détournés pour s'assurer de la présence d'anticorps sur nos billes micrométriques, en se reposant sur des techniques macroscopiques de biochimie, et des immuno-essais.

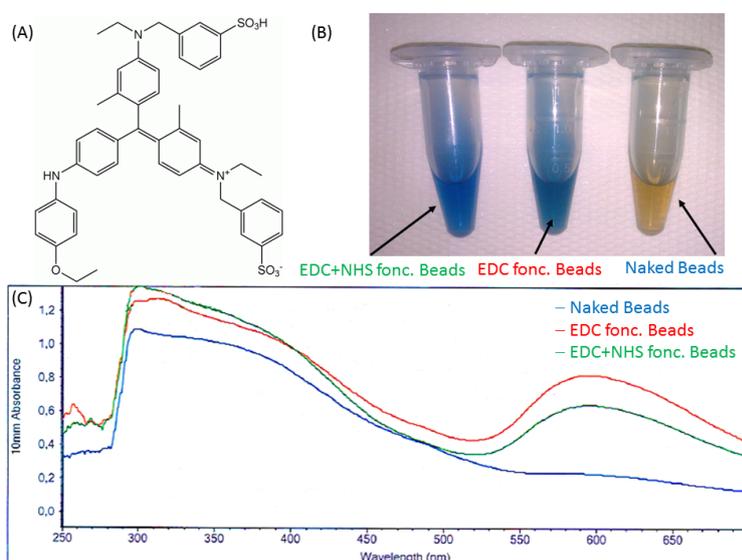


FIGURE 2.2: **Detecter la présence de protéine à la surface de billes fonctionnalisées.** (A) Le réactif de Bradford, véritable cage-ligand pour acides aminés basiques, change de longueur d'onde d'absorption lorsque qu'il complexe un peptide. (B) Résultat macroscopique d'un test de Bradford sur trois suspensions de billes, les deux premières ayant subi des protocoles de fonctionnalisation différents. (C) Mesure d'absorbance à 595 nm : on constate l'apparition d'un pic d'absorbance pour les suspensions de billes ayant subi un protocole de fonctionnalisation. L'utilisation du NHS pour stabiliser l'intermédiaire réactionnel n'améliore pas sensiblement le signal protéique.

Le premier test proposé vise simplement à prouver l'existence d'une couche de

protéines autour de la bille, en utilisant la méthode de Bradford (Figure 2.2). Cette méthode colorimétrique permet de détecter la présence de protéines en solution, en mesurant l'absorption de la solution d'intérêt dans le rouge, après addition d'un composé chélatant, bleu de Coomassie, qui change de couleur lorsqu'il complexe certains acides aminés communs (arginine, histidine, lysine) [154]. En utilisant cette technique sur des suspensions de billes, il devient possible, "à l'oeil" et sans attendre les résultats d'une incubation plus longue, de savoir que la réaction de fonctionnalisation a permis de fixer des protéines sur les billes.

Reste alors à établir que ces protéines sont des anticorps, et de surcroît, des anticorps qui ont conservé leur capacité à capturer des antigènes. Pour ce faire, on se propose de suivre le principe d'un test immuno-enzymatique sur support solide ELISA. Ce type de test, développé au début des années soixante-dix, se propose de détecter voire de quantifier la présence d'une molécule cible à l'aide de deux anticorps qui lui sont spécifiques : l'anticorps dit "de capture" immobilise l'antigène sur un support solide, l'autre, dit "de détection", vient marquer cet antigène d'une enzyme. Après plusieurs étapes de lavage qui doivent débarrasser le support de toutes les molécules non-spécifiques à l'antigène, on quantifie la présence de cette enzyme par l'ajout d'un substrat qui se colore lors de sa dégradation.

Dans le cas qui nous intéresse, ce n'est pas la présence de l'antigène qui est testée mais celle de l'anticorps de capture. On met donc en contact nos billes, fonctionnalisées ou pas, avec des concentrations croissantes d'antigène d'intérêt, ici IL-1 β . Après une étape de lavage pour se débarrasser des antigènes libres, on rajoute un anticorps de détection spécifique à IL-1 β , dont l'excès est également lavé, puis une enzyme qui vient se fixer sur ce deuxième anticorps. La conversion d'un substrat par l'enzyme génère des molécules colorées ou fluorescentes : leur quantité est proportionnelle à celle de l'enzyme, et donc à la concentration initiale d'antigènes mis en contact avec les billes (Figure 2.4A).

On réalise ce type d'immuno-essai sur deux lots de billes, ayant subi le même protocole de fonctionnalisation par voie chimique - mais en remplaçant la solution d'anticorps par du PBS dans l'un des lots. La mesure de la coloration par un spectrophotomètre permet par exemple de distinguer immédiatement des billes fonctionnalisées de billes nues (Figure 2.4B).

Au-delà de cela, ces immuno-essais permettent de comparer les méthodes de fonctionnalisation entre elles : sur la Figure 2.4C, on mesure l'absorbance de la solution en fin d'ELISA sur différentes suspensions de billes, fonctionnalisées "passivement" ou par activation chimique. On constate que, à taille de bille donnée, la méthode de binding par adsorption apparaît plus efficace que la voie chimique avec activation par l'EDC. Ce constat surprenant - et répétable - peut s'expliquer de plusieurs manières. D'une part, il peut y avoir une dégradation de la protéine lors de l'étape d'activation chimique. Le carbodiimide est en effet une espèce hautement réactive, il peut réaliser des couplages covalents entre anticorps, dénaturant leur aptitude à capturer leur antigène [155]. L'autre explication possible est géométrique : dans le cas de fonctionnalisations par adsorption, Wiseman et al. [156] ont montré que les anticorps forment une monocouche compacte à la surface de la bille, et qu'en présence d'un large excès de ligand, ces anticorps s'orientent verticalement, partie spécifique vers le haut (voir Figure 2.3). Ils précisent eux aussi que cette adsorption est irréversible. Dans cette optique, les ligands de nos billes fonctionnalisées par adsorption sont peut-être simplement organisés de façon plus compacte, mieux orientée, comparés à ceux liés de façon covalente aux sites actifs répartis aléatoirement sur la bille.

Pour terminer cette partie de tests immunologiques hors puce microfluidique, on se propose de tester nos billes fonctionnalisées sur une large gamme de concentrations

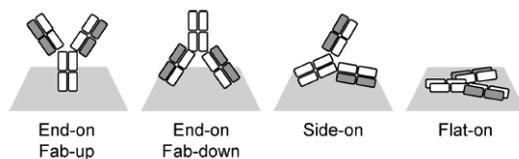


FIGURE 2.3: **Orientations d'anticorps.** Tiré de Wiseman et al. [156]

en IL-1 β (Figure 2.4D). En vue de transférer un tel test sur notre plateforme, il est nécessaire de pouvoir quantifier le signal final donné par l'enzyme à la solution contenant les billes. Or il n'est pas possible d'effectuer des mesures colorimétriques sur un microscope classique. On utilise donc un substrat qui donne un signal de fluorescence lorsqu'il est converti par l'enzyme (QuantaRedTM, 15159, Thermo Scientific).

Sur la Figure 2.4D, on observe ainsi que la solution de billes devient d'autant plus fluorescente que la quantité d'IL-1 β est importante. En termes de concentration, notre test "sur billes" est capable de discriminer, dans un volume de 100 μ L, des concentrations allant de 50 à 10.000pg/mL. Il n'est malheureusement pas possible de disposer de solutions d'IL-1 β dont la concentration excède 100.000pg/mL, faute de solubilité dans le le tampon aqueux utilisé. Nonobstant cette limitation, les valeurs classiques de concentration dans les surnageants de culture se retrouvent plutôt autour de 1.000pg/mL [157], rendant notre test pertinent pour la biologie.

2.2 Test ELISA dans des puces microfluidiques

2.2.1 Suivi d'une réaction enzymatique

Du fait de la grande robustesse de ces tests ELISA sur billes fonctionnalisées, on se propose de miniaturiser et de paralléliser ce type de test dans la puce microfluidique présentée Chapitre 1. Il s'agit ici de distinguer des concentrations croissantes d'IL-1 β introduites dans des gouttes microfluidiques en prenant comme observable la coloration d'un substrat chemifluorescent par une enzyme reliée à la protéine d'intérêt via des anticorps. Dans cette partie, on se propose de présenter une première stratégie de parallélisation des tests immunologiques. On s'attachera à évaluer le degré de sensibilité de notre montage, et à en trouver les limites.

Il s'agit ici de réaliser la miniaturisation de nos tests ELISA sur billes, en passant d'une expérience en tube, qui comprend des volumes de plusieurs dizaines de microlitres, à une expérience en gouttelettes microfluidiques de quelques dizaines de nanolitres. Sur le schéma de la Figure 2.5, on rappelle le principe de nos tests ELISA sur billes : l'antigène IL-1 β vient se fixer sur nos billes fonctionnalisées, puis l'on introduit un anticorps 'secondaire' anti-IL-1 β couplé à l'enzyme Horse Raddish Péroxydase (HRP). Cette enzyme fixée au complexe immunitaire, permet de convertir un substrat chimique, le 10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP, ou Amplex[®]Red), en un composé bi-radicalaire, la résorufine, qui émet une fluorescence dans le rouge ($\lambda_{em} = 570$ nm).

Activité enzymatique dans une goutte

On part d'un constat expérimental : si l'on laisse un temps suffisant à l'enzyme HRP fixée au complexe immunitaire, la solution de bille se colore jusqu'à une valeur plateau, qui correspond à l'épuisement du substrat enzymatique. Dans le test ELISA classique, l'expérimentateur vient rajouter une solution dite "Stop" dans le milieu réactionnel,

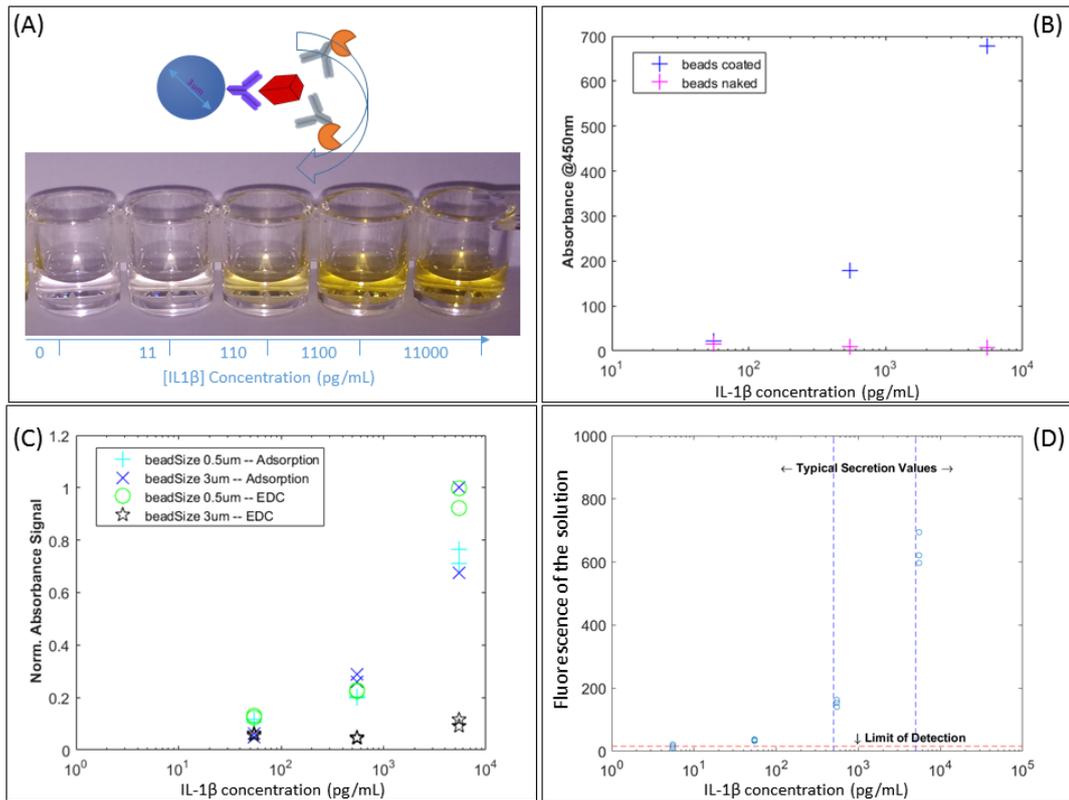


FIGURE 2.4: Des "ELISA sur billes" pour vérifier leur fonctionnalisation.

(A) En haut : Schéma de principe de l'ELISA sur bille, et photographie de surnageants après test ELISA sur bille sur une gamme connue de concentration en IL-1 β . (B) Absorbance à 450 nm mesurée dans le surnageant après ELISA en fonction de la concentration d'IL-1 β mise en contact des billes. Les billes 'Contrôle négatif' ne réagissent pas à l'ELISA. (C) Idem, l'absorbance est normalisée par le signal maximum observé au jour de l'expérience. Comparaison des méthodes d'immobilisation, et effet de la taille des billes. N=2 réplicats biologiques par condition. (D) Fluorescence mesurée dans le surnageant en fin d'immuno-essai en fonction de la concentration initiale d'IL-1 β , effectué sur des billes de 3.0 μ m fonctionnalisées par le protocole d'adsorption. n=3 réplicats techniques par condition de concentration.

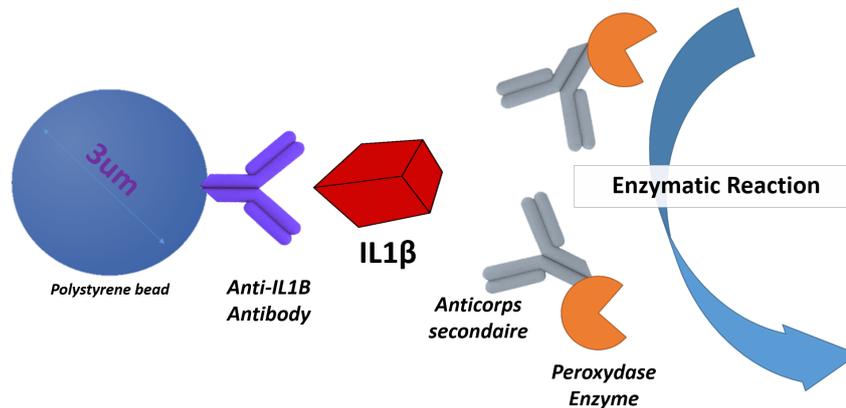


FIGURE 2.5: **Complexe immun sur bille avec amplification enzymatique.**

qui contient un acide fort pour dénaturer définitivement l'enzyme. Il compare alors les valeurs de fluorescence atteintes par le système, qui dépendent de la concentration de l'antigène. Pour résumer, c'est donc la **cinétique** de conversion du substrat qui est modifiée par la concentration initiale d'antigène, et non l'état final. Dans un test microfluidique biocompatible, cette étape de dénaturation est à proscrire. Pour distinguer des concentrations en IL-1 β , il s'agira donc d'observer, au cours du temps, la coloration de nos gouttes à doser dès l'addition du substrat.

On utilise la puce double-pièges décrite plus haut pour encapsuler des concentrations croissantes de l'enzyme HRP seule, dans des gouttes de 50 nL, auxquelles on vient additionner, par fusion, une quantité fixée de substrat noté QR (QuantaRed[®]) contenu dans une goutte de 10 nL. Dès le déclenchement de la fusion, on image plusieurs pièges, à intervalle d'une image toutes les 20 secondes, sous un microscope à épifluorescence (Figure 2.6). On observe une augmentation progressive de la fluorescence dans la goutte fusionnée.

Pour isoler et lire la fluorescence à l'intérieur de la goutte fusionnée, on utilise le package d'analyse d'image de Matlab[®]. On crée un masque excluant les alentours de la goutte, et l'on calcule l'intensité moyenne de fluorescence de la surface correspondant à la goutte. Sur la Figure 2.7A, on représente ainsi quelques évolutions de la fluorescence, mesurées sur des puces séparées contenant différentes concentrations d'enzyme. Pour une dilution au 1/40^e, le plateau de fluorescence est atteint en 2 min, alors que pour une dilution au 1/4000^e, il faut 2.7 h. A plus basses dilutions, nous ne sommes pas parvenu à atteindre une valeur de fluorescence comparable aux autres sur le temps de l'expérience. En somme on constate, de façon attendue, que plus la concentration d'enzyme est importante, plus la coloration est rapide.

On résume cette tendance sur la Figure 2.7B, dans laquelle on représente, en fonction de la concentration d'HRP, la valeur de la pente initiale du signal de fluorescence mesurée lors de la coloration. Les premiers points, qui correspondent à des concentrations élevées d'enzyme - et donc à des vitesses de coloration élevées - doivent être considérés avec prudence : les mesures sont teintées d'incertitude, car l'algorithme de calcul des pentes commence à prendre en compte les points du plateau de fluorescence. Pour les autres, il apparaît, en échelle log-log, qu'il existe une dépendance affine de pente 10⁻² entre la vitesse initiale de coloration de la goutte et le facteur de dilution de l'enzyme. On pourra discuter de cette tendance dans la partie suivante.

Par cette série d'expériences, on met en évidence que, sur trois décades de concentration en enzyme, la réponse cinétique de l'enzyme est mesurable par microscopie, sur des temps caractéristiques raisonnables. A très haute concentration, c'est le temps

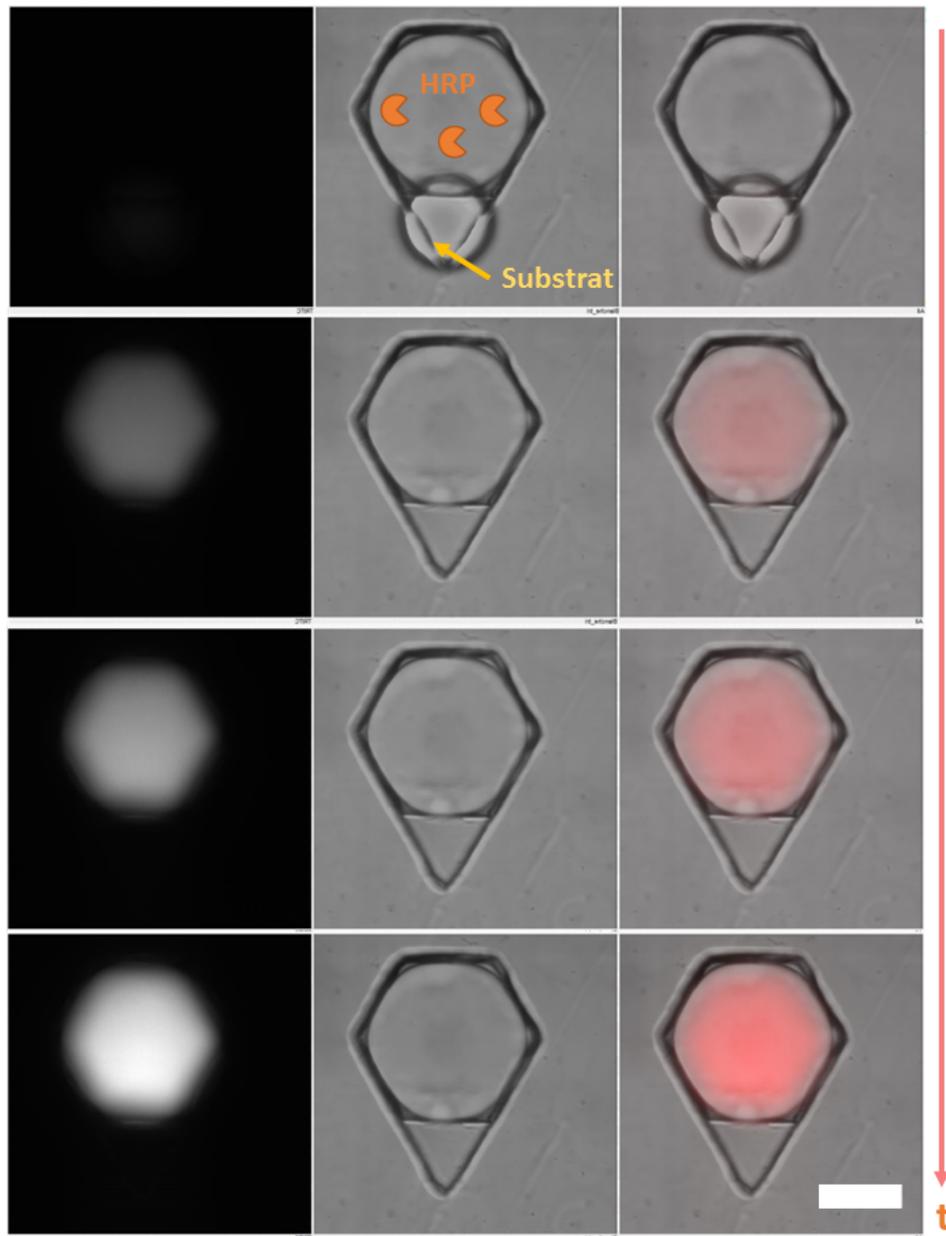
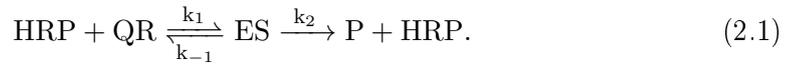


FIGURE 2.6: **Suivre la coloration de l'ELISA sur puce.** Microphotographie d'un piège avant fusion, puis à 20 minutes, 1 heure, 5 heure après fusion. Image composite (droite), en lumière blanche (milieu), et de fluorescence (gauche). HRP diluée au $1/4000^e$. Barre d'échelle 200 μm .

de réponse du microscope qui est limitant, et les pentes calculées sur nos courbes prennent en compte les points du plateau de fluorescence.

Approche de la cinétique chimique Mickaelienne

Un mot d'interprétation théorique pour comprendre ces derniers résultats. Dans l'expérience considérée, on s'intéresse à la formation du produit fluorescent P de réaction enzymatique entre l'enzyme HRP et le substrat chémiluminescent noté QR . On attribue directement la coloration du milieu réactionnel à la formation de P . Nous considérons que l'enzyme HRP n'est pas dégradée au cours de la réaction, ce qui est sans doute une bonne approximation compte tenu des temps de réaction imaginés. La réaction enzymatique suit l'équation :



Du reste, on suppose que la réaction de formation de P à partir de l'intermédiaire réactionnel formé par l'enzyme et le substrat (ES) est très rapide, de sorte qu'un régime quasi-statique permette d'écrire : $\frac{\partial[ES]}{\partial t} = 0$. La formation de ES pouvant également s'exprimer

$$\frac{\partial[ES]}{\partial t} = k_1[HRP][QR] - k_{-1}[ES] - k_2[ES]. \quad (2.2)$$

On obtient une expression de la concentration instantanée du complexe enzyme substrat sous la forme :

$$[ES] = \frac{k_1[HRP][QR]}{k_{-1} + k_2}. \quad (2.3)$$

On peut utiliser les équations de conservation pour l'enzyme et le substrat, et faire alors l'hypothèse d'un large excès de substrat par rapport à l'enzyme : c'est donc la quantité initiale de HRP qui limite la formation du complexe ES , ce qui revient à dire que :

$$\begin{cases} [QR]_0 \gg [HRP]_0 \\ [QR](t) \approx [QR]_0 \end{cases} \quad (2.4)$$

On peut alors donner la forme de la vitesse de coloration aux premiers instants, en fonction de la concentration des réactifs et de la constante $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$:

$$\boxed{\frac{\partial[P]}{\partial t} = k_2 \cdot \frac{[HRP]_0 \cdot [QR]_0}{K_m + [QR]_0}} \quad (2.5)$$

Deux grands comportements peuvent ainsi être dégagés :

$$\begin{cases} [QR] \gg K_m \Rightarrow \frac{\partial[P]}{\partial t} \propto k_2 \cdot [HRP] \\ [QR] \ll K_m \Rightarrow \frac{\partial[P]}{\partial t} \propto k_2 [HRP] * [QR] / K_m \end{cases}$$

Quand la concentration du substrat QR est grande par rapport au ratio K_m de l'enzyme, on s'attend à une vitesse de conversion enzymatique qui dépend *linéairement* de la concentration en enzyme $[HRP]$. Ayant observé cette dépendance linéaire, cette hypothèse de fort excès de QR semble vérifiée dans le cadre de nos expériences.

En revanche dans le cas contraire, cette vitesse devient dépendante des concentrations de chaque réactif présent. Dans l'expérience décrite plus haut, la pente mesurée à haute concentration en HRP est plus faible que prévue par la théorie, et nous avons

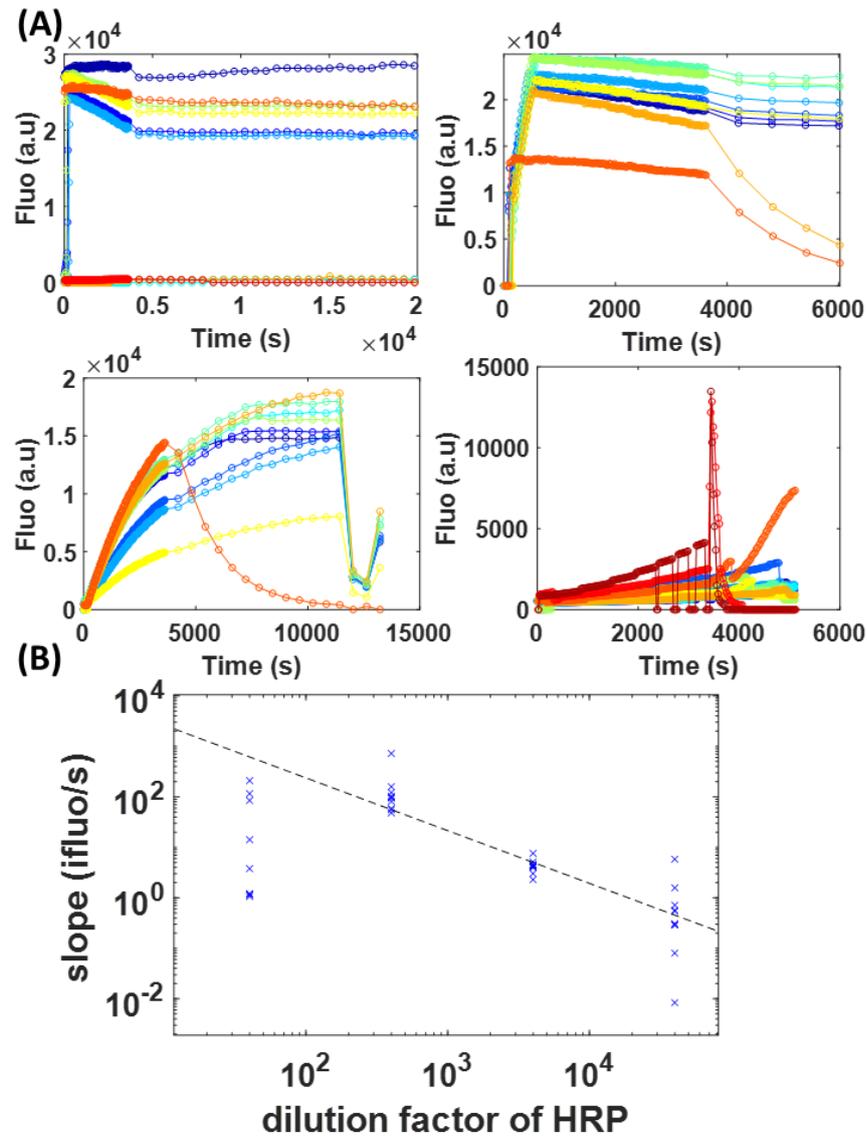


FIGURE 2.7: **Quantifier la coloration de l'ELISA sur puce.** (A) Evolution temporelle de la fluorescence après la fusion de gouttes contenant des concentrations croissantes d'enzyme avec des gouttes de substrat à concentration fixée. Chaque courbe représente un puits, $N > 10$ puits par condition. L'effondrement de la fluorescence à temps long est dû au blanchiment des fluorophores lorsque le microscope ne ferme pas son shutter. (B) Mesure de la pente à l'origine en fonction de la concentration d'enzyme. Ces pentes sont calculées de deux façons convergentes, l'une par un fit linéaire sur une fenêtre temporelle de taille variable, l'autre par un calcul différentiel. La ligne en pointillés a une pente α pour équation $y = 28641x^{1.04}$ cohérente avec la prévision théorique. Chaque point représente un puits, $N > 10$ puits par condition.

attribué cela à un problème de cadence de l'imagerie : rien ne prouve cependant qu'à de telles concentrations nous soyons encore dans le régime linéaire.

Avant de passer à des mesures ELISA complètes, on propose une dernière courbe qui tend à vérifier que nous sommes bien dans un régime où la pente de coloration est indépendante de la quantité initiale de substrat. La Figure 2.8 représente ainsi l'évolution de la pente en fonction de la quantité de substrat amenée dans la goutte principale (via la mesure de l'aire de la goutte secondaire). Il n'apparaît pas de tendance significative, et encore moins d'augmentation linéaire de cette pente avec la taille de la goutte secondaire.

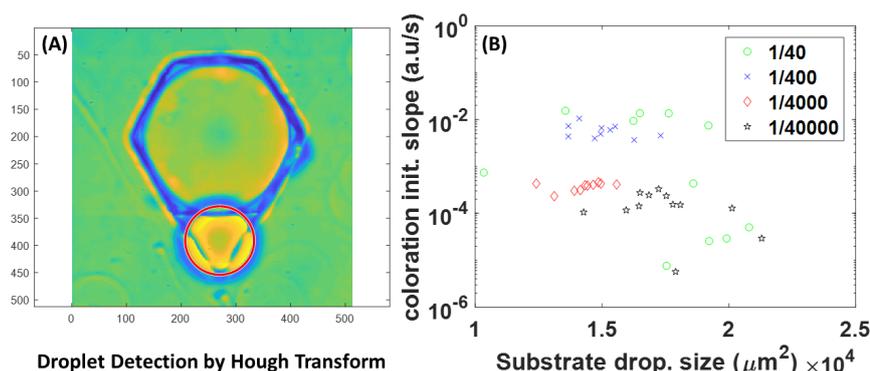


FIGURE 2.8: **Indépendance à la quantité de substrat apportée.** (A) Image Matlab montrant la détection de la goutte de substrat par transformée de Hough. (B) Evolution de la pente à l'origine en fonction de la surface apparente de la goutte de substrat. Chaque point représente un puits, chaque couleur représente une concentration de HRP.

Le protocole proposé se place donc dans le cas d'un excès de substrat. La vitesse de coloration ne dépend que de la quantité d'enzyme introduite. Sachant que, dans le test ELISA complet, cette quantité d'enzyme sera linéairement dépendante de la quantité d'antigène, il apparaît que la coloration de la goutte en fluorescence sera une observable valable pour quantifier la présence de cet antigène.

2.2.2 Mesure d'IL-1 β on-chip

Premières Mesures

Maintenant que sont posés les principes de notre mesure cinétique en ELISA, mesurons effectivement des concentrations de cytokine IL-1 β . On commence par charger les pièges de gouttes de 50nL contenant typiquement 3000 billes fonctionnalisées (par des anticorps anti-IL-1 β , voir Section 2.1) suspendues dans une solution d'agarose à 1%. Ces billes sont d'abord incubées avec des concentrations croissantes de cytokine (de l'ordre de la centaine de pg/mL). Une fois gélifiées, on rince abondamment les gouttes d'hydrogel par un flux de PBS à 50 μ L min⁻¹ pendant 10 minutes. On introduit alors la solution d'anticorps de détection biotinylé et laissons incuber 2h. Après une nouvelle phase de rinçage, un passage d'une solution concentrée de HRP dans PBS, et un dernier rinçage, on pousse une phase huile entre les gouttes de gel pour les ré-encapsuler. Comme dans la section précédente, on fusionne alors ces gouttes contenant donc des billes portant le sandwich immun antigène - abBiotine - streptavidinHRP avec une goutte de substrat enzymatique (Figure 2.9D), et l'on suit la coloration des pièges au cours du temps.

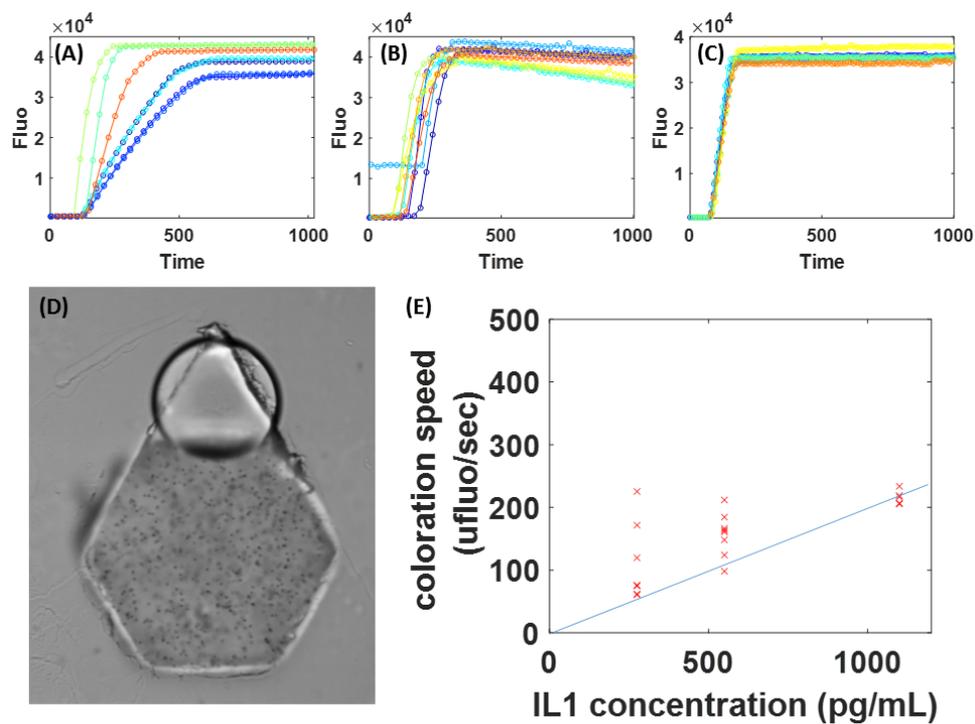


FIGURE 2.9: **Micropuits ELISA avec suspension de billes fonctionnalisées.** Courbes d'évolution de la fluorescence dans différents puits pour des concentrations d'IL-1 β de (A) 275, (B) 550, et (C) 1100pg mL $^{-1}$. (D) Photographie d'un double-puits contenant – en bas – des billes fonctionnalisées suspendues dans un gel d'agarose, et – en haut – une goutte de substrat. (E) Première courbe de calibration reliant la cinétique de coloration à la concentration de cytokine IL-1 β . La pente est calculée par un fit affine sur les premiers instants de la courbe. Droite bleue tracée à des fins de visualisation.

On mesure la coloration de la goutte principale après apport du substrat chimifluorescent (Figure 2.9A-C). Comme précédemment, la fluorescence augmente dès les premiers instants après la fusion, et atteint un plateau en des temps allant de 1 à 10 minutes. On constate sans surprise que plus la quantité initiale de cytokine est grande, plus la pente de la coloration est raide. Toutes ces valeurs de pentes se trouvent dans la partie haute de la courbe de calibration cinétique exposée Figure 2.7B. D'autre part, on remarque une extrême variabilité dans les pentes des courbes pour les concentrations d'IL-1 β les plus faibles, allant de 80u.a/s à 240u.a/s pour une concentration initiale d'IL-1 β valant 275pg/mL. Cette variabilité à basse concentration est attribuée à un défaut des étapes de lavage, qui laissent subsister des molécules non-liées au billes mais qui participent à l'activité enzymatique en fin d'expérience.

Quoi qu'il en soit, la Figure 2.9E - qui donne la valeur de la pente de coloration en fonction de la quantité initiale d'IL-1 β dans le système - constitue une première courbe de calibration de l'ELISA sur puce pour la quantification d'IL-1 β . Cette courbe relie la cinétique de conversion enzymatique à la concentration initiale d'antigène présente dans des pièges isolés. Elle reste limitée en envergure : elle s'étend sur moins d'une décade de concentration, et présente de grandes barres d'erreurs sur chacun de ses points. Dans la partie qui conclut cette section, on se propose d'étudier les limites de cette première méthode de dosage, ainsi que ses perspectives d'amélioration.

2.2.3 Discussion : Limitations de l'ELISA on-chip

Prenons un pas de recul sur les expériences précédentes. Nous sommes parvenus à discriminer des concentrations variables de cytokine IL-1 β au sein de compartiments microfluidiques adaptés à la culture 3D. Discutons un moment des limites de cette technique de dosage "on-chip".

- **Capture et analyse d'image :** problème de l'échantillonnage. Pour mesurer de fortes concentrations d'IL-1 β , il est nécessaire de mesurer la coloration dans ses premiers instants. Comme pour toute mesure discrète, le temps d'échantillonnage du signal fluorescent se doit d'être au moins deux fois inférieur au temps caractéristique du phénomène [158]. Pour des concentrations intermédiaires d'IL-1 β , Figure 2.9B nous avons évalué ce temps : $\tau_{coloration} \approx 100s$. Pour un seul piège donné, il faut donc prendre un points au minimum toutes les 50s. Aucun problème, le microscope peut prendre une image toutes les 1.6s à une position donnée. Pour imager plusieurs piège en revanche, il faut additionner le temps de déplacement de la platine. La mesure d'ELISA à haute concentration apparaît donc limitée par le système de microscopie utilisé.
- **Expérience fastidieuse.** Si la méthode d'ELISA sur puce développée plus haut permet de distinguer des concentrations d'IL-1 β , elle devient assez lourde à mettre en place pour de nombreux échantillons. Si l'on somme les temps d'incubation, de lavages, et de changement de phase, il faut une journée pour obtenir les données brutes de la mesure. Cela étant, plusieurs puces peuvent être suivies en parallèle, c'est d'ailleurs le cas pour les données de la Figure 2.9. Pour devenir une expérience de routine, ce test ELISA sur puce demanderait une stratégie d'automatisation. En fait de telles stratégies, on peut citer celle, proposée récemment par Parent et al.[159], dans laquelle un système de microvalves permet l'introduction des différents éléments du sandwich immun, y compris des solutions standard pour réaliser un étalonnage 'in-situ' du test.

- **Problème de bruit chimique.** A basse concentration de cytokine, un dernier problème apparaît. On constate une conversion systématique du substrat chimioluminescent, même en l'absence d'antigène lors de la préincubation. On peut attribuer ce bruit de fond chimique à la fixation non spécifique des anticorps de détection et/ou de l'enzyme HRP dans la puce microfluidique. La présence d'un gel d'agarose est un facteur aggravant : elle est nécessaire à la suspension des billes et à leur tenue dans la puce microfluidique, mais limite la diffusion des espèces, et adsorbe les protéines [160]. Nous avons pu mesurer une baisse de ce bruit de fond en augmentant le pouvoir de détergence de la solution de lavage, mais jamais sa disparition. On peut également mettre en cause les temps de diffusion du problème : pour une goutte de 400 μm de diamètre, avec un coefficient de diffusion typique de HRP (44kDa) valant $10^{-10}\text{m}^2\text{s}^{-1}$, une molécule peut mettre jusqu'à 2000 s pour sortir de la goutte et être emportée par la solution de lavage.

Un mot pour conclure cette partie. L'ELISA on-chip est la suite logique des ELISA sur billes réalisés dans la partie précédente : on introduit juste, dans le format microfluidique, les différents éléments d'un ELISA classique, jusqu'à la conversion enzymatique, qu'il s'agit de suivre par analyse d'image. L'utilisation d'une enzyme rend cependant la mesure assez délicate, toute trace de fixation non spécifique étant vouée à amplifier la conversion de l'enzyme avec le temps. Plus gênant, les différents réactifs sont introduits par changement de phase global : difficile alors de parler de mesures indépendantes et parallèles dans chacun des puits. On va donc chercher, dans la prochaine partie, à modifier légèrement notre méthode pour maintenir les signaux de fluorescence sous contrôle et conserver aussi longtemps que possible l'isolation de chacun des puits.

Si l'on voulait reprendre ces expériences d'ELISA avec amplification enzymatique, nous recommanderions d'utiliser des pièges plus petits, comme ceux que nous décrirons en Annexe B, pour rendre plus efficace la diffusion des molécules non-spécifiquement liées vers l'extérieur de la puce. Sur un tel système, il deviendra possible d'utiliser un lecteur de gouttes microfluidiques à large champ de vision, comme celui développé par StillaTech[®], pour suivre l'ensemble des gouttes sans changer la position de la puce.

2.3 Mesure de fluorescence ponctuelle pour doser IL-1 β

2.3.1 Relocalisation de la fluorescence

Expérience et microscopie

Nous cherchons un nouveau moyen de mesurer un signal de fluorescence dans nos double-pièges microfluidiques. Pour preuve de concept, on propose l'expérience suivante : dans la goutte principale, on enferme, en concentration connue, de la biotine marquée par un fluorophore, en solution dans une goutte d'hydrogel. Puis l'on apporte une seconde goutte contenant une suspension de billes recouvertes de streptavidine, piégées elles aussi dans l'agarose (Figure 2.10A). Le couple biotine-streptavidine est connu pour former la liaison non covalente la plus forte du monde biologique [161]. Lors du changement de surfactant qui provoque la fusion des deux gouttes (Section 1.4.3), on observe ainsi un déplacement du signal de fluorescence de la solution de la goutte principale vers les billes micrométriques (vidéo <https://figshare.com/s/a26330c87f6dbd5b09b3>). En quelques minutes, un état d'équilibre est atteint (Figure 2.10B) et les billes atteignent une valeur plateau de fluorescence. La question est

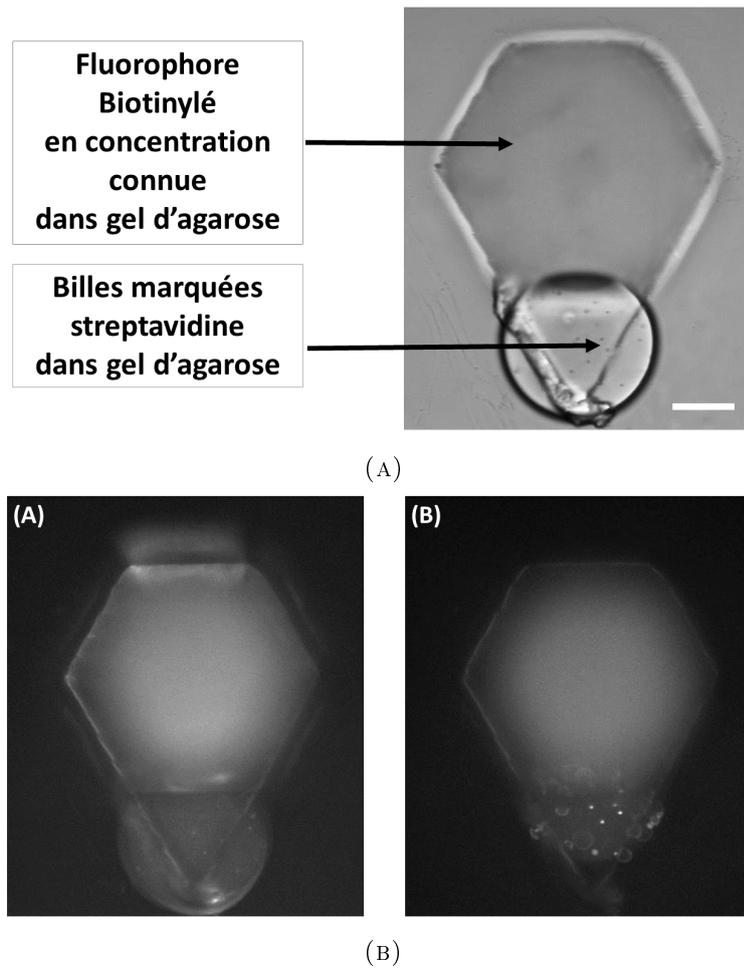


FIGURE 2.10: **Relocaliser un signal fluorescent, expérience modèle.** (A) Microphotographie en lumière blanche, avant fusion, d'une double goutte gélifiée contenant une concentration connue de biotine-FITC, et des billes fonctionnalisées streptavidine. (B) Deux images de fluorescence avant fusion et 20 minutes après fusion.

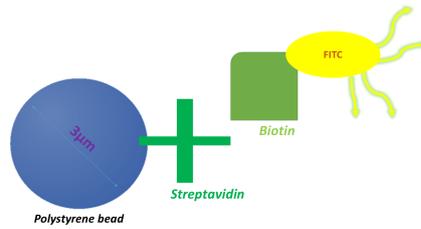


FIGURE 2.11: Schéma de l'attachement de la biotine fluorescente sur les billes. Hors d'échelle.

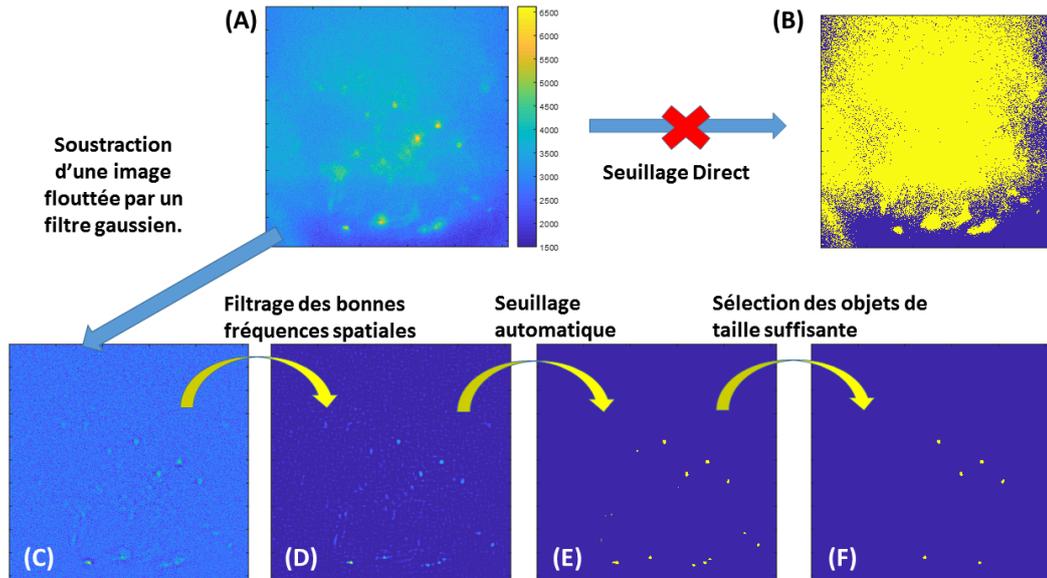


FIGURE 2.12: D'une image illisible à l'extraction d'une mesure physique. (A) Image d'origine, obtenue pour une faible concentration de biotine-FITC (7.5ng/mL). (B) Résultat d'un seuillage de fluorescence. (C) Résultat d'une soustraction du bruit de fond obtenu par filtrage gaussien de l'image d'origine. (D) Filtrage passe bande en fixant $(\lambda_{bruit} = 2w_{intéret} = 5)$. (E) Binarisation automatisée. (F) Filtrage final en fonction de la taille des objets.

alors de mesurer l'intensité de fluorescence localisée sur les billes, en fonction de la quantité de biotine fluorescente présente dans la goutte d'origine.

Détecter des billes sans Cytomètre de Flux

La mesure du signal de fluorescence n'est pas triviale. Les images sont en effet assez complexes, avec des interfaces multiples, des billes dans des plans lointains, et surtout un fort signal de bruit de fond (Figure 2.12A). Ce background lumineux ne peut être éliminé : il est le fruit des nombreuses réflexions parasites au sein de la puce microfluidique, et de la présence de molécules fluorescentes libres en solution - ici la biotine. L'œil de l'expérimentateur peut distinguer la silhouette de la bille, même dans les pires conditions optiques, et fixer un seuil de bruit pour ne garder que les objets d'intérêt. On veut pourtant éviter de faire un choix arbitraire de seuil, d'autant plus que le nombre d'images à traiter est important.

Il s'agit donc de manipuler les images jusqu'à détecter uniquement le signal des billes. Sur la Figure 2.12, on décrit ainsi une stratégie de filtrage de bruit utilisable pour isoler les billes. Dans cette stratégie, on commence par appliquer un filtre

gaussien à l'image de départ, c'est à dire à convoluer la distribution des fréquences spatiales de l'image avec une gaussienne de largeur typique σ . La taille du filtre gaussien doit être adaptée pour "gommer" la présence des billes, c'est à dire que ce σ soit du même ordre de grandeur que la taille typique des objets d'intérêt.

On soustrait alors cette image floue à celle d'origine. Le produit de la soustraction donne d'ores et déjà une image améliorée (Figure 2.12C), à background uniforme sur lequel le détail des billes ressort. Avant de binariser l'image, on applique un filtre passe bande sur la distribution des fréquences spatiales, ce qui revient à rechercher des objets petits et nets de taille typique w , en excluant les artefacts de bruits de taille λ . A partir de l'image obtenue (Figure 2.12D), il est dès lors beaucoup plus aisé de binariser l'image en un masque qui ne garde que la silhouette des billes (Figure 2.12E), quitte à filtrer une seconde fois selon l'aire, le périmètre, ou le ratio des dimensions des objets détectés (Figure 2.12F).

A travers chacun des trous du masque, on peut mesurer l'intensité de fluorescence des pixels qui appartiennent aux billes, et en faire une moyenne, pour obtenir une valeur de fluorescence associée à un piège donné. Le code utilisé pour capturer la valeur de fluorescence d'une bille est donné en Annexe C.

Résultats et Discussion

Dans les moments qui suivent la fusion, on mesure l'intensité de fluorescence des billes, ainsi que celle du background lumineux de la goutte de gel qui les contient (Figure 2.13). Ce que l'on observe qualitativement, c'est une augmentation brutale de la fluorescence moyenne dans la goutte secondaire, qui se confond totalement avec celle de la bille. En 3,3 minutes seulement, on atteint un équilibre de diffusion au sein de la double goutte fusionnée.

Une rapide vérification : en prenant pour coefficient de diffusion de la biotine-fluorescéine dans l'eau $D = 3,4 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ [162], sur une distance typique valant le diamètre de la petite goutte 100 μm , on attend un temps typique de diffusion d'exactly 30 s. Il faut donc attendre 5 temps de diffusion pour arriver à l'homogénéité. On peut attribuer cette lenteur relative du phénomène à la présence d'agarose, qui ralentit la diffusion des molécules biologiques [69, 70]. Aux temps plus longs en revanche, la bille commence à capturer de la biotine fluorescente, et sort rapidement du background lumineux.

On laisse la capture se poursuivre pendant une demi-journée pour être certain d'avoir atteint l'équilibre à la surface des billes. Après passage sous microscopie de fluorescence, on obtient des distribution de pixels fluorescents appartenant à des billes. Ces distributions présentent un pic centré sur une valeur moyenne, et le coefficient de variation (CV) de la distribution des pixels fluorescents mesuré est proche de 20% quelle que soit la concentration. Les pics surnuméraires qui peuvent apparaître comme dans la Figure 2.14 sont possiblement dus à la détection de pixels du background lumineux.

On peut évaluer l'effet de la concentration de biotine sur le signal final des billes (Figure 2.15). Outre l'augmentation attendue du signal lumineux sur les billes, on remarque que les premiers points de la courbe montrent une dépendance linéaire de la fluorescence vis à vis de la quantité initiale de biotine, avec un offset attribuable au bruit de fond intrinsèque du montage. A haute concentration, la fluorescence est au dessous de la réponse linéaire attendue. L'une des explications serait une saturation des sites de capture de la bille. Mais l'on devrait dans ce cas obtenir un plateau beaucoup plus net de la fluorescence. La véritable explication est d'ordre optique : à haute concentration, les valeurs de fluorescence sont plafonnées par un début de

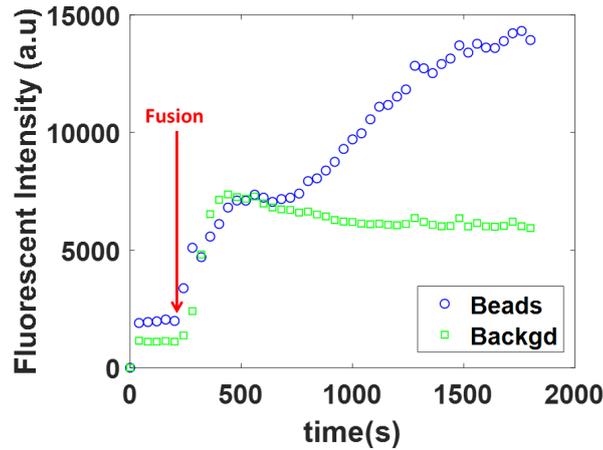


FIGURE 2.13: **Suivi de la relocalisation de fluorescence dans le temps.** Intensités de fluorescence mesurées sur une seule bille et son voisinage au cours du temps, lors de la fusion.

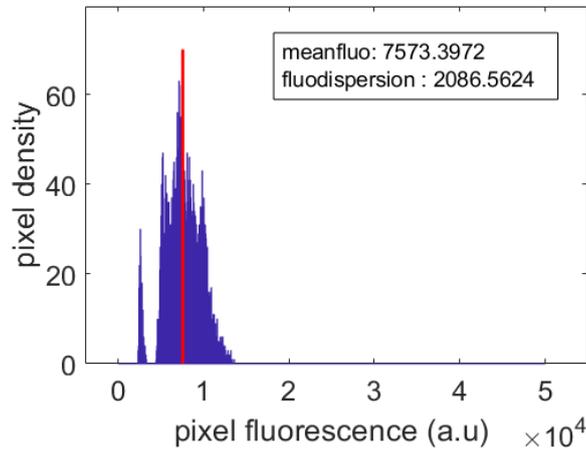


FIGURE 2.14: **Distribution des pixels appartenant à des billes fluorescentes.** Histogramme des valeurs de fluorescence lues sur les billes détectées. $C_{biotin} = 17.5 \text{ pg mL}^{-1}$. $N=50$ pièges.

saturation des capteurs de la caméra, coupant ainsi les valeurs les plus hautes que l'on pourrait mesurer.

Ces expériences de relocalisation nous apprennent une nouvelle manière de quantifier le contenu de nos gouttes microfluidiques. Chaque puce peut contenir jusqu'à 252 tests semblables, le nombre effectif dépendant de l'efficacité de capture des gouttes secondaires sur leurs pièges. Ces mesures ont l'avantage d'être statiques, i.e de ne nécessiter qu'une seule capture d'image par piège.

Elles nous confrontent aussi à de multiples problématiques expérimentales, la première d'entre elles étant la microscopie. Toutes nos mesures sont ainsi limitées, dans les valeurs basses par le bruit de fond fluorescent, et dans les valeurs hautes par les phénomènes de saturation. Dans une moindre mesure, on prend aussi garde au blanchiment des échantillons lorsqu'ils sont exposés à leur longueur d'onde d'excitation (<https://figshare.com/s/8f61a7315933692b933c>).

Malgré le pouvoir de résolution de l'analyse d'image, reste qu'au sein d'une même

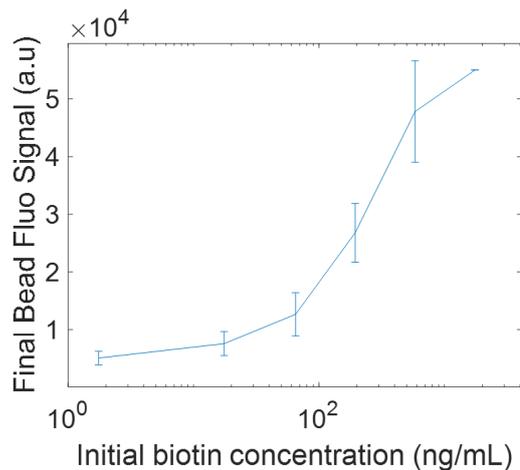


FIGURE 2.15: **Calibration après relocalisation.** Fluorescence moyenne des pixels appartenant aux billes, en fonction de la quantité de biotine initialement présente dans la goutte principale, obtenue par analyse d'image. N=208 pièges. Le dernier point à droite est une valeur de saturation de la caméra. Les barres d'erreur correspondent au STD des distributions de pixels fluorescents des billes.

mesure on constate une importante variabilité dans la lecture des niveaux de fluorescence. Sur l'expérience présente, le CV de distribution des pixels fluorescents mesuré est proche de 20% quelle que soit la concentration.

2.3.2 Niveaux de détection : faites appel à des professionnels

La partie précédente montre donc que notre montage microfluidique permet de relocaliser puis mesurer un signal de fluorescence issue de molécules en solutions. Dès lors, on se propose de réaliser un immuno-essai sans amplification enzymatique, en utilisant un anticorps secondaire fluorescent comme rapporteur direct de la quantité de cytokine fixée sur la bille.

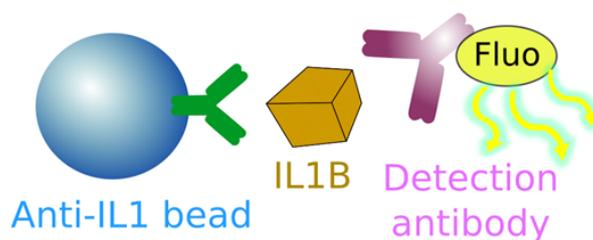


FIGURE 2.16: **Complexe immunitaire complet avec reporter fluorescent.**

Observation en microscopie

Nous disposons déjà d'une grande partie du sandwich immunitaire : dans la Section 2.1, nous avons préparé des billes, que l'on sait capable de complexer IL-1 β . A priori, il ne reste donc qu'à ajouter un anticorps de détection marqué avec une molécule fluorescente, pour observer des billes d'autant plus lumineuses qu'elles porteront des quantités importantes de cytokines.

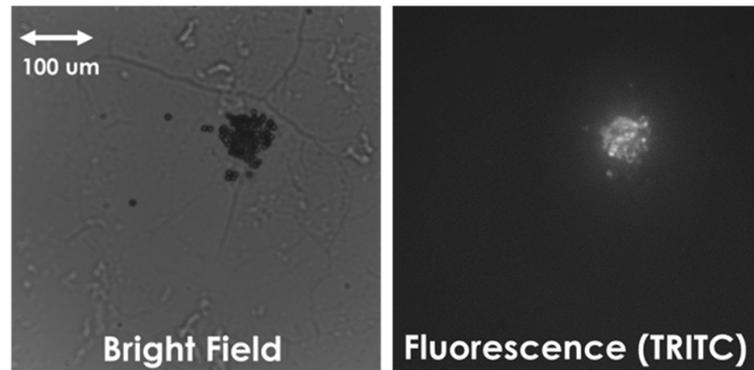


FIGURE 2.17: **Première détection de l'IL-1 β sur de billes micrométriques, en puce.** Microphotographies en lumière blanche et en fluorescence de billes fonctionnalisées puis mises en contact avec une très forte concentration d'IL-1 β (10ng/mL) et d'anticorps de détection fluorescents. Le temps d'exposition de la photo de fluorescence est de 1 s avec un gain numérique de x300.

On commence par incuber, pendant deux heures, à température ambiante, une solution à 1% de billes fonctionnalisées anti-IL-1 β avec 100 μ L de concentrations croissante en IL-1 β [0, 11, 55, 110, 550, 1100, 5500, 11000] pg/mL. Une solution d'anticorps de détection anti-IL1 est également incubée pendant deux heures au contact des billes. Les quantités décrites nous assurent théoriquement de travailler en permanent excès de sites de capture, et en large excès d'anticorps de détection. Les molécules non complexées sont lavées au PBS. On travaille sous lame et lamelle mais aussi en puits microfluidiques, pour mimer au mieux les conditions d'observation finales. Comme le montre le Schéma 2.16 la présente expérience doit amener les billes à se charger de molécules fluorescentes.

Rapidement, on constate que les signaux de fluorescence observés sont extrêmement faibles, voire inexistantes aux concentrations raisonnables d'IL-1 β . Sur la Figure 2.17, on pousse les paramètres d'acquisition du microscope dans ses retranchements (1 seconde de temps d'exposition, gain numérique x300) pour montrer que l'on peut détecter la présence du complexe immun fluorescent à la surface des billes. Plus grave, on constate une variabilité des intensités sur les billes d'une même expérience. Figure 2.17C, deux billes voisines sont ainsi porteuses de signaux fluorescents valant du simple au double. On peut attribuer cette variation à des qualités de fonctionnalisation différentes.

Confirmation en cytométrie

L'utilisation de billes fonctionnalisées portant un anticorps de détection fluorescent semble donc poser un problème de seuil de détection. Pour vérifier cette hypothèse, et la décorréliser d'éventuels problèmes de microscopie, on se propose de préparer des billes fonctionnalisées avec des quantités croissantes d'anticorps fluorescent. Un exemple : un anticorps anti-IL-1 β marqué FITC est dilué par dix par rapport à la concentration usuelle pour fonctionnaliser un nombre constant de billes. Les billes ainsi marquées doivent avoir une fluorescence comparable à celle obtenue sur des billes dont dix pour cents des sites actifs sont occupés par de l'IL-1 β . Chaque lot de billes correspond donc à une quantité d'IL-1 β virtuelle, et l'on veut savoir comment leurs fluorescences respectives évoluent en fonction de la concentration.

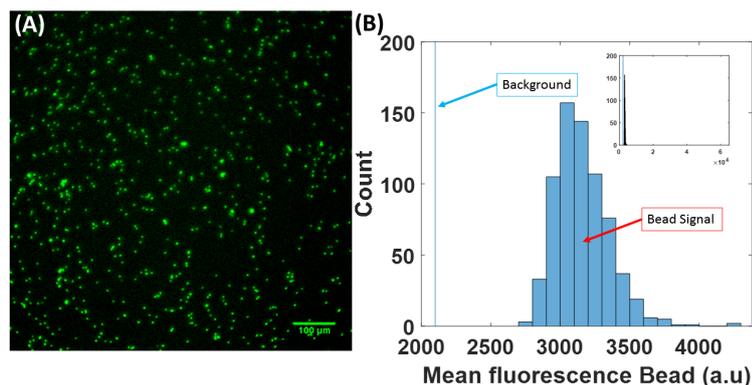


FIGURE 2.18: **Billes modèles, fonctionnalisées par anticorps fluorescent.** (A) Billes fonctionnalisées avec un anticorps fluorescent anti-IL-1 β , observées en microscopie de fluorescence, contraste ajusté manuellement. (B) Histogramme des fluorescences moyennes par bille, et niveau moyen du bruit de fond. Encart : "zoom out" sur la gamme de fluorescence de la caméra. $n = 696$ billes.

Constatons d'abord qu'à l'issue de la fonctionnalisation, ces billes sont fluorescentes, on le voit Figure 2.18A. Il s'agit d'une nouvelle preuve d'efficacité de nos protocoles de fonctionnalisation. L'analyse d'image précise toutefois que les niveaux de fluorescence obtenus sont faiblement discernables du background (Figure 2.18B), et ce, indépendamment des paramètres d'acquisition de la caméra.

Même en cytométrie de flux, la détection est difficile : sur la Figure 2.19, on représente les intensités de fluorescence détectées sur 10^5 de ces mêmes billes. Ces histogrammes sont obtenus après application d'un gain numérique de 700 sur les signaux bruts. Chaque lot de bille est associé à un pic de fluorescence, et on observe que leur fluorescence s'atténue rapidement quand la concentration d'anticorps fluorescents sur leur surface diminue. Le signal des billes nues (peu visible ici) reste distinguable du signal des billes $C_0/1000$. On note la présence d'un pic secondaire pour les billes marquées avec une concentration C_0 : il est sans doute attribuable à l'existence d'agrégats de billes, en particulier de doublets, dans la solution. Ce pic disparaît à des concentrations plus faibles.

Bilan partiel

Pour conclure sur cette section, nos billes fonctionnalisées sont limitées dans leur capacité à exprimer de la fluorescence, et deviennent indiscernables dès que moins d'un dixième de leurs sites de capture est occupé. Cette faible sensibilité est peut-être explicable par l'amateurisme de nos réactions de fonctionnalisation, qui ne sont pas optimisées comme le sont celles des fournisseurs. On se souviendra par exemple de l'importance de l'orientation des anticorps, évoquée dans le premier chapitre : Choi et al. [47], en forçant les anticorps à s'aligner, partie spécifique vers le haut, changent radicalement leur courbe de calibration pour la mesure d'IL-2 (revoir la Figure 1.4D). De surcroît, il a été établi que la distance entre le fluorophore et la surface de la bille influence directement la perception du signal de fluorescence [163] : plus il y a de molécules entre le fluorophore et la bille, plus le test est sensible.

Dans la partie suivante, voyons si l'on peut garder le même principe d'immuno-essai à relocalisation de fluorescence, en utilisant des billes commerciales.

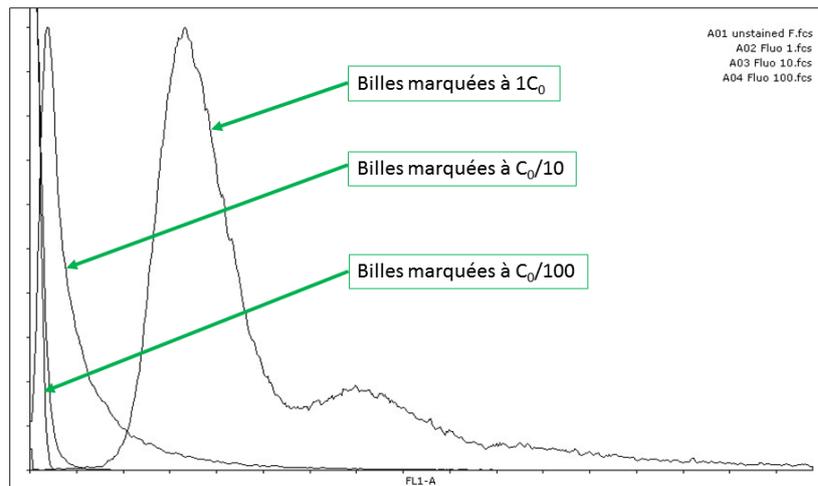


FIGURE 2.19: **Une détection difficile, même en CMF.** Histogrammes de fluorescence obtenus en cytométrie de flux sur des lots de billes fonctionnalisés avec des dilutions variables d'anticorps anti-IL-1 β fluorescent (FITC). Application d'un gain numérique de 700 sur les signaux bruts. $n = 10000$ événements par condition. Aucun filtrage des données selon leur taille (FSC) ou leur complexité (SSC).

2.3.3 Calibration sur des billes du commerce

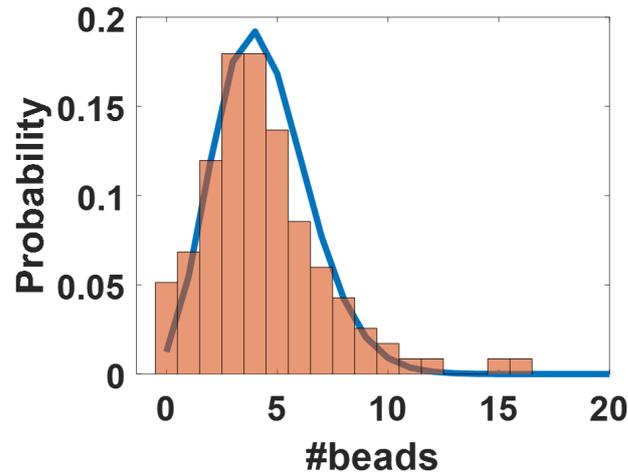
Des kits de détection de cytokines en CMF sont commercialisés, par exemple par la compagnie Luminex (Kit LHSCM293, Luminex Corporation eBioscience, Austin, Texas, US). Ils contiennent l'anticorps de détection biotinylé, un fluorophore couplé à la streptavidine, diverses solutions tampons, mais surtout des billes fonctionnalisées avec des anticorps anti-cytokine spécifiques. L'ensemble est prévu pour discriminer, en cytométrie, des concentrations de cytokine sur une gamme de 3 décades. Nous allons donc répondre à deux questions : peut-on implémenter un test Luminex sans cytométrie de flux, dans un montage microfluidique et imagé en microscopie de fluorescence ? Que devient notre sensibilité en termes de concentrations d'IL-1 β ?

Dans des puces microfluidiques distinctes, on introduit sous forme de petites gouttes (10 nL) des quantités croissantes d'IL-1 β allant de $4.5 \cdot 10^2$ à $2 \cdot 10^5$ pg mL $^{-1}$. Ces concentrations ne sont pas prises au hasard : sur le Tableau 2.1, on montre comment l'on peut estimer la gamme dynamique de notre test microfluidique à partir des données constructeur du test. On sait en effet que Luminex prévoit une centaine de billes par puits, avec des volumes d'échantillons de 200 μ L. On connaît les volumes et le nombre de billes impliqués dans notre géométrie microfluidique. On remonte ainsi à des valeurs de concentrations raisonnables pour conserver la quantité d'antigène par bille identique entre le test 96-puits et celui en puce.

On fusionne ces petites gouttes à des gouttes préalablement piégées contenant une suspension de billes sous forme de grosses gouttes, contenant un anticorps biotinylé et une streptavidine couplée à un fluorophore. Là une petite optimisation est nécessaire : il faut s'assurer de la présence d'au moins une bille par goutte, sans pour autant en introduire en excès, qui changerait la mise à échelle du Tableau 2.1. Par le calcul, on peut estimer la concentration de billes nécessaire à ces deux conditions. La probabilité

	Gamme Classique					Gamme en piège DT				
	IL1 (pg/mL)	Numb. beads	Vol. (μ)	calc. Mass (pg)	calc. Mass/bead	calc. IL1 (pg/mL)	Numb. beads	Vol. (μ)	calc. Mass (pg)	wanted m/bead
std 1	900	100	200	180	1.8	1 800 000	10	0.01	18	1.8
std 2	180	100	200	36	0.36	360 000	10	0.01	3.6	0.36
std 3	36	100	200	7.2	0.072	72 000	10	0.01	0.72	0.072
std 4	7.2	100	200	1.44	0.0144	14 400	10	0.01	0.144	0.0144
std 5	1.44	100	200	0.288	0.00288	2 880	10	0.01	0.0288	0.00288
std 6	0.288	100	200	0.0576	0.000576	576	10	0.01	0.00576	0.000576
LOD	0.22	100	200	0.044	0.00044	440	10	0.01	0.0044	0.00044
std 7	0.0576	100	200	0.01152	0.0001152	115	10	0.01	0.001152	0.0001152

TABLE 2.1: Passer des plaques 96 puits à un test microfluidique.

FIGURE 2.20: Optimiser la distribution de bille dans les gouttes. Distribution des nombres de bille par goutte. Fit Poissonien avec $\lambda = 4.38$. $N = 117$ gouttes.

d'avoir k billes dans une goutte est donnée par la distribution de Poisson :

$$P_{\lambda}(k) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!} \quad (2.6)$$

Si l'on veut au moins une bille dans 99% des gouttes, il faut donc choisir la valeur moyenne $\lambda = C_{bille} V_{goutte}$ telle que $P_{\lambda}(0) < 0.01$. Soit :

$$\lambda > 4,6$$

Par une estimation de la concentration de billes de la suspension commerciale, on parvient à distribuer les billes dans les gouttes de façon relativement proche de cette valeur, comme le montre la distribution Figure 2.20. Il reste malgré tout quelques pièges vides dans la puce, et l'on voit que la valeur à 0 billes est sensiblement plus haute que celle prévue par la distribution de Poisson ajustée à l'historgramme. De même, quelques gouttes contiennent plus de 10 billes. Cet écart de comportement s'explique par le fait que les billes ne sont pas indépendantes les unes des autres : des phénomènes d'agrégation peuvent survenir dans le temps et perturber la distribution Poissonienne dans les gouttes.

On termine cette section avec la courbe de calibration à proprement parler, Figure 2.21. La fluorescence des billes est obtenue au lendemain de la fusion pour s'assurer d'avoir atteint l'équilibre des complexations anticorps/antigène. L'observable choisie est la valeur maximale de fluorescence mesurée dans chaque piège, à laquelle on soustrait celle du background moyen local. La raison de ce choix est la grande disparité

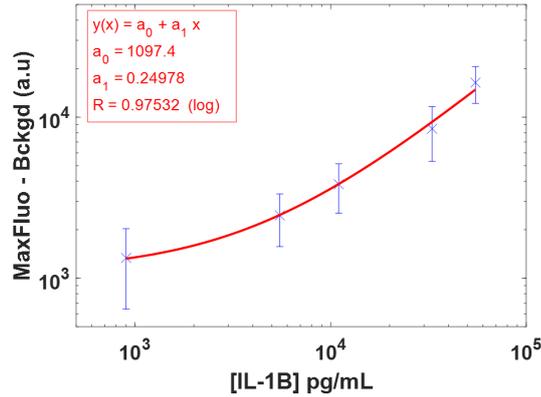


FIGURE 2.21: **Calibration on-chip sur des billes commerciales.** Mesure du maximum de fluorescence mesuré sur les billes, à laquelle on retranche celle du bruit de fond, en fonction de la concentration d'IL-1 β . Fit Affine par Ezyfit.

des backgrounds et des conditions d'observations entre chacun des points. La fluorescence maximale des billes dans chaque piège augmente lorsque la concentration d'IL-1 β augmente. Avec les paramètres d'acquisition utilisés, on mesure une variation d'une décade de fluorescence pour deux décades de concentration en IL-1 β parcourues. On représente une courbe modèle affine, reliant fluorescence f et concentration c en IL-1 β dans la goutte, selon $f = 1097.4c + 0.2$.

À haute concentration, la fluorescence des billes cesse d'augmenter, voire diminue (points non montrés sur la courbe). C'est un phénomène que l'on observera avec une autre cytokine cible, le VEGF. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette diminution de fluorescence. On peut par exemple accuser un déficit en anticorps de détection par rapport à la quantité de cytokine à marquer. Toutefois, des expériences en gouttes ouvertes avec d'avantage d'anticorps n'augmentent pas sensiblement le signal des billes.

On s'oriente donc plutôt sur une limitation optique de la fluorescence : à haute densité de fluorophores sur la bille, la littérature fait état d'un phénomène de *concentration quenching*, ou blanchiment de fluorescence par effet de nombre [164]. Les molécules fluorescentes sont en effet sensibles aux radiations et modes de vibrations de leurs voisines et peuvent perdre ainsi en efficacité radiative, voire se dégrader au cours du temps [165, 166]. Dans un cytomètre, cet effet n'est pas observé, peut-être parce qu'on se débarrasse des molécules fluorescentes libre en solution. Dans notre test en goutte fermée, les anticorps de détection fluorescents libres sont encore présents dans le milieu au moment de la mesure de fluorescence de la bille.

On pourrait s'inquiéter de voir une telle variabilité dans le nombre de billes par goutte. Pourtant, à ce jour, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre le nombre de bille et leur signal de fluorescence. On peut attribuer cette observation à un manque de sensibilité du système d'observation, les billes étant conçues pour discriminer des concentrations sur plusieurs décades plutôt que dans un mouchoir de poche. Du reste, il faut garder à l'esprit que la principale variabilité de notre expérience vient du contenu réel en IL-1 β dans la goutte finale : si la variabilité de rayon entre les petites gouttes est de l'ordre de 5%, la masse de cytokine testée varie donc de 15% (voir le calcul de propagation des incertitudes au Chapitre 3).

Dernière observation, plus optimiste : l'utilisation de billes commerciales présente le double avantage d'avoir de très bons signaux de fluorescence, mesurables avec des paramètres microscopiques raisonnables, et de présenter une variabilité inter-billes

faible dans un puits donné. On se propose donc, dans la dernière partie de ce chapitre, d'évaluer la cinétique de ce test dans la géométrie microfluidique qui nous intéresse.

2.3.4 Cinétique du test et modèles de diffusion

Etude expérimentale

Comme les tests ELISA en puits, les mesures de cytokines avec les kits commerciaux prennent en moyenne une demi-journée, entre des phases d'incubation, qui durent une à deux heures, et des phases répétées de lavage, qui durent quelques minutes chacune. Dans notre test microfluidique, tout se passe dans la goutte, en même temps, et sans étape de lavage. On doit donc obtenir une estimation du temps nécessaire pour atteindre un équilibre au niveau des sites de capture de la bille.

On répète donc l'expérience de la partie précédente – fusionner une petite goutte d'IL-1 β sur une goutte qui contient les billes sédimentées et les anticorps de détection. Cette expérience est menée avec des concentrations croissantes de cytokine. Dès l'instant de la fusion, on mesure sous forme de *time lapse* la montée de fluorescence sur les billes (<https://figshare.com/s/03b207a4cc33672a2b94>). L'utilisation d'une interface de tracking (Trackmate, [167]) permet de suivre très précisément dans le temps cette montée de fluorescence, et ce pour plusieurs dizaines de billes par expérience.

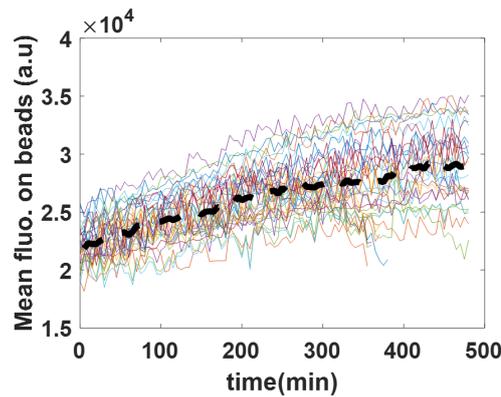


FIGURE 2.22: **Suivi de la formation du complexe immun sur une des billes micrométriques.** Intensité de fluorescence des billes en fonction du temps. $N = 24$ pièges. $C_{IL1} = 50.000 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$. La courbe noire est la moyenne de toutes les trajectoires.

Figure 2.22, on montre un exemple de montée de la fluorescence - et donc de formation du complexe immun - sur la bille mise en contact avec une concentration en IL-1 β $C_{IL1} = 50.000 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$. La fluorescence moyenne sur ces billes passe de 22000u.a à 30000u.a. Aux temps longs, le signal semble vouloir converger vers une valeur plateau.

On peut remarquer le haut niveau de background lumineux, de même que le caractère extrêmement bruité des signaux mesurés sur une même bille. Ce bruit expérimental est en fait attendu : d'une part le système contient une grande quantité de molécules fluorescentes, dans laquelle on vient lire l'intensité d'un petit objet légèrement plus fluorescent. D'autre part, sur la durée de l'expérience, la bille se déplace sur quelques dizaines de microns à l'intérieur du champ de vision du microscope. On incrimine des dilatations thermiques, des petits mouvements de la puce sur son support, et le gonflement de la goutte d'hydrogel.

Si l'on normalise ces courbes de fluorescence par la concentration initiale introduite par fusion (Figure 2.23), il apparaît que les pentes de courbes de coloration des billes

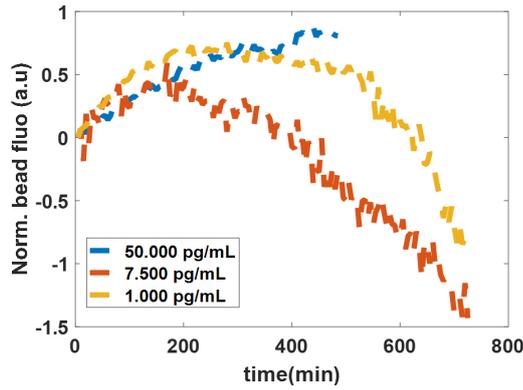


FIGURE 2.23: **Croissances normalisées de la fluorescence pour plusieurs concentrations de cytokine.** Signal moyen de fluorescence normalisée $(I(t)-I(1))/(I_{\max}-I(1))$ en fonction du temps pour trois concentrations de cytokines. Les décroissances sont dues à des pertes de focus pendant l'acquisition. $N = 24 + 36 + 49$ pièges.

sont sensiblement les mêmes. A temps plus long, les pertes de mise au point diminuent artificiellement les signaux de fluorescence mesurés, ce qui cause la décroissance générale des courbes moyennes.

Modèle de Diffusion 1D

Pour comprendre ces expériences, et interpréter la forme initiale de ces courbes, on peut se poser un problème de diffusion. On considère une diffusion simple, à une dimension et sans convection. A l'état initial, on considère une concentration uniforme d'IL-1 β valant C_0 . Le coefficient de diffusion de cette cytokine est donné par la littérature : $D = 3.10^{-11} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$. En $x = 0$ se trouve la surface de la bille, qui capture des protéines avec un flux h . A 200 μm de là, la frontière de la goutte impose un flux nul. Si l'on résout ce problème de diffusion avec un algorithme de type Crank Nicolson [168], on obtient un profil 1D de concentration dans la goutte au cours du temps (Figure 2.24A).

Si l'on calcule l'intégrale de la différence entre le profil d'origine à C_0 et le profil à l'instant t , on obtient la quantité de cytokine capturée par la bille au cours du temps, que l'on trace pour les trois concentrations expérimentales, Figure 2.24B. En normalisant ces trois courbes par leur concentrations respectives (Figure 2.24C), elles se superposent parfaitement, ce qui s'explique par l'auto-similarité des problèmes de diffusion simple. Cette masse atteint un plateau après typiquement 2000 s. Ce résultat est important pour nos expériences : quelle que soit la concentration, on peut espérer atteindre un pseudo-plateau de concentration sur la bille en typiquement 33 minutes. Dans les expériences du chapitre suivant, on a ainsi considéré qu'une incubation de 5 heures suffisait à atteindre l'équilibre chimique.

Ici, l'intérêt réside dans notre capacité à évaluer un temps caractéristique d'établissement d'un régime permanent, typiquement une heure pour l'IL-1 β . On montre également que, dans le cadre de cette étude, la vitesse de coloration varie peu avec la concentration de cytokine, ce qui est rassurant. Le modèle que l'on utilise est pourtant simpliste : on considère un milieu semi-infini, dans lequel le profil de concentration est perturbé de façon constante par une bille qui absorbe en continu des analytes. Nous verrons dans le chapitre suivant comment complexifier ce modèle pour le rendre

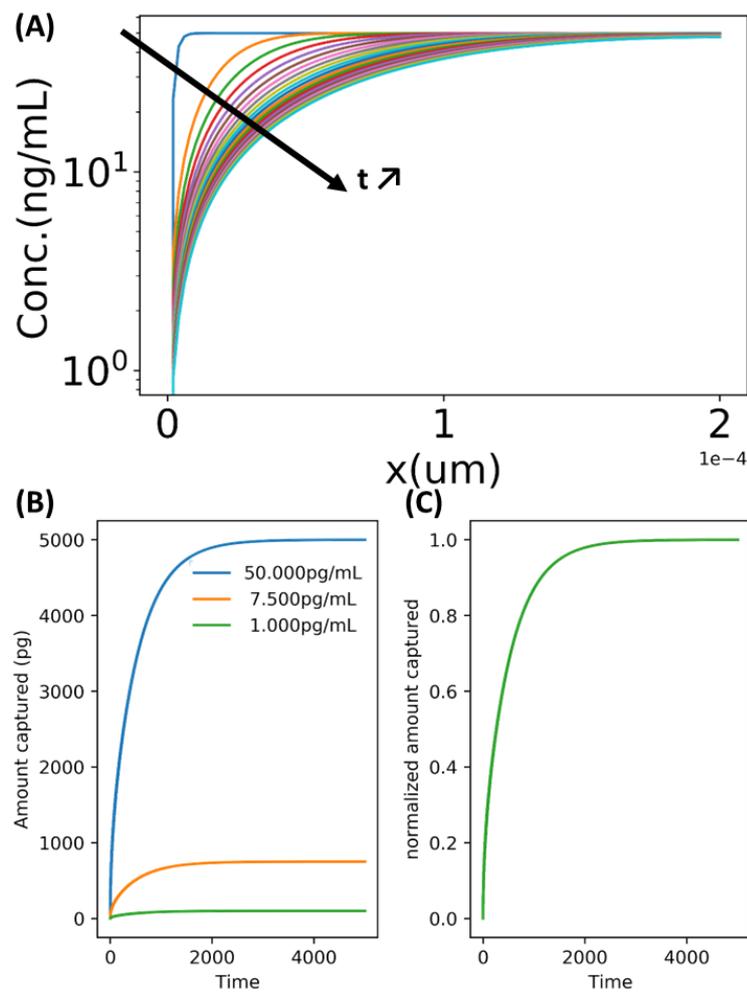


FIGURE 2.24: **Résolution numérique du problème de diffusion 1D.** (A) Evolution temporelle du profil de concentration dans la courbe pour la concentration la plus haute. (B) Masse de cytokine accumulée sur la bille obtenue par intégration, pour les trois concentrations de cytokine. (C) Même courbe, mais normalisée par la concentration initiale de la goutte. Paramètres de bord : $\text{degradationGauche}=0.1$; $\text{degradationDroite}=0$. Coefficient de diffusion $D = 3.10^{-11}\text{m}^2\text{s}^{-1}$. Taille du problème choisie égale au rayon de la goutte $R_d = 200\ \mu\text{m}$.

intéressant, notamment en évaluant l'effet du confinement de la goutte, et l'influence des caractéristiques de la bille.

2.4 Conclusions et choix de la cible biologique

C'est la fin de cette partie d'exploration expérimentale à la recherche d'un montage microfluidique utilisable pour mesurer des cytokines. Nous avons d'abord fonctionnalisé des billes micrométriques avec des anticorps de capture, puis utilisé l'amplification enzymatique et implémenté une sorte d'ELISA on-chip pour distinguer des concentrations d'IL-1 β . Le caractère dynamique de la mesure, et l'amplification inévitable du bruit d'adsorption non spécifique rendent ce premier outil délicat à utiliser et lourd d'un point de vue de l'expérience comme de l'analyse. Nous lui préférons une lecture statique de la fluorescence à même les billes, beaucoup plus robuste sous réserve de se trouver dans les bonnes gammes dynamiques de concentration (pour les billes) et d'intensités de fluorescence (pour la microscopie). En termes de cinétique, il faudra garder à l'esprit que la fixation successive de l'antigène d'intérêt puis des molécules de détection prennent du temps, à cause de la diffusion et des vitesses de réaction des réactifs.

La prochaine étape consiste à introduire un cobaye biologique dans nos gouttes pour mesurer leur sécrétion. Sans entrer dans les détails, on résume ici les grandes pistes de recherche du bon modèle cellulaire, et les raisons de notre choix final :

- **Hépatocytes de rat pour sphéroïdes tumoraux.** Le premier modèle cellulaire utilisé par sur la plateforme microfluidique présentée à la Section 1.4 est la lignée d'hépatocytes de rat (H4-II-EC3), qui forme des sphéroïdes en typiquement 12 heures [15]. Sur la vidéo (<https://figshare.com/s/6519143b6d7cb8b74e22>), on montre d'ailleurs une culture de tels sphéroïdes, avec des billes fonctionnalisées anti-albumine du rat sur leur périphérie. Deux défauts majeurs de ce modèle : vu le faible engouement pour la quantification de l'albumine du rat, il n'existe pas de tests commerciaux - voire d'anticorps valables - pour cet antigène. Du reste, la formation du sphéroïde est sensible aux conditions expérimentales journalières, et sa lenteur (plus de 12 heures) rend l'expérience complète de mesure de sécrétome assez longue.
- **Monocytes humains pour mesure de lymphokine sur cellule unique.** En collaboration avec l'Hôpital Trousseau (Physiopathologie Des Maladies Génétiques d'Expression Pédiatrique - Inserm UMRS 933, 75012 PARIS), nous avons tenté de mesurer le sécrétome de cellules uniques, de façon assez similaire au travail de An et al. [74]. Ces cellules de lignées, des THP-1 humains, sont un modèle de cellules immunitaires activables par un agent oxydant de type LPS+ATP, qui sécrètent alors des lymphokines d'inflammation, parmi lesquelles l'IL-1 β [169]. Sur la vidéo dont on donne le lien (<https://figshare.com/s/5fc16815c73998a587ba>), on a piégé pendant 72 heures de telles cellules, activées ou non, dans la puce décrite par Amselem et al. [170]. Malgré les temps d'incubations longs et la petitesse du piège, les niveaux de détection du test sur bille ne permettent pas de détecter la sécrétion d'IL-1 β de ces cellules.
- **Fibroblastes pour l'étude du Senescent Associated Secretary Phenotype.** En entrant en contact avec l'unité d'Organisation Nucléaire et Oncogénèse (ONO) de l'Institut Pasteur, nous avons pu obtenir des cultures de fibroblastes pulmonaires foetaux WI-38. D'eux mêmes, ces fibroblastes ne sont pas particulièrement connus pour leur sécrétion de cytokine. En revanche, il

est possible d'induire artificiellement, par des agents oncogènes, le phénomène de vieillissement dans les fibroblastes [171]. Ce vieillissement est décorrélé de l'âge de la cellule ou de sa perte d'ADN au cours du temps. Dès lors, les cellules adoptent un Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence (SAPS), qui se distingue par la surexpression de très nombreuses cytokines [38, 172]. La formation de sphéroïdes sur ces cellules sénescents n'a pas pu être observée, malgré une bonne viabilité des cellules dans la goutte dans les 12 heures qui suivent le chargement microfluidique. Les niveaux de fluorescence observés sur les billes Luminex sont extrêmement faibles, indétectables sur la plupart des pièges.

C'est cette dernière piste qui nous a permis de trouver notre cible biologique. Il existe en effet une classe de cellule primaires, ressemblant à des fibroblastes, sensibles à la sénescence [173], et connues pour sécréter de nombreux facteurs hydrosolubles : ce sont les Cellules Souches Mésoenchymateuses. Dans le chapitre qui va suivre, nous allons réutiliser de concert les techniques de microfluidique du Chapitre 1, l'outil de mesure de cytokine développé dans ce chapitre, mais aussi toutes les techniques d'analyse d'image et de modélisation théorique déployées jusqu'à présent, en vue de quantifier la présence de cytokine dans le milieu de culture de sphéroïdes uniques.

Chapitre 3

Mesurer les sécrétions de sphéroïdes uniques

Alle Muscheln haben keine Perlen

Proverbe Allemand

Dans ce chapitre, nous mesurons les sécrétions d'un objet biologique particulier, le sphéroïde, qui résulte de l'agrégation spontanée de cellules entre elles. Pour ce faire, nous mobilisons le montage microfluidique vu au chapitre 1, dans lequel nous réalisons la quantification de cytokine comme nous avons appris à le faire au chapitre 2. Reste donc à parler de notre cobaye, la cellule souche mésenchymateuse (MSC), et à l'amener à former un sphéroïde viable dans une goutte fermée. Après une phase d'incubation où ce sphéroïde sécrète ses cytokines, on viendra étudier ses sécrétions, sa morphologie, et sa production intracellulaire de cytokine. Les travaux décrits dans ce chapitre sont le fruit d'un travail expérimental réalisé aux côtés du Dr. Sébastien Sart, et d'une étude théorique menée avec l'aide du doctorant Kévin Lippéra et de son superviseur Sébastien Michelin (Ladhyx, Département de Mécanique, Ecole Polytechnique, Palaiseau).

3.1 Former un sphéroïde de MSC

3.1.1 Du cordon à la goutte : voyage d'une MSC

Cellules Souches Mésenchymateuses

Au milieu des années 70, A.J. Friedenstein et collaborateurs [174] isolent dans la moelle osseuse d'individus adultes des cellules *précurseuses* ayant l'allure de fibroblastes. Retrouvées dans plusieurs autres tissus biologiques, à commencer par la gelée de Wharton, dans le cordon ombilical, ces cellules souches mésenchymateuses (MSC) sont une classe de cellules progénitrices suffisamment indifférenciées pour que soit possible la dérivation de leur phénotype vers ceux de types cellulaires spécifiques (voir Figure 3.1). A la fin des années 90, la re-découverte des MSC comme substitut aux cellules souches embryonnaires, peu appréciées de l'administration Bush [175], a généré un grand nombre d'études cliniques, qui cherchent à démontrer leur potentiel pour des thérapies cellulaires. Elles présentent en effet trois avantages majeurs pour la thérapie:

- **Auto-renouvellement.** Les MSC sont des cellules qui se divisent continuellement, supposément sans changer de phénotype. Elles peuvent donc être maintenues en culture pendant plusieurs jours voire plusieurs semaines.

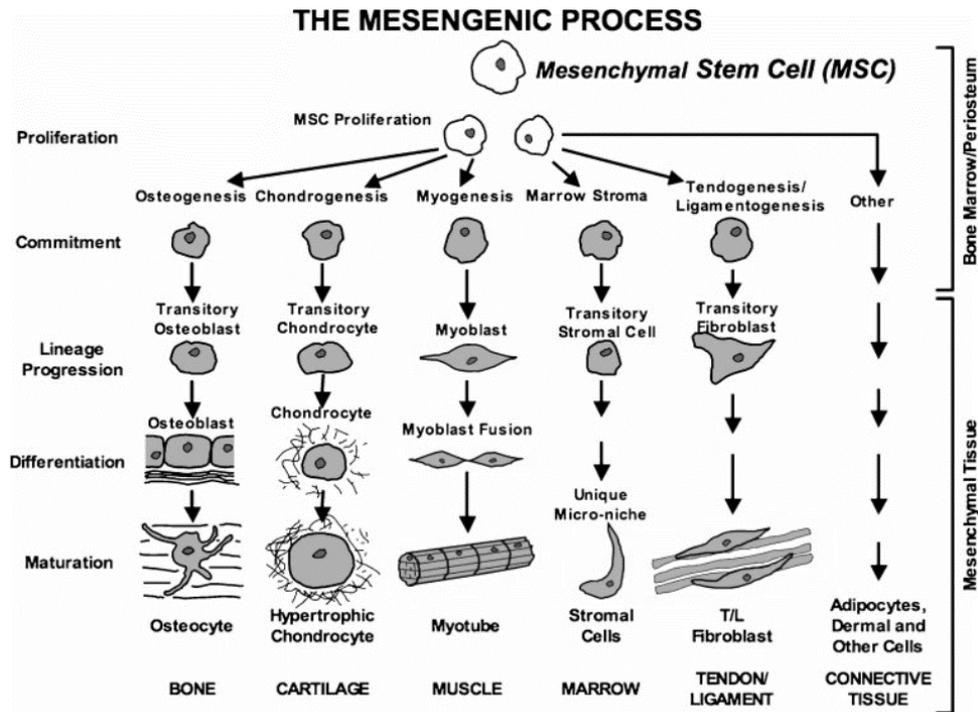


FIGURE 3.1: **Le processus mésengénique.** D'une population de cellules souches mésenchymateuses trouvée dans la moelle osseuse adulte, on peut produire des phénotypes de synthèse hautement spécifiques, allant de l'ostéoblaste à la cellule adipeuse. Tiré de [178].

- **Pluri-potence.** Sous réserve de fournir les bonnes conditions biochimiques ou mécaniques, les MSC sont capables de se différencier et de prendre par exemple le phénotype d'une cellule musculaire, adipeuse, ou osseuse [176].
- **Non-rejet.** Dans les premières études, on mettait en avant le fait qu'un patient pourrait être traité avec ses propres MSC, l'organisme ayant peu de chance de rejeter une de ses propres cellules. De façon plus générale, les MSC sont vues comme une source de facteurs trophiques [177], qui peuvent réduire la réponse immunitaire des cellules environnantes. Certaines études tendent d'ailleurs à montrer que l'on pourrait utiliser les MSC dans des cas de maladies immunitaires.

En 2011, l'administration Obama lève une partie des freins à la recherche sur les cellules embryonnaires, et l'on commence à reconsidérer le modèle des MSC. Bianco et al. remettent ainsi en question les conditions d'isolation et de culture des MSC in-vitro [179], mais aussi leur capacité réelle à se différencier et à prendre une place dans des tissus in vivo [180].

Sécrétions de MSC

Les MSC ne sont pas qu'un succédané de cellules souches embryonnaires, capables de se différencier et de se renouveler dans le temps. Ce sont surtout des cellules *bavardes*, qui sécrètent un grand nombre de molécules actives pour la croissance cellulaire, la réponse immunitaire, et le recrutement de cellules circulantes. Caplan et Correa [181] résument cette idée en qualifiant ces cellules de "pharmacie en cas de blessure" (Figure 3.2).

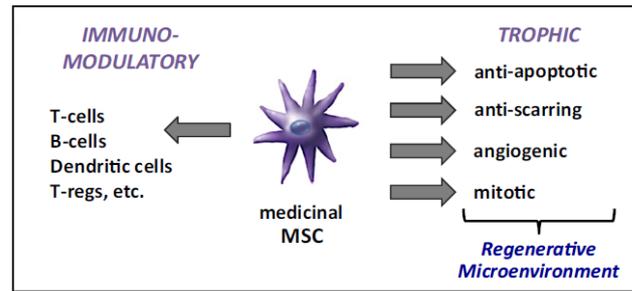


FIGURE 3.2: **La cellule-pharmacie.** Une MSC activée lors d'une blessure agit sur la réponse immunitaire, via les lymphokines, et produit des facteurs trophiques. Adapté de [181].

Si les MSC sont un outil reconnu de réparation des tissus [182], c'est qu'il est démontré qu'elles provoquent la vascularisation des tissus [183], par exemple ceux du coeur (Figure 3.3). Cette vascularisation passe par la sécrétion de VEGF [184, 185, 186], mais aussi de facteurs de croissance et de recrutement [185, 187, 188]. Dans le cas d'une ischémie cardiaque, Zhang et al. [189] montrent par exemple qu'une transplantation de MSC permet d'assurer la survie des tissus, via la production de la chimiokine SDF-1. On notera que l'expression de SDF-1 est induite par la présence de signaux inflammatoires comme $IL-1\beta$.

Plusieurs études mettent en évidence la production importante de cytokines immuno-régulatrices par les MSC, notamment via les interleukines comme $IL-1\beta$ [190, 187] ou $IL-2$ [191]. Par cette action immunitaire - qui fait très souvent l'objet de review [192, 182, 193] - les MSC parviendraient ainsi à inhiber la différenciation des lymphocytes B [194], à limiter la prolifération des lymphocytes T [195], et à maintenir les macrophages dans un état inactif [196].

Si cette capacité immuno-régulatrice est souvent mise en avant comme une solution pour limiter le rejet de greffes [191, 177], on notera qu'on la soupçonne aussi de favoriser la croissance de tumeurs [198]. En 2017, Jeon et al. [199] proposent une explication à ce retour de flamme immunitaire : lors de leur introduction in-vivo, les MSC s'organisent en 3D et adoptent un phénotype mésenchymateux *naïf*, plus proche de celui de la cellule souche originelle. Ce changement est discret : il concerne surtout l'expression des gènes et la production d'ARN, pas les marqueurs surfaciques, qui sont en général ceux que l'on teste pour évaluer des MSC. Dès lors, les MSC produisent un micro-environnement favorable à la croissance et à la vascularisation de tout type de tissu [200], même malin, tout en régulant vers le bas une réponse immunitaire contre ce tissu.

Aux doutes sur leur capacité réelle à se différencier évoqués plus haut, s'ajoutent donc des inquiétudes sur le potentiel thérapeutique des MSC in-vivo. Dans le chapitre qui va suivre, on ne cherche pas à évaluer le potentiel des MSC comme prochain stade de la thérapie cellulaire - laissons cela aux 967 études cliniques utilisant des MSC en cours aux Etats-Unis (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Mesenchymal+Stem+Ce>) - il s'agit seulement d'utiliser les MSC comme un modèle cellulaire capable d'une part de former des organoïdes 3D, et d'autre part de sécréter des quantités importantes de cytokines.

Sphéroïdes de MSC

Comparée aux conditions de culture classiques, en monocouche, sur plastique, la culture en 3D altère les propriétés des MSC sur le long terme [201]. Les MSC, si les

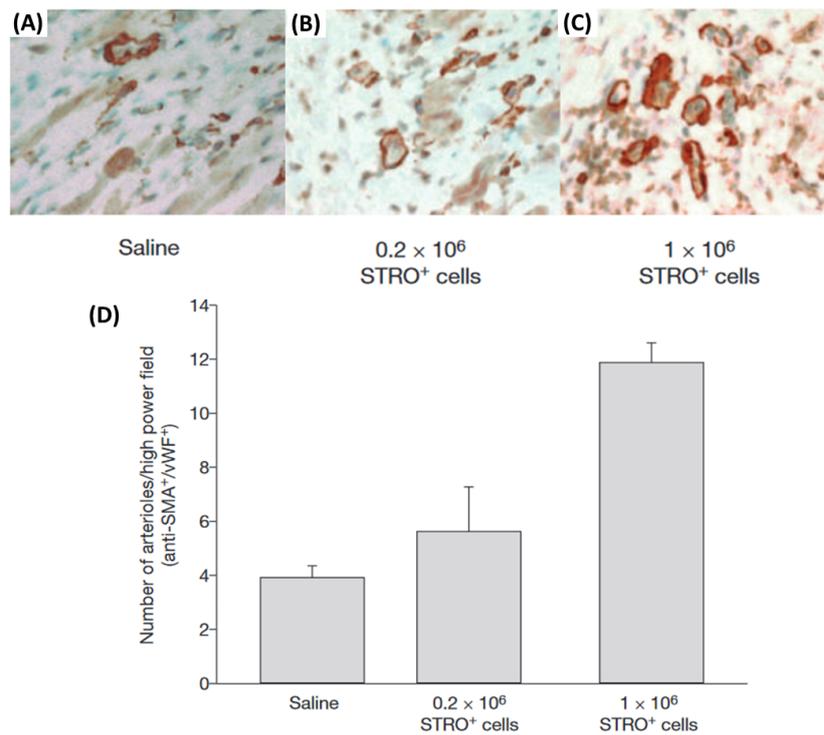


FIGURE 3.3: **Vascularisation de tissus cardiaques induite par la présence de MSC.** (A-C) Coupe histologique de tissus cardiaques. Les tissus immuno-marqués en rouge sont des fragments d'artérioles et de capillaires. Des rats immuno-déprimés ont été soumis à des injections de MSC ("STRO" comme stromal) en concentration variables, puis tués à D+7. (D) Un comptage mené dans les tissus analysés révèle un nombre trois fois plus important de capillaires dans les cobayes soumis aux plus hautes concentrations en MSC. Adapté de [197].

conditions sont favorables, peuvent en effet s'agréger spontanément en structures 3D de quelques centaines à quelques milliers de cellules. Leurs capacités de sécrétion et de différenciation s'en trouvent augmentées, leur potentiel thérapeutique tout autant [187]. Cette agrégation allonge leur viabilité, leur permet de conserver leur caractère pluripotent [202], et réactive les mécanismes responsables de leur action paracrine [203, 204].

Pour former de telles structures 3D, que l'on appelle *sphéroïdes* plusieurs méthodes sont apparues ces dix dernières années [205]. On passera rapidement sur les méthodes macroscopiques de type *spinner flask*, dans lesquelles de vastes suspensions de cellules tournoient pendant plusieurs heures jusqu'à agrégation, et qui produisent des sphéroïdes de tailles et de formes variables [202]. Les techniques les plus utilisées sont aujourd'hui mésoscopiques, la formation des sphéroïdes s'effectuant dans quelques centaines de microlitres de milieu de culture, sur un substrat non adhérent et concave (type AggreWell®) pour faciliter la rencontre et l'adhésion des cellules entre elles. De telles conditions de culture produisent des sphéroïdes relativement monodisperses en taille, larges de typiquement quelques centaines de micromètres, pouvant être viables sur 2 à 7 jours sous réserve de renouvellement du milieu de culture [206].

Du fait de leur taille et de leur compacité, le cœur de ces sphéroïdes est cependant susceptible de souffrir d'un manque d'oxygène et de nutriments, qui diffusent avec difficulté jusqu'aux cellules du centre. Aleksandrova et al. [207] ont montré par le calcul et l'expérience que des sphéroïdes de plus de 10.000 cellules cancéreuses manquent d'oxygène en leur centre, perdent en viabilité, et sécrètent moins d'albumine (Figure 3.4A-B). Dans le cas des MSC, l'existence d'un cœur nécrotique au centre du sphéroïde est contestée. Même pour des sphéroïdes de plusieurs dizaines de milliers de cellules, Murphy et al. [208] continuent à détecter de l'oxygène et des cellules vivantes jusqu'au cœur des agrégats (voir Figure 3.4C et D). Sur la Figure 3.4D, on décrit ainsi un sphéroïde composé de 60.000 cellules, mesurant 500 μm de diamètre, viable, et ne présentant pas de marqueur d'hypoxie. L'explication tient sans doute au métabolisme des MSCs, beaucoup moins oxydatif que celui de cellules cancéreuses [209, 210].

À la frontière de la microfluidique, de nombreuses équipes utilisent les Gouttes Pendantes (*hanging drops*). Dans ce type de système, des centaines de gouttes de quelques dizaines de microlitres sont piégées par capillarité au dessus d'une boîte de Pétri [212]. Du fait de la gravité, la goutte adopte une courbure naturelle qui favorise la formation des sphéroïdes. Dans le système décrit Figure 3.5, Frey et al. [211] commencent à paralléliser et à automatiser massivement la culture en gouttes pendantes, avec un réseau de canaux et de systèmes d'injection. Le volume de chaque goutte descend jusqu'à 10 μL . À l'heure actuelle, les Hanging Drops semblent être le système le plus utilisé pour produire des sphéroïdes.

Produire des sphéroïdes plus petits - et en grand nombre - nécessite la manipulations de volumes inférieurs au microlitre, sur des systèmes de taille typique inférieure au millimètre. Quelques études de microfluidique se sont ainsi penchées sur la culture de sphéroïdes de MSC : on citera par exemple Ochetta et al. [213], qui parvient à suivre la formation du sphéroïde, à mesurer la prolifération des cellules, puis à provoquer leur différenciation. Jackson-Holmes et al. [214] vont plus loin deux ans plus tard, en piégeant des agrégats relativement monodisperses dans des pièges hydrodynamiques (décrits dans la Section 1.4), puis en étudiant leur grossissement sur une semaine.

3.1.2 Dynamique de compaction : de l'agrégat au sphéroïde

Nous voulons cultiver en microfluidique des sphéroïdes de MSC de quelques centaines de cellules. Dans la puce microfluidique décrite à la Section 1.4, on génère des gouttes d'agarose liquide contenant une suspension de MSC à $4,2 \cdot 10^6$ cellules

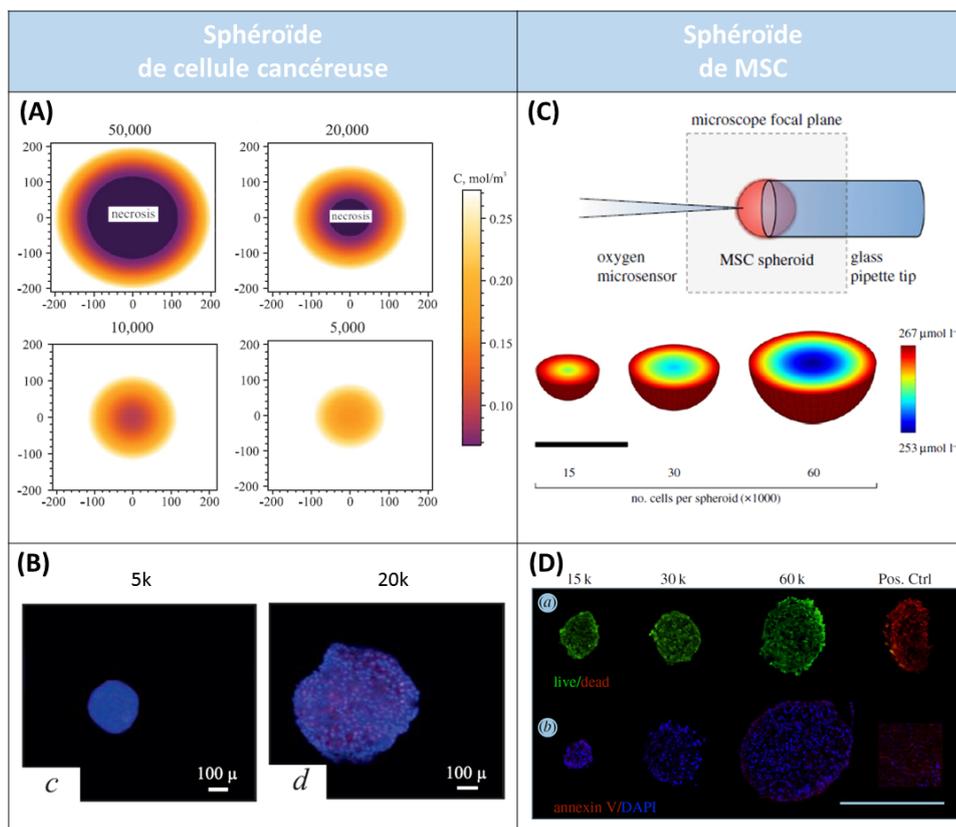


FIGURE 3.4: **Approches théoriques et expérimentales de l'hypoxie dans les sphéroïdes.** (A) Modèle théorique analytique de diffusion de l'oxygène dans un sphéroïde de cellule tumorale HepaRG : à partir d'une taille critique (10^4 cellules), une zone nécrotique est attendue du fait de l'hypoxie au centre de l'agrégat. (B) Et en effet, des sphéroïdes observés avec du PI présentent un cœur de cellules nécrosées (en rouge). Adapté de [207]. (C) Murphy et al. [208] mesurent un gradient d'oxygène qui n'atteint jamais de valeur plateau au sein de sphéroïdes de MSC, trahissant la présence de cellules vivantes au cœur du sphéroïde, ce qui est confirmé en ICC (D), par marquage Live/Dead et marqueur d'hypoxie.

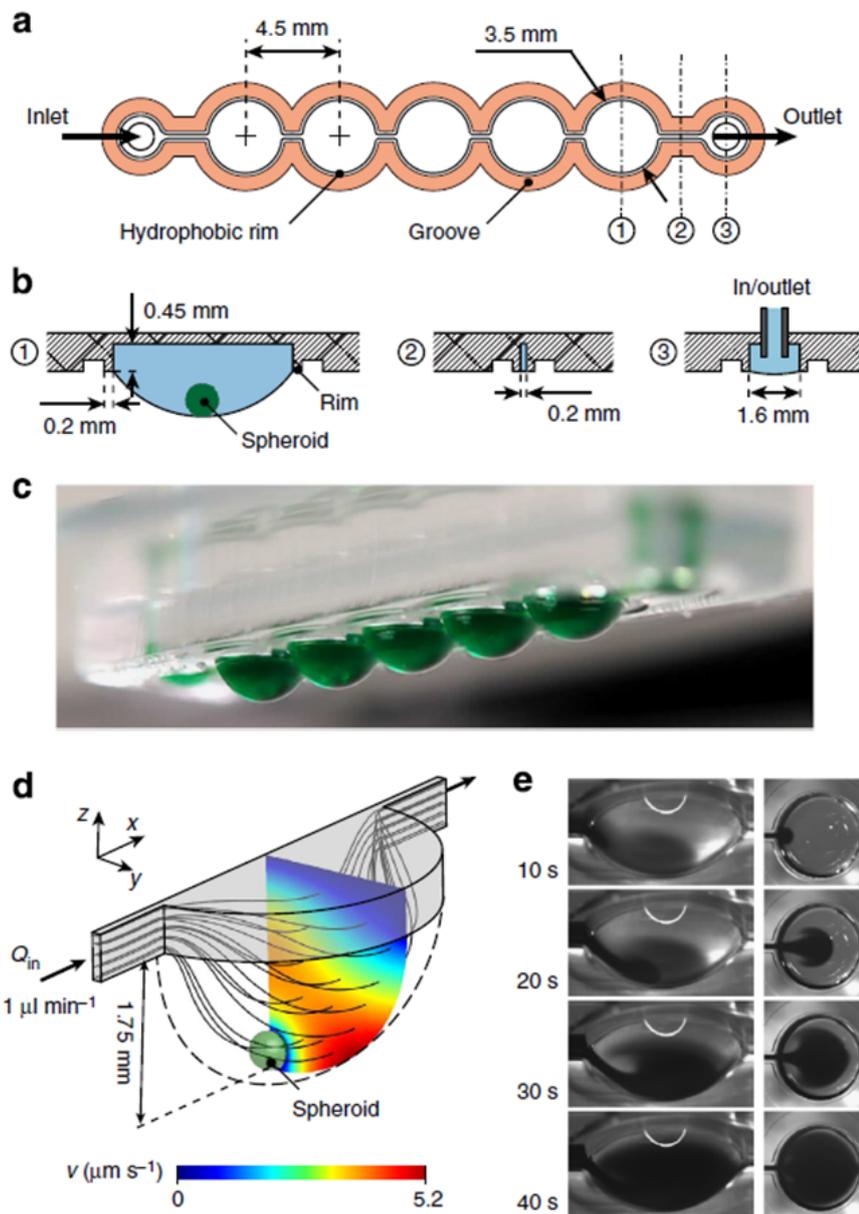


FIGURE 3.5: **Hanging Drops, culture de sphéroïde à une échelle mésoscopique.** (A) Vue de haut d'une série de 5 gouttes pendantes pour la culture de sphéroïdes. (B) Vues en coupe à trois endroits : les gouttes sont reliées par des canaux micrométriques. (C) Photographie du montage, qui permet de renouveler le milieu sans affecter le sphéroïde. (D) Simulation du profil de vitesse à l'intérieur de la goutte pendante. (E) Chronophotographies montrant la rapide homogénéisation d'un colorant par une injection à faible débit. Adapté de [211].

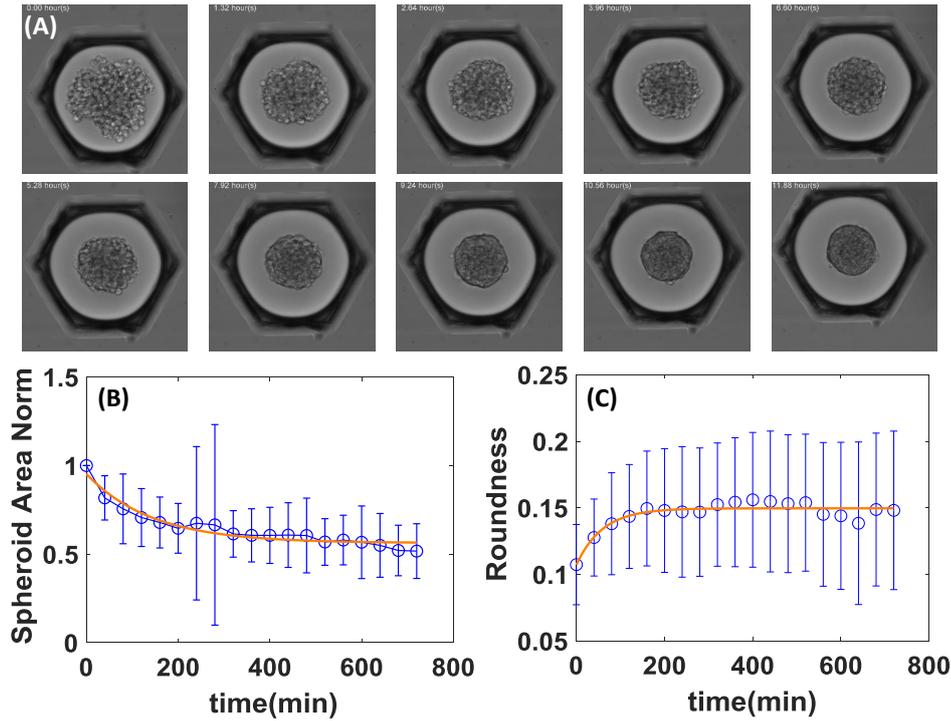


FIGURE 3.6: **Organisation dynamique des MSC en sphéroïde.**

(A) Chronophotographie d'un piège contenant des MSC. (B) Évolution de l'aire apparente et (C) de la circularité de l'agrégat au cours du temps. $N=270$ sphéroïdes. L'aire de l'agrégat est normalisée par l'aire initiale mesurée dans chaque piège. La circularité est définie comme l'aire A de l'agrégat divisée sur 4π fois son périmètre au carré.

par millilitre. Chaque goutte de 50 nL contient en moyenne 210 cellules (<https://figshare.com/s/141b96469a9c6272e3f7>). Une fois piégées dans les pièges capillaires, les débits liquides sont arrêtés. Les cellules sédimentent au fond de la goutte sous l'effet de la gravité. En observant alors l'évolution de l'agrégat cellulaire au cours du temps (Figure 3.6A), il apparaît que les cellules forment spontanément, en deux ou trois heures une structure 3D, puis, au cours des heures suivantes, se compactent jusqu'à former une sphère aux bords extrêmement nets (voir aussi la vidéo <https://figshare.com/s/193a59789446e12ce835>).

Par analyse d'image, on peut détecter uniquement la silhouette de l'agrégat, et représenter, en fonction du temps, quelques-uns de ses paramètres géométriques. Sur la Figure 3.6B, on constate ainsi que l'aire apparente de l'agrégat diminue de 40% pendant les 4 premières heures d'incubation, puis continue de décroître en pente douce dans les heures suivantes. Un comportement similaire se lit sur l'évolution de la rondeur des sphéroïdes, que l'on définit comme $Roundness = 4\pi^2 Aire / Perimetre^2$ (de sorte qu'un cercle parfait ait une roundness de 1). Le sphéroïde met un peu moins de 3 heures pour parvenir à une valeur plateau de rondeur. Notons que si cette valeur diffère de 1 (qui correspond au cas d'un cercle parfait), c'est que la rugosité de la surface trompe l'analyse d'image lors de la mesure du périmètre. Ce qui n'empêche pas de conclure : un sphéroïde de MSC met entre 3 et 4 heures pour se former à partir d'une suspension de cellules.

Les sphéroïdes présentent une hétérogénéité de taille. Sur une même puce, on peut ainsi représenter la distribution des rayons de sphéroïdes après 12 heures d'incubation (Figure 3.7). La distribution est piquée autour d'un rayon de 96 μm . Le rayon moyen

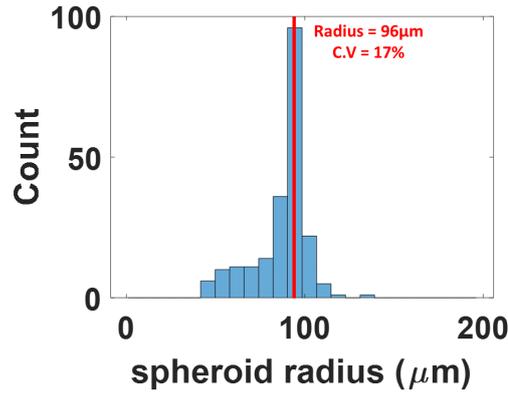


FIGURE 3.7: **Distribution de taille des sphéroïdes.** Histogramme des rayons de sphéroïdes 14h après la formation des gouttes, obtenu par analyse d'images. Le trait rouge ne correspond pas à la moyenne de la distribution mais à la position du pic principal. $N=270$ sphéroïdes.

est évalué à $87 \mu\text{m}$, avec une STD de $15 \mu\text{m}$, ce qui représente une variation de 17.5%. Sur la distribution présentée, on constate une asymétrie assez forte vers les petites valeurs de rayon, que l'on peut évaluer par le troisième moment de la distribution (*skewness*), qui vaut -1.07 .

Comment expliquer une telle dispersion de taille, alors que l'on introduit une suspension de cellule homogène dans des gouttes microfluidiques supposément monodisperses ? Trois raisons peuvent être invoquées. Premièrement les gouttes microfluidiques présentent une légère dispersion de taille, de l'ordre de 5% mesurée sur le rayon de la goutte. Un calcul d'incertitude indique une variabilité de 15% sur le volume des gouttes. De fait, la distribution des cellules dans les gouttes varie aussi de 15%, on a donc :

$$N_{\text{cells/goutte}} = 210 \pm 32 \text{ cellules} \quad (3.1)$$

A cela s'ajoute les problèmes d'agrégation des cellules dans la seringue qui les injecte : au cours du temps, on constate en effet que la suspension de cellules uniques qui entre dans la puce se convertit en suspensions de doublets de cellules, voire en suspensions de petits agrégats. Il convient également de noter que les cellules sont elles-mêmes dispersées en taille, ce qui rajoute un biais sur la taille finale de l'agrégat. On montre Figure 3.8 une mesure indirecte, par cytométrie de flux, de la taille des MSC : cette population a certes une distribution de taille normale et centrée, mais montre le coefficient de variation (CV) de cette distribution (36%) est élevé.

En jouant sur la concentration de cellules dans la suspension, il est possible de moduler légèrement la taille du sphéroïde, comme le montre la Figure 3.9. Comme précédemment, les distributions de rayons des sphéroïdes obtenus sont toujours centrées sur une valeur moyenne, ont des CV autour de 17%, et des skewness répétitivement négatives, dénotant l'existence systématique de sphéroïdes plus petits que de raison. On constate qu'une variation d'un facteur 6 sur la concentration de cellules ne change le rayon typique que d'un facteur 2. Ce résultat est attendu : en augmentant le nombre de cellule, on agit en fait sur le volume de l'agrégat - la variation de rayon correspondante s'écrit :

$$\frac{\Delta V}{V} = \frac{4/3\pi(3R^2)\Delta R}{4/3\pi R^3} = 3 \frac{\Delta R}{R} \quad (3.2)$$

En supposant que volume et nombre de cellules sont proportionnels, faire varier le nombre de cellules d'un facteur 6 influence donc le rayon d'un facteur $6/2$. En pratique,

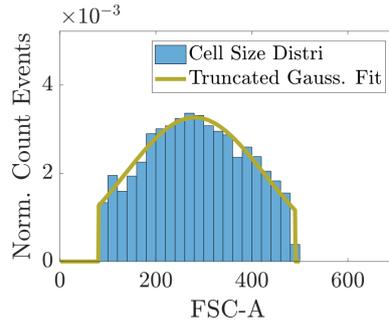


FIGURE 3.8: **Une population de cellules primaires hétérogène en taille.** Histogramme des valeurs de Forward Scatter (FSC) obtenu en cytométrie de flux, traduisant la dispersion en taille d'une population de MSC n'ayant pas subi la microfluidique. $n = 3868$ événements retenus. $CV = 36.48\%$.

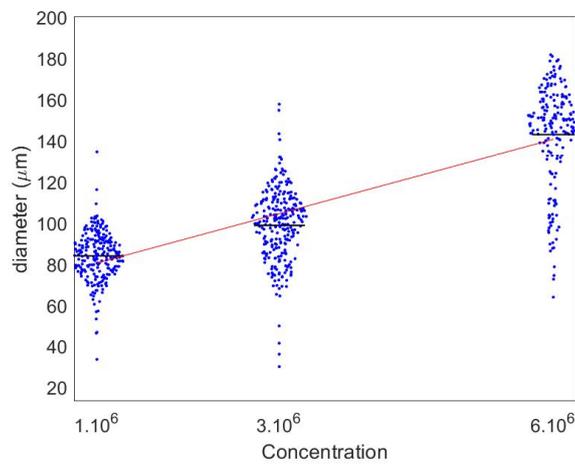


FIGURE 3.9: **Contrôle de la taille du sphéroïde par la concentration en cellules.** Diamètre du sphéroïde mesuré par analyse d'image, en fonction de la concentration initiale de cellules dans la phase aqueuse qui forme les gouttes. $N = 247 + 268 + 215$ sphéroïdes. Fit affine pour la visualisation.

cela signifie que la distribution de taille des sphéroïdes dans la puce est un paramètre relativement bien maîtrisé, sous réserve que les cellules conservent leur morphologie d'une expérience à l'autre.

En guise de bilan de cette première partie expérimentale, nous disposons maintenant de sphéroïdes de MSC, de taille contrôlée et relativement monodisperse, répartis dans un tableau de 252 gouttes à l'intérieur de notre puce microfluidique (Figure 3.10). D'une population cellulaire hétérogène ayant un C.V proche de 40%, distribuée dans des gouttes imparfaitement monodisperses (15% de variabilité sur le volume), notre plateforme microfluidique parvient à tirer une population de sphéroïdes de taille relativement homogène, ayant un CV de 15%. Voyons à présent si cette condition de culture est viable dans le temps.

3.1.3 Viabilité dans notre puce microfluidique

On l'a dit, la viabilité des sphéroïdes cultivés dans des conditions classiques est souvent compromise par des problèmes de diffusion et de manque de nutriments. Dans notre système microfluidique, la petite taille des sphéroïdes est censée limiter les problèmes

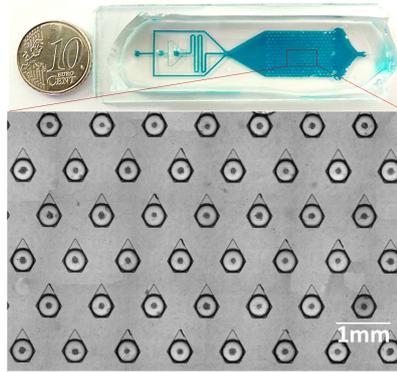


FIGURE 3.10: Un tableau de sphéroïdes de MSC.

de diffusion au sein de l'agrégat. Reste que la petite taille de la goutte limite également la quantité de nutriment disponible pour la survie des cellules.

Il convient donc de tester la viabilité de nos sphéroïdes de MSC dans leurs compartiments au cours du temps. Quatre heures, 24 heures, et 48 heures après l'introduction des cellules dans la puce, on apporte un tampon fluorescent pour détecter la présence des cellules mortes. En fait de contrôle, on comparera avec une puce où les sphéroïdes sont mis en contact avec un agent cytotoxique quelques heures avant la mesure.

Sur les photographies de la Figure 3.11A-C, on peut immédiatement remarquer qu'une majorité de cellules restent négatives à l'agent de détection de la mort cellulaire (PI), et ce, pendant les 48 heures de leur vie en goutte. Sur la Figure 3.11C, on commence à voir apparaître quelques cellules mortes dans le centre du sphéroïde. Mais en comparaison, le contrôle de mortalité (Figure 3.11E) apparaît beaucoup moins viable.

Ces observations qualitatives peuvent être appuyées par de l'analyse d'image, en mesurant la surface marquée "morte" pour chaque condition, sur quelques centaines de sphéroïdes. Sur la Figure 3.11D, on compare ainsi le nombre de pixel positifs au PI pour les différents temps d'incubation, et en comparaison avec un contrôle 100% mort. La valeur médiane du nombre de pixels morts est stable autour de 10^3 pixels dans chaque sphéroïde. La différence de viabilité à D+2, 48 heures après chargement microfluidique, est jugée non significative par les tests statistiques. A titre indicatif, si l'on donne la surface moyenne qu'occupe une cellule sur nos images $s \approx 80$ pixels, on peut déduire qu'en moyenne une douzaine de cellules sont décédées dans nos sphéroïdes. On notera la présence d'outliers correspondant à des sphéroïdes complètement morts dans les puces à D+2. Expérimentalement, ces sphéroïdes se trouvaient au niveau d'une bulle d'air, ce qui a pu perturber leurs conditions d'incubation, et induire de la mort cellulaire. La nucléation de bulles d'air dans la puce est difficile à éviter aux temps d'incubation longs : ces outliers traduisent donc une réalité expérimentale.

Autre information importante tirée de ces expériences de viabilité, notre incapacité à assurer la viabilité du sphéroïde après une fusion de goutte à l'aide du perfluorooctanol (PFO) : comme dit dans la Section 1.4.3, le PFO est en effet utilisé pour remplacer le surfactant de la surface des gouttes et induire la coalescence de deux gouttes piégées et en contact. L'incubation des sphéroïdes dans ce PFO induit un fort signal de mort cellulaire. Cette perte de viabilité est également évoquée dans la littérature, par exemple par Kleine et al. [215] qui perd 30% des cellules encapsulées dans des gouttes d'agarose en présence de 50% de PFO. Identiquement, on peut également vérifier que l'utilisation d'un pistolet électrostatique induit de la mort cellulaire.

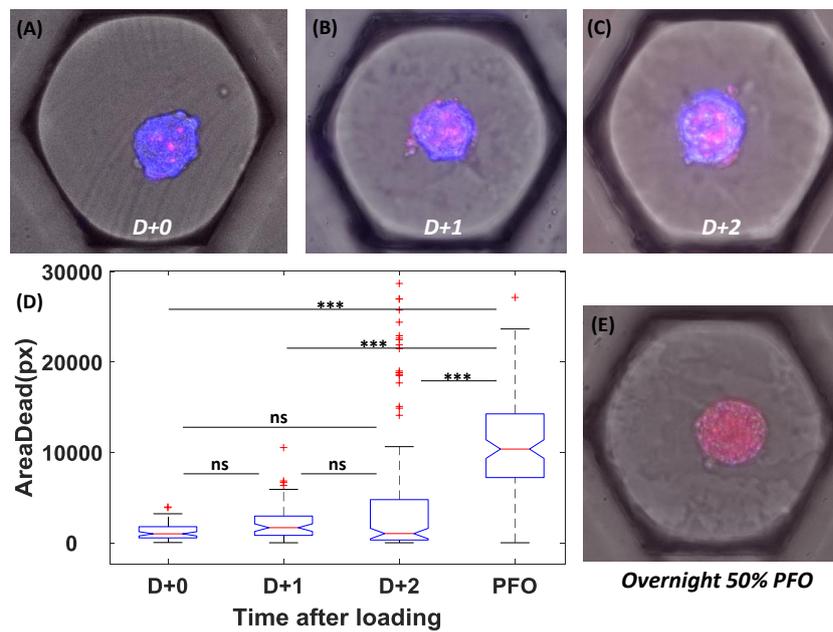
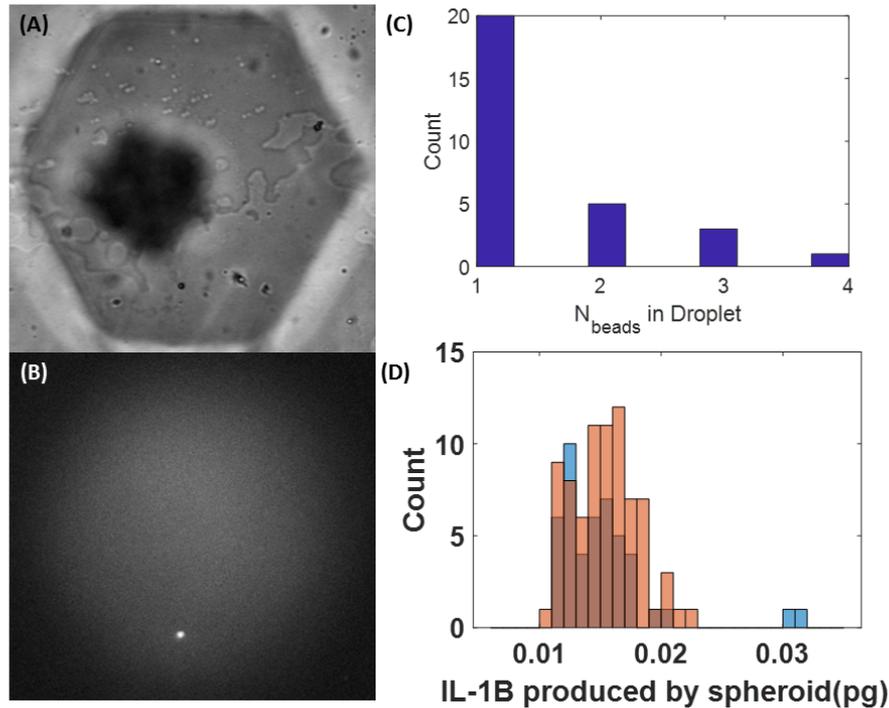


FIGURE 3.11: **Viabilité des sphéroïdes de MSC dans des gouttes fermées.** Photographies composites de fluorescence et de lumière blanche, sur des sphéroïdes dont les cellules ont été introduite dans la puce depuis 4h(A), 24h(B), et 48h(C). Le bleu marque les noyaux de toutes les cellules, le rouge seulement le cytoplasme des cellules mortes ou en voie de mourir. (D) Évolution de l'étendue du signal fluorescent rouge (Dead) pour les différentes conditions de culture et temps d'incubation. (E) Sphéroïde-témoin, traité au PFO 50% dans l'huile HFE pendant une nuit. N=394 sphéroïdes.



la vidéo <https://figshare.com/s/ccefaaddb15f628ef87a>). Les billes sont immobilisées dans le gel d'agarose et ne sédimentent pas au côté du sphéroïde, rendant relativement simple le traitement de l'image (voir Figure 3.12A-B). Typiquement, sur une seule puce, une cinquantaine de pièges sont utilisables pour la mesure finale, mais ce nombre augmente quand l'efficacité de piégeage et la quantité de billes dans les gouttes secondaires augmentent.

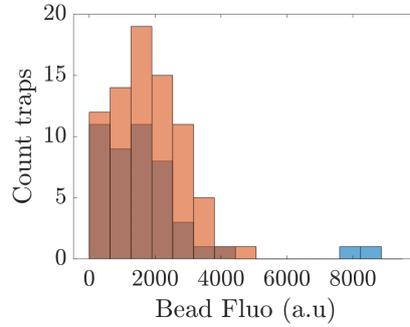


FIGURE 3.13: **Distribution de fluorescence des billes.** Histogrammes des valeurs de fluorescence dans deux réplicats biologiques. La fluorescence correspond au maximum du pic des billes auquel on soustrait le background lumineux local. $N = 46 + 78$ pièges.

Après imagerie, on obtient ainsi une distribution de fluorescence brute des billes pour une expérience en puce donnée (Figure 3.13). Il est difficile de parler de cette distribution car elle est tronquée dans ces valeurs basses par le fort background lumineux que l'on soustrait assez grossièrement. Cette distribution est traduite via la courbe de calibration produite au chapitre précédent, pour obtenir une valeur de masse d'IL-1 β produite par chaque sphéroïde. Typiquement, notre test indique que les sphéroïdes produisent dans la goutte une masse d'IL-1 β de 17.8 fg, avec une variation de 17 et 23% selon le réplicat biologique considéré. Ramené aux 210 cellules qui composent le sphéroïde, cela correspond à une sécrétion de 8×10^{-2} fg par cellule en 24h.

Evaluons d'abord la pertinence du résultat biologique, à savoir la production de typiquement 20 fg d'IL-1 β par les sphéroïdes de hMSC (Tableau 3.1). Si l'on en croit la littérature un sphéroïde de MSC élevée en 3D produit typiquement 4 pg/mL dans 100 mL en 72 heures. Ramenée à une sécrétion par cellule et par heure, on remarque que notre estimation est dans le même ordre de grandeur que celui de Bartosh et al. [203]. Le taux de sécrétion mesuré sur puce est légèrement plus bas que celui en gouttes pendantes, ce qui tendrait à décrire un système biologique moins stressé, produisant moins de facteur d'inflammation. Dans la puce microfluidique, les transports de gaz, O₂ notamment, se font très facilement, via le PDMS et via l'huile fluorée qui le transporte très bien [216]. Il est donc possible que le stress induit par hypoxie sur nos sphéroïdes soit plus faible qu'en gouttes pendantes.

Quelques mots pour conclure : nous avons ici présenté le premier résultat d'immuno-essais pratiqués en microfluidique sur des sphéroïdes individuels. Ces immuno-essais nous donnent une valeur de sécrétion pour la cytokine inflammatoire IL-1 β , valeur comparable à celles de la littérature des MSC. Ce que nous voulons maintenant, c'est d'une part montrer qu'il est aisé de généraliser ces tests pour n'importe quel antigène, et, d'autre part, que l'on peut mesurer d'autres observables sur nos sphéroïdes, comme leur morphologie ou leur expression intracellulaire de protéines.

	Hanging Drop	Double Trap micro-chip
	Bartosh et al. Stem Cells (2013)	Equipe PuB (2018)
Number of cells per spheroid	typically 1.000 cells	210 cells \pm 32
Volume of supernatant	100 uL	50 nL
Incubation time	3 days	1 day
Read out Concentration	4 pg/mL	-
Produced Mass of IL-1β	0.4pg	0.0178pg
Mass per cell per day	0.13fg	0.085fg

TABLE 3.1: **Sécrétions d'IL-1 β , comparaison avec la littérature.** Chiffres tirés de [203]

3.2.2 Mesures de VEGF : Calibrations

Dans ce paragraphe, on s'intéresse à une autre cytokine abordée dans le Chapitre 1.1, le VEGF. Comme dans le cas d'IL-1 β , on calibre notre montage pour trouver la gamme dynamique de concentrations auxquelles nos billes commerciales sont sensibles une fois placées en gouttes microfluidiques.

On commence par réaliser une mise à l'échelle du test basée sur les volumes et le nombre de billes utilisés (voir Tableau 3.2). Pour conserver la quantité d'antigène par bille, les faibles volumes impliqués en microfluidique font que notre test est sensible à des concentrations plus fortes, comprises entre 10^3 et 10^7 pg mL $^{-1}$. On discutera à loisir des temps d'incubation nécessaires à notre test dans la dernière partie de ce chapitre.

Forts de ces observations, on étalonne notre montage, en introduisant dans la goutte principale des quantités connues de VEGF, et, dans la seconde goutte, des billes anti-VEGF et une solution contenant un anticorps de détection biotinylé et de la streptavidine émettant de la fluorescence dans le rouge (Figure 3.14A-B). Après une nuit dans un incubateur, on constate que les billes se sont chargées de molécules fluorescentes, au prorata de la concentration initiale en VEGF.

On localise les billes grâce à un signal fluorescent "code-barre" intrinsèque au matériau, en utilisant la méthode de détection mise en place dans la Section 2.3, avec le code donné en Appendice C. Ce code-barre nous permet de créer un masque logique qui ne prend en compte que les billes sur l'image du piège. A travers les trous de ce masque on mesure la fluorescence VEGF-dépendante. Sur la Figure 3.14D, on représente cette fluorescence F en fonction de la concentration c . Pour traduire la forme sigmoïde constatée en échelle semilogx, la fonction-modèle utilisée est :

$$F(c) = b_1 + \frac{b_4}{1 + e^{-b_2(\log(c)-b_3)}} \quad (3.3)$$

Cette forme de modèle est analogue à celles proposées dans la littérature, présentées sous forme développée, et appelées Régressions Logistiques à 4 Paramètres (4PL) [217].

A ce stade, on dispose d'une relation entre la concentration de VEGF dans la goutte principale et le signal de fluorescence obtenu en fin d'immuno-essai. Utilisons ce test sur des sphéroïdes de MSC.

3.2.3 Mesures de VEGF : Mesures à différents temps

On souhaite obtenir trois mesures ponctuelles de sécrétion, à des temps différents de la vie du sphéroïde. Pour cela, on se propose à nouveau d'introduire des MSC sous

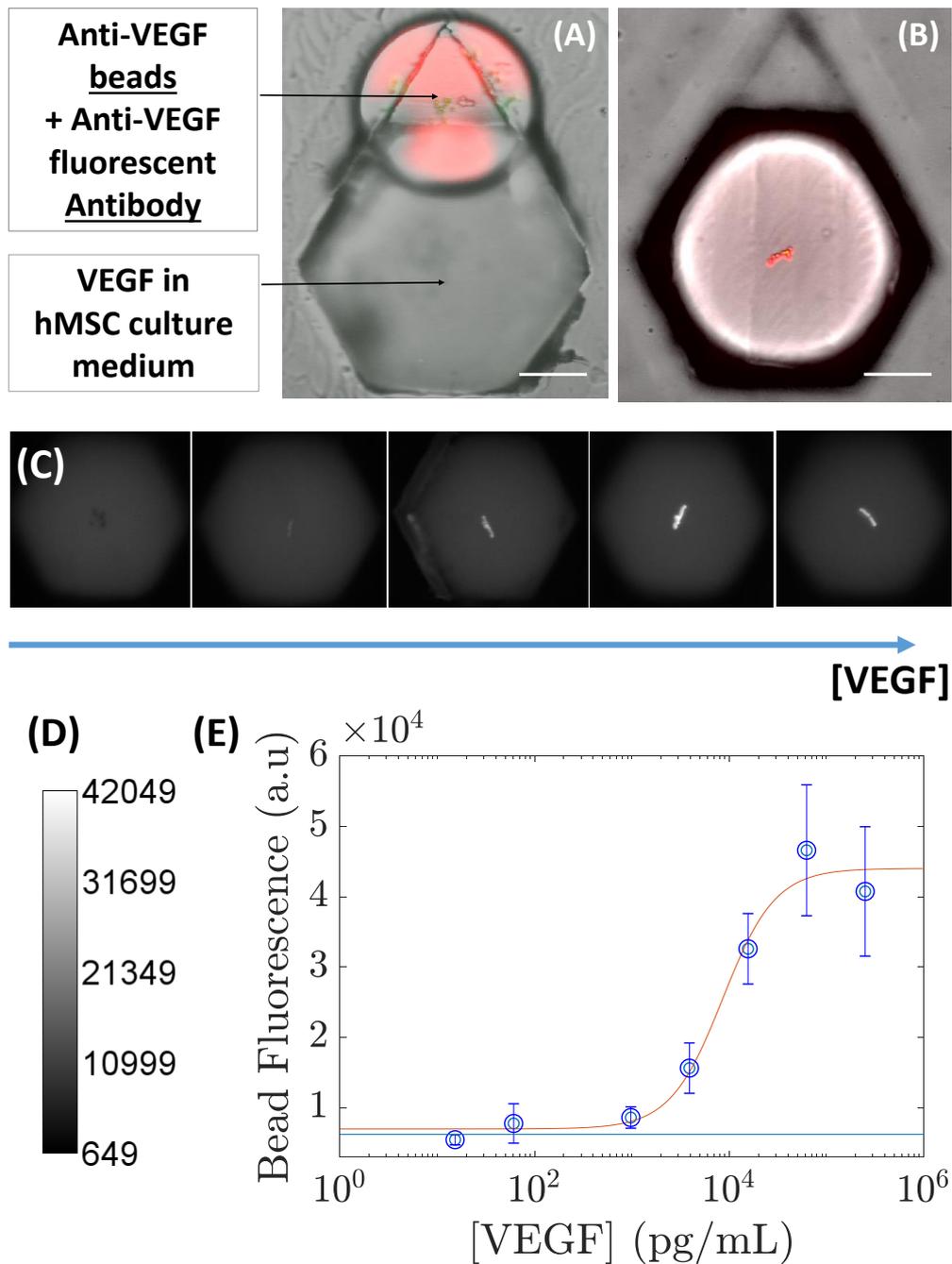


FIGURE 3.14: **Calibration de l'expérience microfluidique pour la quantification de VEGF.** (A) Vue de haut du montage de calibration : la goutte la plus grosse contient du VEGF à des concentrations connues entre 10^3 et 10^5 pg mL^{-1} , la plus petite contient des billes anti-VEGF, et des anticorps fluorescents anti-VEGF. (B) Une nuit après la fusion, microphotographie des billes qui ont réagi avec une concentration de $3.10^5 \text{ pg mL}^{-1}$ de VEGF. Dans (A) et (B), les images combinent les signaux en lumière blanche et en fluorescence. (C) Fluorescence typique sur des billes ayant réagi avec $(0, 1.95, 7.81, 31.25, 125.0, 500.0) \cdot 10^4 \text{ pg mL}^{-1}$, et (D) colormap associée. (E) Fluorescence moyenne mesurée sur les billes en fonction de la concentration de VEGF dans la grosse goutte. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. $N > 70$ pièges par condition de concentration. La ligne bleue traduit le signal mesuré à concentration nulle. Fit 4PL avec $b_1 = 6.9775e + 03$, $b_2 = 3.7183$, $b_3 = 3.9338$, et $b_4 = 3.7045e + 04$.

	classic. Measures	in-Drop Meas.
Num. of beads per assay	≈ 100	≈ 5
Vol. sample	150 μ L	50 nL
Incubation time	2x2h	4h
Recommended VEGF Conc. (pg/mL)	[5.10^0 to 2.10^4]	[1.10^3 to 6.10^6]

TABLE 3.2: **Adapter un test de quantification de VEGF.** Entre le test classique en plaque 96 puits et notre mesure en goutte, les différences de volume et de quantité de réactif sont vouées à décaler la gamme de concentrations à laquelle nous serons sensibles.

forme de suspension dans des gouttes. On fait alors varier le temps d'incubation des sphéroïdes ainsi formés : les billes et les anticorps ne sont amenés par fusion qu'après 4, 24 ou 48 heures. La mesure de la fluorescence sur les billes a lieu 15 heures après cette fusion. Toujours en utilisant l'analyse d'image, on peut relier chaque piège où des billes sont visibles à une valeur de fluorescence. Dans une seule puce, on peut ainsi obtenir entre 60 et 120 mesures de sécrétion, en fonction de l'efficacité du piégeage de la goutte secondaire.

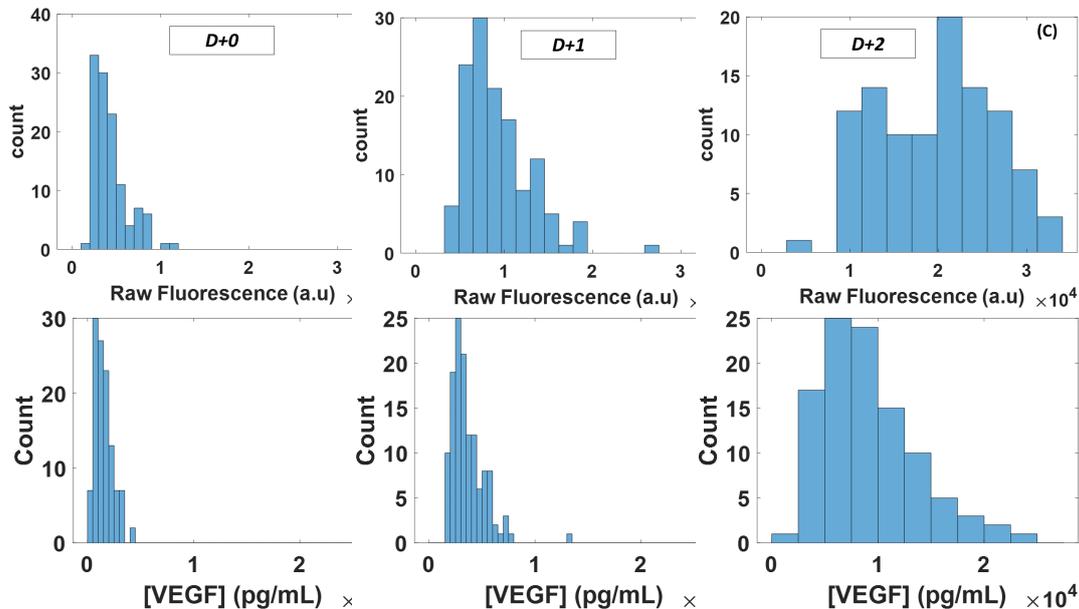


FIGURE 3.15: **Distribution intra-puce de niveaux de sécrétion.** (A-C) Distributions typiques de fluorescence brute mesurée dans des puces uniques, dans lesquelles les sphéroïdes ont été incubés pendant 4, 24 et 48 heures avant l'introduction des billes. (D-F) Distributions typiques de concentration de VEGF dans les mêmes puces, obtenues après utilisation de la courbe d'étalonnage. $N=117, 129, 103$ pièges.

Sur les Figures 3.15A-C, on représente ces mesures de fluorescence sur les billes, chaque histogramme correspondant à une puce donnée en exemple pour un temps d'incubation donné. On remarque immédiatement que ces distributions sont centrées, non-gaussiennes, avec une asymétrie vers les hautes valeurs de fluorescence dans le cas des incubations de 4h et de 24h. On peut représenter la moyenne et le coefficient de variation (CV) de telles distributions selon le temps d'incubation (Figure 3.16), et montrer d'emblée l'augmentation générale de la quantité de VEGF dans la goutte au cours du temps. On observe un doublement de la fluorescence à chaque jour passé en incubation. En considérant la courbe de calibration vue plus haut, et établie dans les mêmes conditions optiques, on peut traduire ces mesures de fluorescence en

valeurs de concentration de VEGF sécrété (Figure 3.16B). Ces mesures montrent que la concentration de VEGF dans les gouttes varie de 2×10^3 pg mL^{-1} à 12×10^3 pg mL^{-1} en l'espace de 48 heures. Même si les distributions paraissent de plus en plus larges, leur CV reste en fait constant autour de 40%.

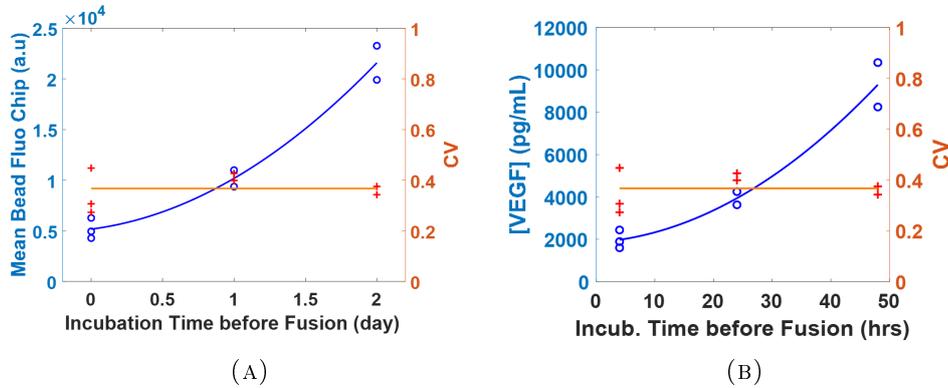


FIGURE 3.16: **Des mesures sur des puces entières contenant un tableau de sphéroïdes.** (A) Évolution temporelle de la valeur moyenne de fluorescence mesurée sur les billes, ainsi que du coefficient de variation. (B) Évolution temporelle de la concentration moyenne de VEGF mesurée sur les billes, ainsi que du coefficient de variation. (—) Fit polynomial d'ordre 2 $a_2x^2 + a_1x + a_0$, $a_2 = 2.841$; $a_1 = 18.6$; $a_0 = 1858.7$; $R^2 = 0.9596$. (—) Fit fonction constante=0.367 ; $R^2 = 0.4 \times 10^{-8}$. Chaque point représente une puce distincte. $N \geq 2$ puces par condition.

Plutôt que de représenter des moyennes pour des puces entières, il est beaucoup plus intéressant de représenter chaque point de mesure associé à un sphéroïde unique. La Figure 3.17 permet de visualiser la large dispersion de ces mesures de sécrétion à chaque point de temps. Les boîtes représentent la position de la valeur médiane de fluorescence, ainsi que celles des quartiles de la distribution. On constate que la fluorescence médiane mesurée sur les billes double à chaque jour d'incubation, ce qui est cohérent avec les mesures moyennées sur la puce entière.

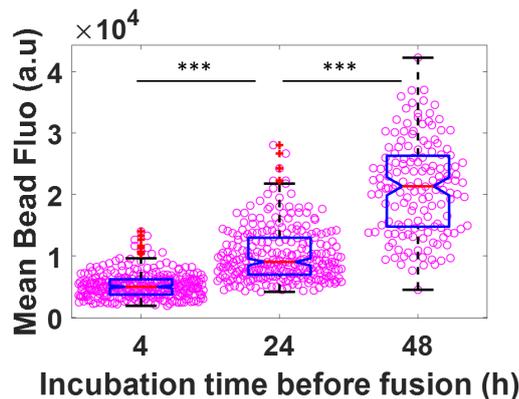


FIGURE 3.17: **Mesures de sécrétion sur de multiples sphéroïdes individuels.** Evolution du signal de fluorescence lié à la sécrétion de VEGF en fonction du temps d'incubation, pour des sphéroïdes individuels. D+0 : $N=3$ puces, $n=288$ pièges. D+1 : $N=2$ puces, $n=264$ pièges. D+2 : $N=2$ puces, $n=151$ pièges. Wilcoxon-Mann-Whitney tests, *** $p < 0.001$.

On traduit cette courbe en utilisant la courbe d'étalonnage établie à la Section 3.2.2, et on obtient la Figure 3.18. Il y apparaît que la concentration de VEGF dans les gouttes augmente d'une décade – de 10^3 à 10^4 pg/mL – dans le temps de

deux jours d'incubation. Pour un même temps d'incubation donné, par exemple à 48 heures après la formation du sphéroïde, on observe des variations très larges autour de la valeur médiane. Aux temps courts, on remarque un étalement du signal vers les basses concentrations. Cet étalement est surtout dû au modèle choisi : dans l'asymptote basse de la courbe de calibration, l'incertitude de la régression est importante.

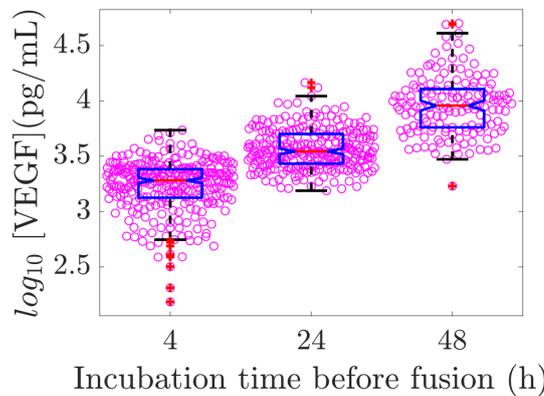


FIGURE 3.18: **Mesures de sécrétion sur de multiples sphéroïdes individuels, bis.** Evolution du niveau de sécrétion en fonction du temps d'incubation, pour des sphéroïdes uniques, après traduction de la fluorescence en valeur de concentrations. Offset sur la courbe de calibration +5000. D+0 : N=3 puces, n = 288 pièges. D+1 : N=2 puces, n = 264 puces. D+2 : N=2 puces, n = 151 pièges. Wilcoxon-Mann-Whitney tests, *** $p < 0.001$.

Dans cette section, nous avons mesuré la concentration de VEGF produite par des sphéroïdes individuels, pendant leur temps d'incubation dans la goutte fermée. On traitera longuement cette expérience avec des outils théoriques présentés dans la Section 3.3, pour montrer la pertinence de notre protocole de mesure. Les signaux obtenus présentent une variabilité, dont on discutera au Chapitre 4.

Un possible bémol se situe au niveau de la traduction de la courbe de fluorescence en valeurs de concentration : par commodité, elle est établie en l'absence d'hydrogel, et présente des barres d'erreurs en chacun de ces points qui ne sont en aucun cas traduites lors du fit. Ainsi, les valeurs des concentrations sont susceptibles d'être décalées de quelques % par rapport à la réalité chimique. Cela dit, dans le paragraphe qui suit, une expérience d'ELISA classique viendra confirmer les valeurs de sécrétion mesurées précédemment. De façon générale, les limitations de notre test sont celles de l'analyse quantitative de signaux fluorescents, que nous avons déjà abordé au Chapitre 2 : problèmes de bruit de fond, de pollution lumineuse, de réflexions parasites, éventuellement de saturation, auxquels on peut rajouter le phénomène de blanchiment des fluorophores.

Une bonne façon de s'assurer de la stabilité de nos mesures serait de disposer de contrôles internes : pour limiter l'incertitude optique, des billes-étalons de fluorescence constante dans le temps pourraient par exemple être imagées au début de chaque expérience. Mais pour être réellement inattaquable, il faudrait pouvoir ré-étalonner l'immuno-essai dans son ensemble, à l'intérieur de la puce, pour chaque nouvelle expérience [159].

3.2.4 Impact d'un médicament sur les niveaux de sécrétion

L'objectif de cette partie est double : on souhaite évaluer la sensibilité de notre expérience devant des conditions biologiques proches. Pour cela, on soumet nos sphéroïdes à un médicament, l'indométacine, et l'on compare leur sécrétion de VEGF comparativement à une condition-témoin sans indométacine. Ce médicament est soupçonné de diminuer la sécrétion de VEGF dans les cellules tumorales [218]. Le second objectif de cette partie est donc biologique : on souhaite évaluer l'effet de ce médicament sur les MSC organisées en sphéroïdes.

Protocole. Lors du chargement microfluidique, nos suspensions de cellules sont enrichie avec de l'indométacine, à une concentration finale de 0.06 mM. L'indométacine est un inhibiteur de l'enzyme cyclo-oxygénase COX-2 que l'on trouve en amont de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Comme précédemment, on fait varier le temps d'incubation de ces suspensions de cellules pour évaluer l'effet de cet inhibiteur sur la sécrétion de VEGF aux temps courts (4 heures d'incubation) et aux temps longs (48 heures d'incubation).

A temps court, on remarque immédiatement un décalage de la distribution de fluorescence vers les basses valeurs d'intensité (Figure 3.19A). Ce décalage s'atténue aux temps longs (Figure 3.19B), et l'on conserve l'augmentation générale de la quantité de VEGF dans la goutte observée précédemment. Comparées à leur contrôles, les puces ayant connu indométacine présentent toujours des niveaux de fluorescence plus bas en moyenne, ce que l'on traduit par les losanges de couleurs de la Figure 3.20. On y remarque une fois encore la large dispersion des valeurs de fluorescence mesurées, malgré des tests statistiques qui valident l'effet de l'inhibiteur utilisé.

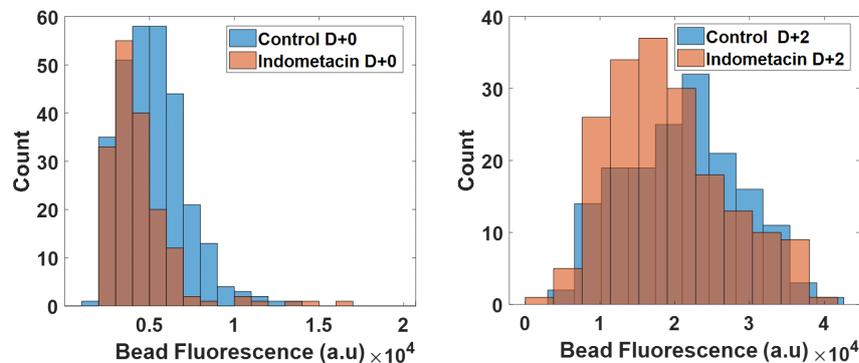


FIGURE 3.19: **Distributions de niveaux de sécrétion selon le temps d'incubation.** Distribution de fluorescence brute mesurée sur plusieurs puces, dans lesquelles les sphéroïdes ont été incubés pendant 4 et 48 heures avant l'introduction des billes. (A) "4h": ($N=3 \times 2=6$ puces, $n_b=292+170=462$ traps. (B) "48h": ($N=2 \times 2=4$ puces, $n_b=153+164=217$ pièges)

Pour confirmer par une autre méthode l'effet constaté de l'indométacine sur la production de VEGF par nos sphéroïdes, on se propose, en ELISA classique sur plaque 96 puits, de tester la concentration de VEGF dans les surnageants de puces ayant incubé des sphéroïdes de MSC pendant 72 heures. On expose le résultat de ces tests Figure 3.21A.

Il apparaît d'abord que le surnageant d'une boîte de culture 2D ne contient pas ou peu de VEGF, 10^{-2} pg/mL étant une valeur non distinguable du bruit biologique. Cela valide en partie notre protocole : en introduisant nos cellules sous forme de suspension, on mesure uniquement ce qui a été produit depuis la formation du sphéroïde. Par

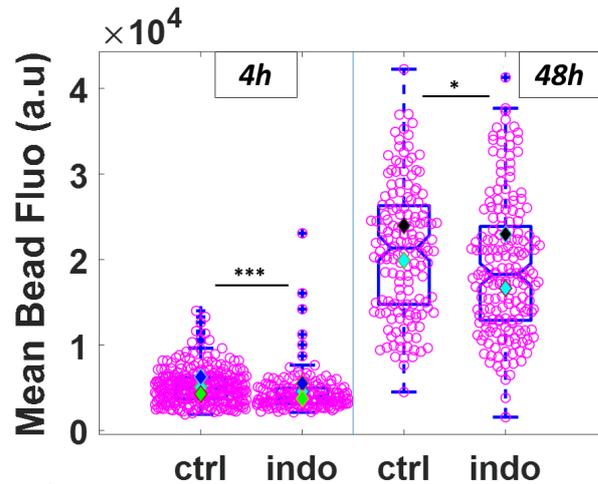


FIGURE 3.20: **Comparaison des sécrétions de sphéroïdes uniques, effet de l'indométacine.** "4h": (N=6 puces, $n_b=462$ pièges) ; "48h": (N=4 puces, $n_b=217$ pièges) Les losanges colorés représentent les valeurs moyennes de fluorescence mesurées sur des puces de même réplicat biologique.

ailleurs, la concentration de VEGF dans les puces traitées avec l'indométacine, évaluée à 1.78×10^4 pg/mL, est 1.5 fois inférieure à celle des puces contrôle, dans laquelle la concentration est évaluée à 3.11×10^4 pg/mL. A temps d'incubation longs, on a donc un effet mesurable sur la concentration, indépendamment du format de l'immuno-essai.

Comparons ces valeurs de concentrations avec celles obtenues par traduction de la fluorescence, vues Figure 3.21B. Les ordres de grandeurs sont conservés, la concentration dans les gouttes après trois jours d'incubation est de l'ordre de 10^4 pg/mL. L'indométacine diminue cette concentration d'un facteur numérique 1.2, comparable au facteur 1.5 mesuré en ELISA classique. En termes de sensibilité, les mesures en gouttes microfluidiques sont donc comparables à l'ELISA classique. L'avantage du protocole développé ici repose donc sur la multiplicité des mesures : dans le cas de l'ELISA classique, uniquement sur la condition contrôle, on utilise 1500 sphéroïdes pour obtenir 6 valeurs expérimentales ; dans le cas microfluidique, 500 sphéroïdes ont donné 217 points expérimentaux.

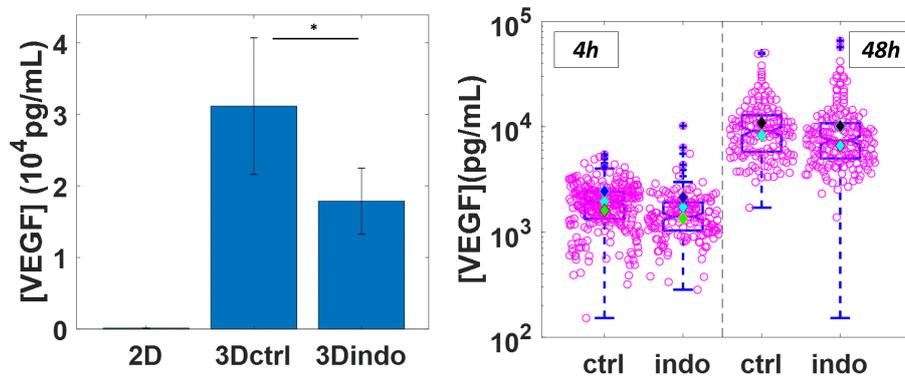


FIGURE 3.21: **ELISA classique VS bead-ELISA sur puce.** (A) Résultat d'ELISA classique, réalisé sur des surnageants de puce microfluidique, en fonction des conditions de culture. ELISA réalisé sur le surnageant N=3 puces par condition, sur deux réplicats biologiques. (B) Comparaison avec les valeurs de concentration obtenues par lecture de fluorescence des billes aux côtés de sphéroïdes individuels.

Kolmogorov-Smirnov tests, $***p < 0.001$, $*p < 0.1$

Discussion : Lien de VEGF avec l'enzyme intracellulaire COX-2 Il semble que l'indométacine réduise la production de VEGF par les sphéroïdes de MSC sans changer l'incrémentation globale de la sécrétion observée entre le jour 1 et le jour 3. A ce jour, nous n'avons pourtant connaissance que d'un seul papier de médecine reliant ce type de drogue non-stéroïdienne à une inhibition du VEGF [218].

Il est en revanche davantage connu que la production de cyclogénase COX-2 dans un tissu est corrélée à sa capacité de réparation. Zhang et al. [219] émettent par exemple l'hypothèse que cette enzyme préside à l'activation/différenciation des cellules souches MSC présentes dans la moelle osseuse, montrant que l'inhibition de COX-2 réduit de moitié la quantité d'os nouvellement formée chez un rat après fracture. Dans une étude très similaire, Rundle et al. [220] vont plus loin dans leur discussion, et émettent l'hypothèse que cette réparation osseuse améliorée est sans doute due à une formation plus efficace des vaisseaux sanguins.

Et, de fait, une multitude de travaux d'oncologie relie directement la présence de COX-2 avec des niveaux de sécrétion de VEGF-A [221, 222, 223, 224]. Sur la Figure 3.22A et C, les études de Von Rahden et al. [222] et de Gallo et al. [221] mettent ainsi en évidence une corrélation dans l'expression des gènes relatifs à COX-2 et ceux reliés à VEGF dans des cellules tumorales, en utilisant respectivement des Westernblots ou des PCR. De même, Figure 3.22B, Queiroga et al. relie la présence effective de ces deux molécules, déterminée par immuno-cytochimie, à la formation de vaisseaux sanguins.

Dans notre dispositif microfluidique, Sart et al. [225] ont récemment montré que l'indométacine diminue la production intracellulaire de l'enzyme COX-2. Etant un inhibiteur reconnu de COX-2, l'indométacine apparait donc logiquement comme un modulateur logique de l'expression de VEGF.

Du reste, notre expérience n'est pas suffisante pour conclure à un effet spécifique et direct de l'inhibiteur sur la sécrétion de VEGF. On pourrait en effet craindre que l'indométacine ait un effet ralentisseur sur l'ensemble de l'organoïde, et pas seulement sur la voie de signalisation de VEGF. Pour preuve, on propose de regarder la distribution de taille des sphéroïdes dans leurs pièges après avoir effectué l'immuno-essai, avec ou sans indométacine. Sur la Figure 3.23, on s'aperçoit ainsi que l'addition d'indométacine augmente, de façon significative et répétable, la taille du sphéroïde. Si l'on regarde seulement la valeur moyenne, cette augmentation est de $21 \pm 3\%$.

Dès lors, on peut formuler une contre hypothèse : l'indométacine est-elle juste en train de ralentir le processus de compaction qui mène à la formation du sphéroïde fonctionnel ? Les MSC ne produisant pas de VEGF tant qu'elles ne sont pas cultivées en 3D (cf. Figure 3.22), ce retard à la formation du sphéroïde engendrerait un retard dans la sécrétion. Pour pouvoir conclure, il s'agirait par exemple, en aval de l'immuno-essai, de vérifier que seuls les ARN liés à la production de VEGF sont démultipliés par l'addition de la drogue, quand d'autres restent identiques.

Deux conclusions ici. D'une part notre outil microfluidique est suffisamment sensible pour détecter l'effet d'une drogue sur les sphéroïdes de hMSC, en mettant en évidence une modification du sécrétome, à différents moments de l'incubation. D'autre part, nous montrons ici qu'il y a un lien possible de *down-regulation* du VEGF par l'indométacine, ce qui n'est pas encore clairement établi dans la littérature.

3.2.5 Niveaux d'expression intracellulaires

On cherche à évaluer le niveau de production intracellulaire de la cytokine d'intérêt - ici VEGF - au sein du sphéroïde. La lecture des niveaux de sécrétion sur les billes ne marque pas forcément la fin de l'expérience. Les sphéroïdes sont toujours immobilisés

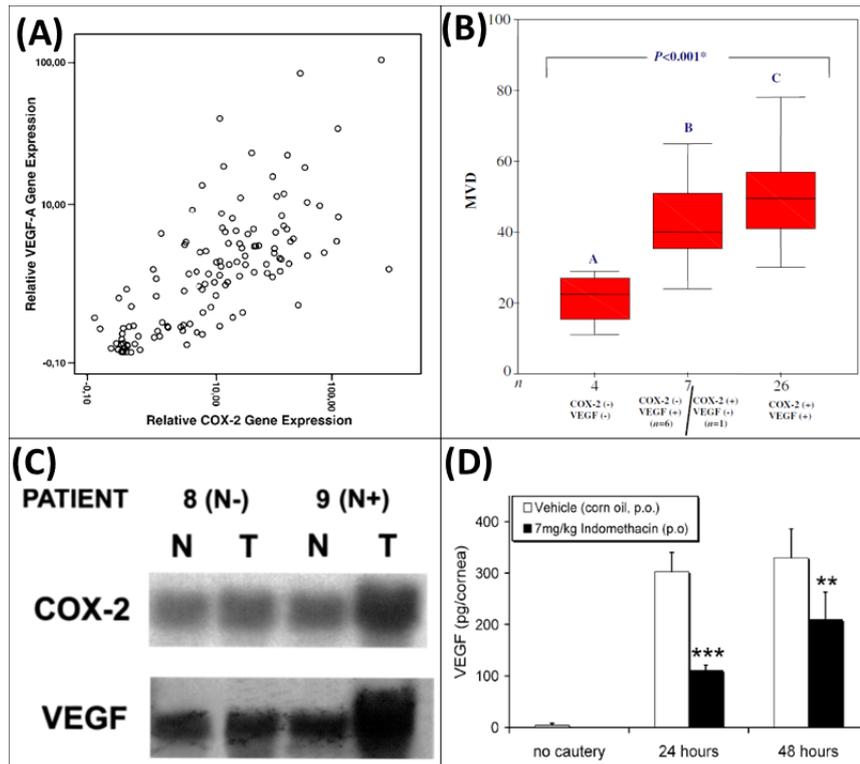


FIGURE 3.22: **Relier indométacine et downregulation de VEGF.** (A) Expressions comparées des gènes codant VEGF et COX-2 dans des cellules d'adénocarcinome déterminées par PCR ; $r=0.764$, $p<0.001$. Tiré de [222]. (B) Nombre Moyen de Microvaisseaux sanguins en fonction de l'expression de COX-2 et VEGF, dans des tissus tumoraux. Tiré de [224]. (C) Expression des ARNm reliés à COX-2 et VEGF chez deux patients, l'un sain (N-) l'autre malade (N+), déterminé. Adapté de [221]. (D) Effet inhibiteur de l'indométacine sur la production de VEGF dans certains tissus de l'oeil après blessure. Adapté de [218].

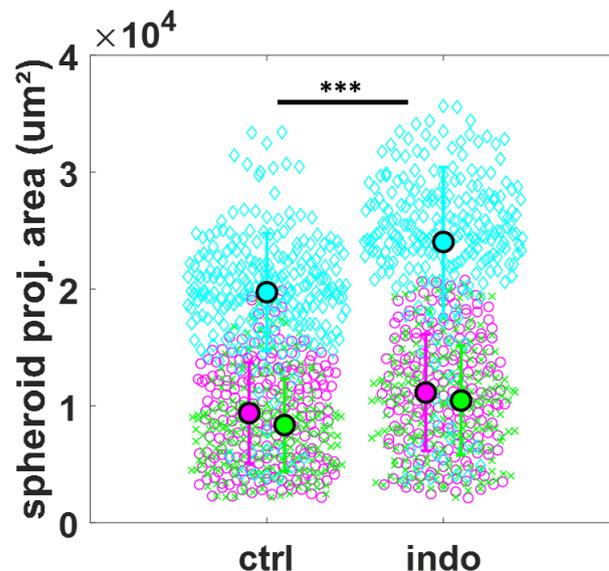


FIGURE 3.23: **Indométacine : un effet sur la compaction ?** Aires projetées de sphéroïdes mesurées 15 heures après la fusion. Il s'agit ici de sphéroïdes "temps courts", i.e incubés 4 heures avant la fusion. Les points pleins représentent les moyennes des distributions. *** $p<0.001$, valable pour chacune des paires de réplcats. $N_{ctrl} = 217(\circ), 228(\times), 246(\diamond)$; $N_{indo} = 193(\circ), 223(\times), 241(\diamond)$.

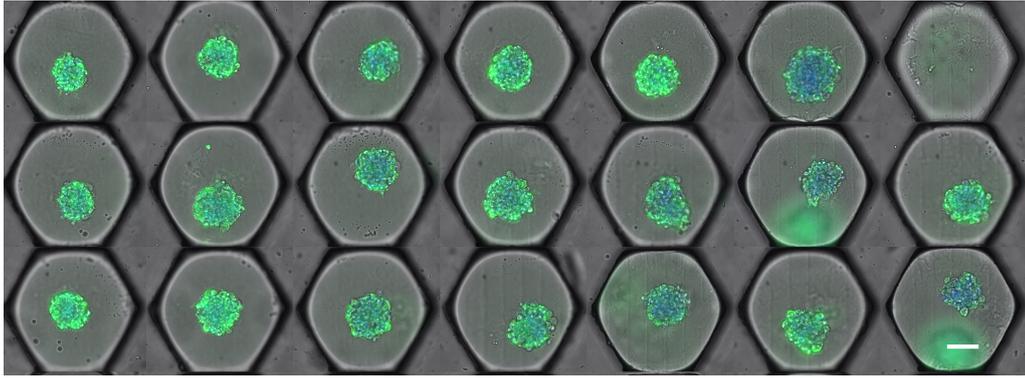


FIGURE 3.24: **Une mesure du VEGF intracellulaire dans les sphéroïdes.** Image composite de fluorescence et de lumière blanche. Sphéroïdes à D+1 après début de l'expérience. En bleu, le staining nucléaire indique la position des noyaux. En vert, staining du VEGF-A. La barre d'échelle représente 100 μm .

dans l'agarose de leur goutte. On peut donc chasser l'huile de la puce microfluidique et la remplacer par une phase aqueuse contenant les anticorps nécessaires à un test d'immuno-cytochimie (ICC).

Protocole. Un mot sur cette technique de staining intracellulaire sur puce. Elle consiste d'abord à immobiliser toutes les protéines présentes dans la cellule, tout en rendant sa membrane perméable à l'entrée d'anticorps spécifiques aux protéines que l'on souhaite imager. Dans le cadre de nos expériences, on réalise cette étape de fixation/perméabilisation en faisant circuler dans la puce une solution aqueuse de paraformaldéhyde (PFA, 4%, Alpha Aesar, Heysham, UK) pendant 30 minutes, puis une solution de détergent TritonX-100 (0.2-0.5% Sigma-Aldrich) pendant 5 minutes. Pour limiter la fixation non-spécifique des différents anticorps, on introduit au préalable une protéine blocante – ici une solution de sérum bovin (FBS) à 5% dans le tampon phosphate – pendant 30 minutes. On marque ensuite le VEGF intracellulaire par un anticorps monoclonal anti-VEGF (1/100e, ab52917, Abcam, Cambridge, UK), dont on révèle ensuite la présence par un anticorps secondaire fluorescent qui reconnaît la partie non-variable de l'anticorps monoclonal, ici un anticorps polyclonal anti-IgG de lapin (1/100e, A-11012, Life Technologies, Saint Aubin, France). Les étapes de complexation par l'anticorps s'étendent sur 90 minutes. Pour une meilleure détection des sphéroïdes, on fait également circuler une solution contenant un colorant nucléaire (0.2 μM , ReadyProbesTM Cell Viability Imaging Kit, Blue/Red R37610, Sigma-Aldrich). Toutes ces étapes sont entrecoupées de phases de lavage au PBS.

Résultats. Nous réalisons alors une mesure de fluorescence quantitative, à réglages optiques fixés, sur le plan médian du sphéroïde. On montre sur la Figure 3.24 des images typiques de sphéroïdes imagés à temps d'incubation courts (4h) et longs (48h). On peut remarquer tout de suite l'hétérogénéité du signal au sein d'un même sphéroïde. Les cellules situées à la périphérie sont visiblement plus brillantes, donc davantage chargées de VEGF intracellulaire. Cela ne doit pas nous étonner : il est établi que les cellules périphériques sont celles qui expriment le plus de COX-2 [225], enzyme si fortement liée à la production de VEGF (Revoir la Figure 3.22). Dans ce paragraphe, on choisit de ne s'intéresser qu'à la valeur moyennée de la fluorescence ICC sur l'intégralité du plan médian, sans rentrer dans le détail de chaque cellule. Cette mesure est obtenue par analyse d'image.

Avec cet outil de mesure, on peut évaluer l'impact de l'indométacine sur la quantité de VEGF présente à l'intérieur des cellules, et plus seulement sa concentration extracellulaire. Sur la Figure 3.25, on représente ainsi les fluorescences de sphéroïdes individuels, mis en contact ou non avec l'indométacine lors de leur introduction dans la puce. Les sphéroïdes ont incubé 4 heures, puis subi le test immunitaire pendant 15 heures, avant d'être immuno-stainés en ICC.

Si les niveaux absolus de fluorescence varient d'un répliquas biologique à l'autre, on peut tout de même noter une diminution significative de ces niveaux de fluorescence en présence de la drogue : les distributions de fluorescence atteignent des valeurs plus hautes dans les conditions-contrôles, allant jusqu'à 40.000 a.u contre 30.000 a.u pour l'un des répliquas. Les valeurs moyennes subissent une décroissance allant de 8 à 39%.

On peut également s'intéresser à l'évolution de cette production intracellulaire dans le temps. Figure 3.26, on représente exactement la même observable de fluorescence pour des sphéroïdes ayant incubé pendant 48 heures avant le test ELISA sur bille. Là encore, un test statistique montre une décroissance des signaux de fluorescence dans les puces ayant connu la drogue, de l'ordre de 10%. Les intensités restent cependant assez basses dans chacun des répliquas. On peut interpréter cette diminution globale par une perte d'activité des cellules qui, sans être mortes (voir Section 3.1.3), commencent peut-être à ralentir leur métabolisme faute de nutriments. Il est difficile d'évaluer la pertinence d'une mesure d'ICC sur des sphéroïdes incubés aussi longtemps.

Pour résumer, il existe une *down-regulation* de la production intracellulaire de VEGF par l'ajout d'un inhibiteur de COX-2. Cela constitue un nouvel argument du lien entre ces deux molécules, et de l'action de l'indométacine sur la vascularisation des tissus.

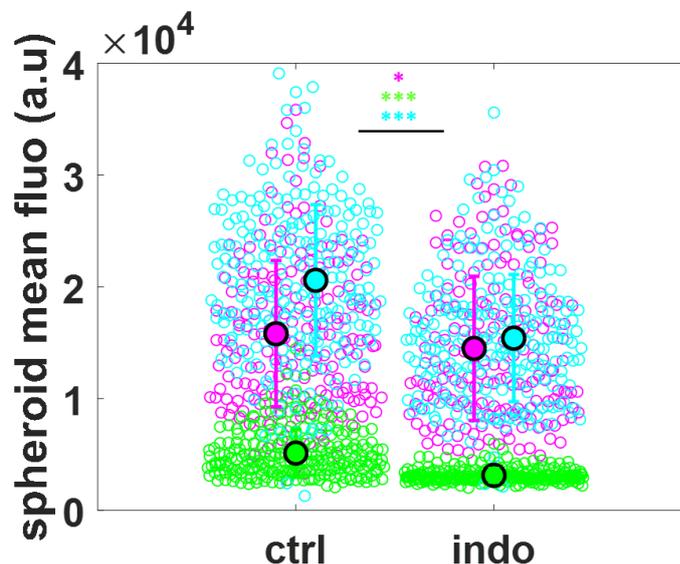


FIGURE 3.25: **L'effet de l'indométacine s'étend au VEGF intracellulaire.** Mesure d'intensité de fluorescence moyenne sur des sphéroïdes uniques mis ou non en contact avec l'indométacine. Les points cernés représentent les moyennes des distributions. $N=6$ puces. (○) $n=198+190$ sph. (○) $n=246+241$ sph. (○) $n=222+223$ sph. Kolmogorov-Smirnov tests, *** $p<0.001$, * $p<0.1$

A temps court, les sphéroïdes présentent une large hétérogénéité de signaux intracellulaires (revoir la Figure 3.25). Sur une partie des sphéroïdes présentés, on dispose d'une information intracellulaire doublée d'une mesure du VEGF extracellulaire,

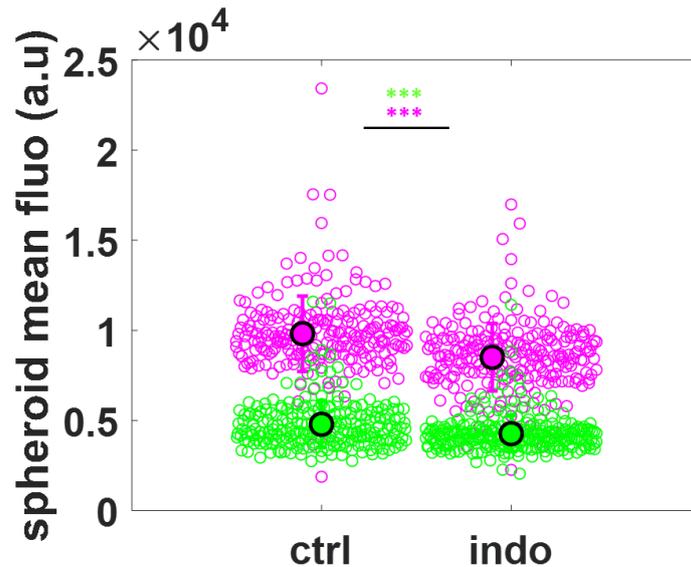


FIGURE 3.26: **L'effet de l'indométacine s'étend au VEGF intracellulaire à temps d'incubation longs.** Mesure d'intensité de fluorescence moyenne sur des sphéroïdes uniques mis ou non en contact avec l'indométacine. Les points cernés représentent les moyennes des distributions de couleur associée. $N=4$ puces. (\circ) $n=225+233$ sph. (\circ) $n=229+250$ sph. Kolmogorov-Smirnov tests, $***p<0.001$, $*p<0.1$

sécrété dans la goutte et mesuré sur des billes micrométriques. Sur la Figure 3.27, on propose de représenter cette mesure de concentration de VEGF en fonction de la fluorescence moyenne mesurée dans le plan médian du sphéroïde traité en ICC. Il apparaît une corrélation forte entre le signal de VEGF intracellulaire et la concentration de VEGF présente dans la goutte pour un piège et un sphéroïde donné. Un sphéroïde qui contient beaucoup de VEGF est un sphéroïde qui sécrète davantage.

Cette courbe soulève des questions sur les mécanismes de sécrétion du VEGF. Elle exclut a priori l'existence d'une rétroaction négative de la concentration locale sur la production de VEGF par le sphéroïde (Section 3.3.3). En revanche, on pourrait proposer un mécanisme plus passif, sous la forme d'une partition chimique du VEGF entre l'extra et l'intracellulaire. Le lien entre production intracellulaire et sécrétion extracellulaire est assez peu traité par la littérature [226, 227]: la plateforme présentée, avec son test immunologique et sa mesure en ICC, pourrait permettre de clarifier ce lien.

3.2.6 Impact de la taille du sphéroïde sur sa sécrétion

Grâce au staining intracellulaire réalisé plus haut, on obtient une mesure systématique de la taille et de la morphologie du sphéroïde en aval de l'immuno-essai. Essayons donc de répondre à une question simple : un sphéroïde "gros" sécrète-t-il davantage de VEGF qu'un "petit" ? La question corrolaire a son importance : il s'agit de savoir si le comportement du sphéroïde n'est que la somme des activités des cellules qui le constituent, ou bien s'il existe un comportement de groupe en son sein.

Sur la Figure 3.28A-C on montre des sphéroïdes "temps courts", après une nuit d'immuno-essai et un staining nucléaire : sur ces photos, les rayons des sphéroïdes varient du simple ($75\ \mu\text{m}$) au double ($150\ \mu\text{m}$) au sein d'une même puce. En associant, dans un même piège capillaire, une mesure de sécrétion à une mesure de morphologie, on obtient la Figure 3.28D-E, respectivement pour des sphéroïdes incubés 4 et 48

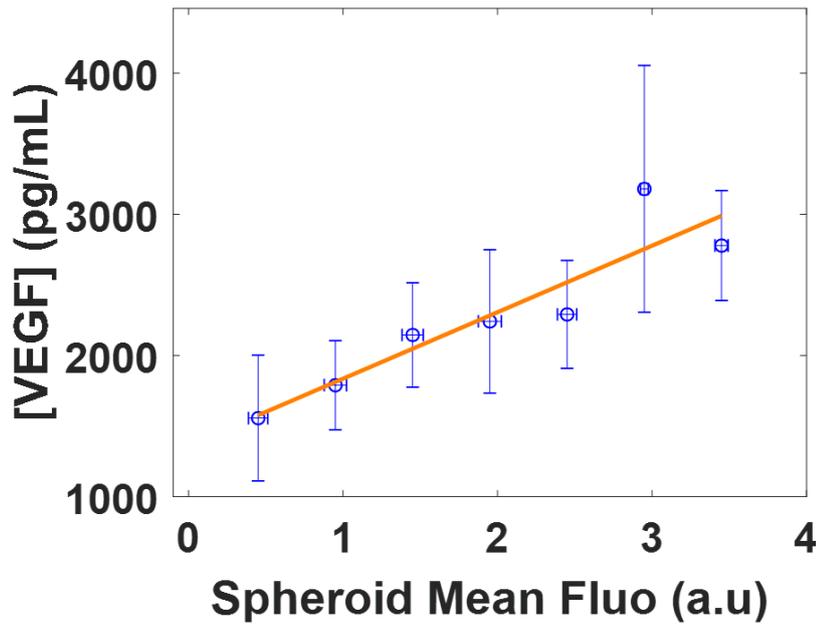


FIGURE 3.27: **Corrélation intra-extra.** Concentration de VEGF dans la goutte en fonction de la fluorescence moyenne intracellulaire mesurée en ICC dans le plan médian du sphéroïde. Fit affine $ax+b$ avec $a=471$ et $b=1265$. $R^2=0.843$. Sphéroïdes incubés 4h avant le test immunologique. $N=6$ puces. $n=338$ sph.

heures avant le test sur bille. Sur cette figure, on représente la fluorescence de la bille en fonction de l'aire du sphéroïde qui lui est proche.

À des fins de visualisation, chacun des jeux de points expérimentaux associé à une puce distincte est fitté par un modèle affine. Les pentes de ces droites sont jugées non-significativement différentes de 0 par un t-test. Les signaux de fluorescence mesurés sur les billes ne varient donc pas de façon significative pour des sphéroïdes dont l'aire projetée va de 0.5×10^4 à 2×10^4 . Cette observation est valable quel que soit le temps d'incubation préalable des sphéroïdes.

Discussion : indépendance sécrétion-taille, quelques pistes. Reste que cette relative indépendance de la taille du sphéroïde et de la sécrétion de VEGF nous indique que la production de VEGF n'est pas une fonction directe du nombre de cellules qui le constitue. On s'attardera davantage sur ce point dans le chapitre suivant, mais il est bon de rappeler que les MSC sont des cellules primaires. Leur phénotype n'est donc pas uniforme au sein d'une même culture, et il existe une large hétérogénéité de comportements au sein de leur population. Parmi ces hétérogénéités, on peut citer celle mise en évidence dans Sart et al. [225] : au sein d'une culture de MSC cohabitent des cellules exprimant plus ou moins le marqueur membranaire CD146, une molécule d'adhésion cellulaire. Les cellules qui l'expriment moins sont présentes en petit nombre et se retrouvent à la périphérie du sphéroïde (Figure 3.29A-C).

Par une décomposition de Voronoï, dont on parlera dans le Chapitre 4, on peut remonter à leur production de VEGF intracellulaire, qui est plus importante, comme le montre la Figure 3.29D-F. Dans un sphéroïde, ce qui gouvernerait la production de VEGF serait donc la présence de quelques hauts-sécréteurs, CD146 négatifs, en périphérie de l'agrégat. La taille de l'agrégat n'influe pas directement sur leur nombre. Il s'agirait davantage d'étudier la distribution statistique des CD146+ et des CD146-, ou leur proportions, en fonction de la sécrétion de VEGF pour pouvoir conclure.

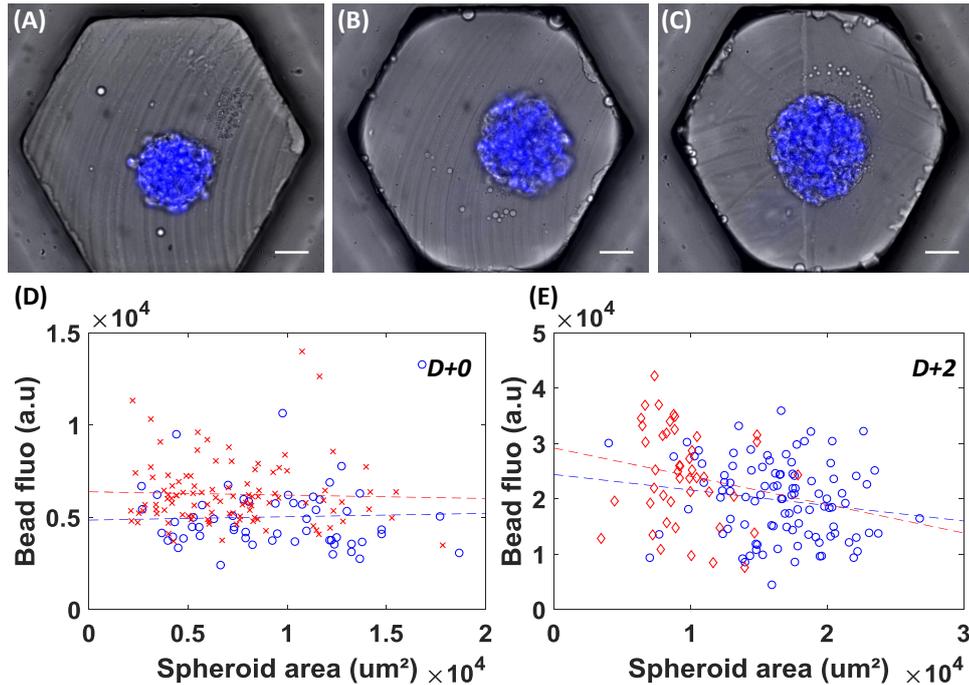


FIGURE 3.28: **La taille du sphéroïde n’influe pas directement sur sa sécrétion.** (A-C) Microphotographies composites de lumière blanche et fluorescence DAPI(marqueur nucléaire) de trois sphéroïdes de tailles croissantes. Les barres d’échelle représentent 100 μm . (D) Fluorescence mesurée sur les billes en fonction de la classe de taille, pour des sphéroïdes ayant incubé 4 heures avant l’immuno-essai. (E) Idem, pour des sphéroïdes ayant incubé 48 heures avant l’immuno-essai. $N=127+124+26$ pièges pour les D+0, $N=27+86+33$ pièges pour les D+2.

On touche ici à une expérience qu’il faut mener dans les mois à venir : trier les cellules selon leur niveau d’expression de CD146, et étudier, par notre montage d’immuno-essai sur sphéroïdes uniques, des agrégats contenant différentes proportions de CD146+ et des CD146-. Cela permettrait de confirmer le lien de ces marqueurs avec la sécrétion effective de VEGF et plus seulement sa production intracellulaire. A partir de populations triées, exprimant des quantités connues de VEGF, on pourra chercher à établir un lien, une loi, une corrélation, entre l’intra et l’extra cellulaire, ce qui constituerait une vraie avancée dans la compréhension des mécanismes de sécrétion.

3.3 Modèle de sphéroïde sécrétant dans une goutte

Dans le Chapitre 2, on a convenu de réaliser des mesures type ELISA dans des gouttes micrométriques. Reste à évaluer la dynamique de cet immuno-essai, en fonction de la vitesse de capture de la bille et du taux de sécrétion du sphéroïde. On s’intéresse en particulier à l’effet du confinement sur cette expérience, attendu que la concentration en analyte doit augmenter beaucoup plus rapidement dans une goutte fermée que dans un puits de plusieurs dizaines de microlitres.

3.3.1 Profil de concentration : effet du confinement

On considère un système composé d’un sphéroïde de rayon R_s , placé au centre d’une goutte de rayon R_d . On se place en coordonnées sphériques, et l’on représente le

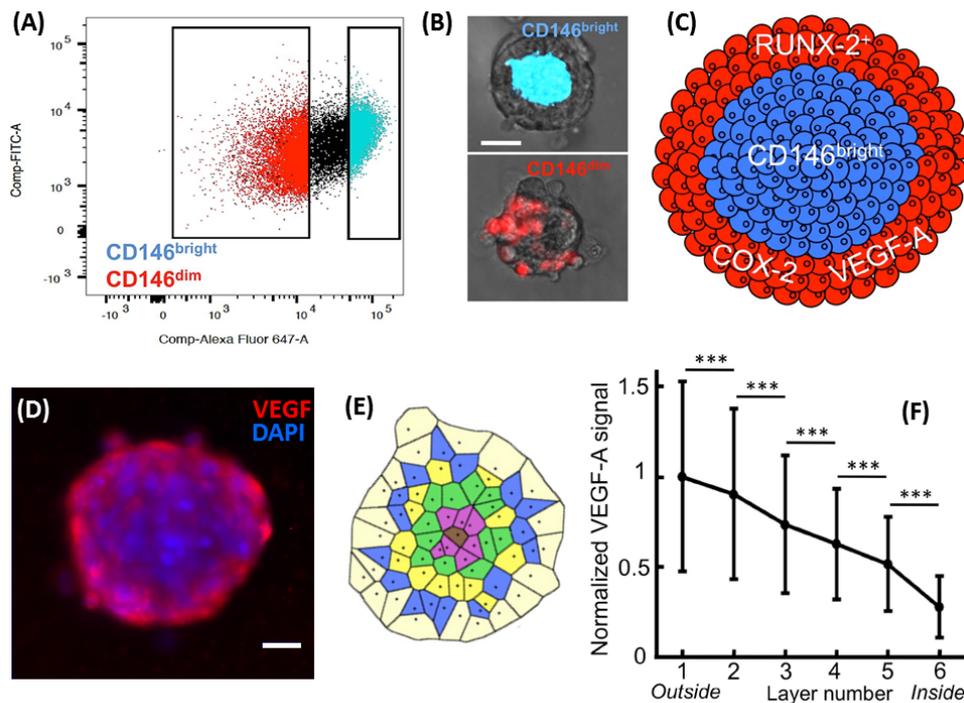


FIGURE 3.29: **La production de VEGF est la responsabilité de quelques cellules en périphérie du sphéroïde.** (A) Discrimination en cytométrie d'une population de MSC exprimant plus ou moins le marqueur membranaire CD146. (B) La position des cellules dans l'agrégat est CD146-dépendante : les cellules du centre l'expriment beaucoup, celles du bord peu. (C) Schéma du phénomène : en rouge, les cellules CD146- surexpriment des protéines, dont VEGF-A. (D) Image composite de fluorescence montrant l'expression du VEGF (en rouge) en périphérie, et les noyaux des cellules (en bleu). La barre d'échelle représente 50 microns. (E) Principe d'un découpage de Voronoï pour obtenir (F) le niveau d'expression de VEGF en fonction de la position dans le sphéroïde. Adaptée de [225].

système sous forme projetée sur la Figure 3.30. Le transport de la molécule d'intérêt, par exemple de VEGF, est supposé purement diffusif, et on notera D son coefficient de diffusion. R_d est pris comme la longueur caractéristique du problème, et on peut définir un temps typique de diffusion : $\tau_D = R_d^2/D$. On place, à une distance r_b du sphéroïde, une bille qui capture les cytokines.

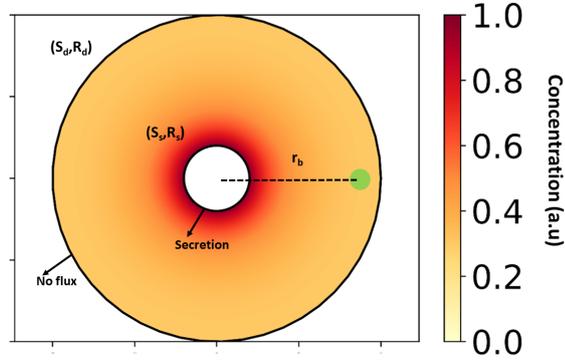


FIGURE 3.30: **Modèle sécrétion-diffusion-capture pour notre système.** Description des paramètres de la simulation et du modèle analytique. La concentration est ici simplement normalisée par sa valeur maximale.

Deux autres grandeurs caractéristiques sont importantes pour notre modèle : le taux de sécrétion de notre sphéroïde, et l'efficacité de capture de la bille. Le taux de production spécifique du sphéroïde \mathcal{A} est défini comme le nombre de molécules relâchées par le sphéroïde par unité de temps et de surface. De l'autre côté, le nombre d'anticorps de capture étant fini, on définit c_M comme la concentration maximale de VEGF capturable sur la bille. En prenant c_M comme concentration typique du problème, on peut construire un nombre adimensionné $A = \mathcal{A}R_d/(Dc_M)$ associé à la variable \mathcal{A} , qui met en balance le flux de molécules sécrétées avec leur vitesse de diffusion.

Avec ces seuls éléments, on cherche à calculer la concentration de VEGF à l'intérieur de la goutte. Si l'on note C la concentration adimensionnée de VEGF dans la goutte, elle doit suivre l'équation de diffusion :

$$\partial_t C = \nabla^2 C \quad . \quad (3.4)$$

La sécrétion du VEGF est modélisée par une condition de flux constant à la surface S_s du sphéroïde. Quant à l'imperméabilité de la goutte, on l'exprime comme une condition de non-flux à la surface S_g de la goutte. Si l'on note \mathbf{n} le vecteur unitaire pointant vers l'extérieur des surfaces, les conditions de bords peuvent donc s'écrire :

$$\nabla C|_{S_s} \cdot \mathbf{n} = -A \quad , \quad \nabla C|_{S_g} \cdot \mathbf{n} = 0 \quad . \quad (3.5)$$

En utilisant comme dans la Section 2.3.4 un algorithme basé sur les éléments finis, on peut résoudre numériquement (eq.(3.4)) en coordonnées sphériques, et obtenir le profil de concentration $C(r, t)$ dans la goutte, au cours du temps (Figure 3.31). Sur des échelles de temps courtes, entendre $t \ll \tau_D$, la concentration au voisinage du sphéroïde est peu impactée par le confinement, tout en étant légèrement plus élevée au niveau de la goutte dans le cas confiné. Aux temps longs en revanche ($t \gg \tau_D$), la concentration atteint une forme stationnaire $C(r) = \mathcal{A}R_s^2/r$ de profil dans le cas non confiné, alors qu'elle continue d'augmenter dans le cas confiné. Cela se comprend aisément : dans ce dernier cas, le VEGF est perfusé de façon continue dans un volume fini.

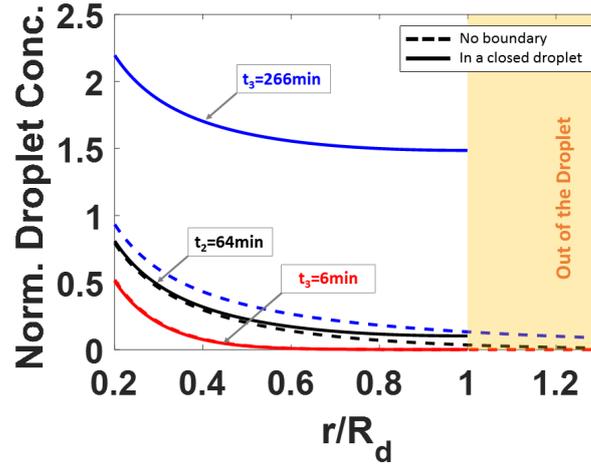


FIGURE 3.31: **Profil de concentration en VEGF dans la goutte, effet du confinement.** Concentration $C/(AR_d)$ en fonction de la distance au sphéroïde, avec (trait plein) ou sans (pointillés) confinement par les frontières de la goutte. Courbes établies à 0.9 (rouge), 9.7 (noir) et 40 (bleu) temps de diffusion. La zone jaune représente l'extérieur de la goutte.

Passé un certain temps d'établissement, i.e. après quelques τ_D , le profil de concentration garde donc sa forme et ne subit qu'une translation uniforme vers les hautes valeurs. Dans une hypothèse de temps longs, que nous discuterons plus loin, on peut écrire ce profil de concentration sous forme analytique, comme une somme d'un terme de forme et d'un terme d'augmentation linéaire dans le temps :

$$C(t) = \tilde{C} + St, \quad (3.6)$$

Avec S qui représente un taux d'augmentation de la concentration dans la goutte, et qui dépend de A selon $S = (3AR_s^2)/(R_d^3 - R_s^3)$. Si l'on se place en régime stationnaire, et que l'on réinjecte cette forme dans notre équation de diffusion, on trouve par intégrations successives du laplacien sphérique ($\nabla^2 c = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} (r^2 \frac{\partial c}{\partial r})$) :

$$\tilde{C}(r) = S \frac{r^2}{6} - \frac{a}{r} + b. \quad (3.7)$$

En prenant l'une de nos conditions de bord, on détermine facilement la constante a , et on arrive à l'expression suivante de la concentration totale dans la goutte, à une constante b près. Cette dernière constante pourrait s'écrire sous une autre forme $b = St_1$, avec t_1 le temps nécessaire à l'établissement du régime stationnaire.

$$\tilde{C}(r) = S \left(\frac{r^2}{6} + \frac{R_d^3}{3r} \right) + bC(r, t) = S \left(\frac{r^2}{6} + \frac{R_d^3}{3r} + t \right) + St_1. \quad (3.8)$$

Toute la question est donc : quel est l'ordre de grandeur de ce temps d'établissement t_1 , à partir duquel il est légitime d'utiliser une forme analytique de la concentration de VEGF dans la goutte. Pour le savoir, on évalue sur la Figure 3.32 le temps nécessaire pour atteindre une forme de profil comparable à celle calculée analytiquement. on représente ainsi des profils de concentration à des temps successifs, et l'on trouve, à $t = 0.25\tau_D$ une superposition satisfaisante.

Un mot sur la gamme de valeurs choisie pour le taux de sécrétion $A = AR_d/(Dc_M)$. Par nos expériences ELISA (revoir la Figure 3.21A), on connaît la sécrétion typique de

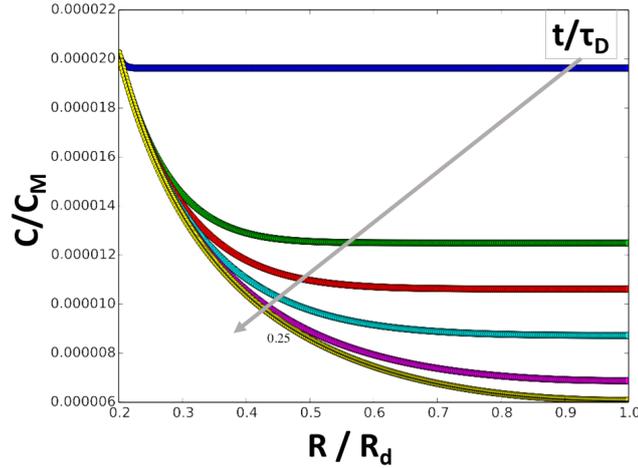


FIGURE 3.32: **Convergence vers le profil pseudo-stationnaire.** Concentration de VEGF en fonction de la position dans la goutte (cas confiné), à différents temps après le début de la sécrétion. À $t = 0.25\tau_D$, la courbe simulée (jaune) se confond avec l'expression analytique (trait noir).

VEGF d'une population de $n = 270$ sphéroïdes, ayant incubé pendant $\Delta t = 72\text{h}$ dans un surnageant de volume total $50\ \mu\text{L}$. La concentration de VEGF dans ce surnageant a été évaluée à $3 \times 10^4\ \text{pg mL}^{-1}$. Ramenée à une production par sphéroïde et par seconde, on trouve une sécrétion de $2.13 \times 10^{-5}\ \text{pg s}^{-1}$ par sphéroïde. Ainsi une estimation de \mathcal{A} est de 32 molécules par seconde et par sphéroïdes. On considère un rayon typique du sphéroïde de $80\ \mu\text{m}$. On peut donc ramener notre \mathcal{A} à une valeur de sécrétion surfacique valant 4×10^8 molécules par seconde et par m^2 .

Dans leurs simulations de diffusion de VEGF dans des tissus musculaires, Mac Gabhan et al. [40] prenaient une valeur de 0.048 molécules par seconde produites par des cellules endothéliales musculaires. Cela correspond à 10 molécules pour 210 cellules, l'ordre de grandeur trouvé pour les sphéroïdes de MSC est donc le bon.

Notons cependant que notre estimation de \mathcal{A} est entachée d'une erreur expérimentale difficile à estimer : le volume de surnageant récupéré dans la puce microfluidique a une incertitude de l'ordre de $5\ \mu\text{L}$, ce qui affecte la valeur de la concentration mesurée en ELISA. Par ailleurs, on a montré que le rayon du sphéroïde était en fait une distribution, avec un coefficient de variation de 17% (Figure 3.7). Sur la base de ces remarques, on peut estimer un facteur numérique d'incertitude de 3.6 sur la valeur de \mathcal{A} . Quant au c_M , qui normalise uniformément toutes les concentrations, il est pris égal au maximum de fixation de la bille $10^6\ \text{pg/mL}$ mesurée sur la courbe de calibration (Figure 3.14E). Par le calcul, on trouve finalement un \mathcal{A} adimensionné compris entre 10^{-3} et 10^{-4} .

À ce stade de notre étude, nous connaissons donc la concentration de VEGF dans la goutte, en fonction du taux de sécrétion du sphéroïde et des dimensions du problème. Sous certaines hypothèses, on peut écrire cette concentration sous forme analytique, ce qui rendra beaucoup plus simple nos études ultérieures. Pour des rayons de goutte plus importants, ou des coefficients de diffusion plus petits, le temps d'établissement d'un profil invariant de concentration devient non négligeable. Nous nous apprêtons à étudier la fixation du VEGF sur une bille placée dans la goutte : il conviendra de vérifier que les temps typiques mis en jeu respectent les conditions de l'état stationnaire décrit ici.

3.3.2 Capture de VEGF sur la bille

Au niveau de la surface fonctionnalisée de la bille, la protéine est capturée. Un anticorps réagit avec une molécule de VEGF pour former un complexe, avec un coefficient de capture k_{on} . En choisissant toujours c_M comme valeur de la concentration caractéristique, on peut associer à ce coefficient de capture un nombre adimensionné $k = k_{on}c_M\tau_D$. Classiquement, la concentration c de protéine capturée par une bille située à une distance r augmente proportionnellement à k , mais aussi à la quantité de sites de fixation restants ($c_M - c$), et à la concentration locale de VEGF disponible $C(r, t)$ que nous venons de trouver numériquement [228]. On a donc :

$$\partial_t c = k(c_M - c)C(r, t)|_{r=r_b} \quad . \quad (3.9)$$

Dans notre expérience, le rayon de la bille est tel que $r_b \approx R_d/40$, de sorte que l'on considère le champ de concentration C comme uniforme à l'échelle de la bille. On considère que la complexation du VEGF sur la bille est irréversible sur l'échelle de temps considérée [40, 41]. Pour une position r_b et un temps t donnés, on résout 3.9, et on trouve la concentration de VEGF sur la bille sous la forme :

$$c = c_M \left(1 - e^{-k \int_0^t C(r_b, u) du} \right) \quad . \quad (3.10)$$

La forme du profil de concentration dans la goutte étant connue, on obtient ainsi la concentration de VEGF sur la bille en fonction du temps, pour divers taux de sécrétion A . Sur la Figure 3.33 cette concentration augmente avec le temps, avant d'atteindre un régime asymptotique en plateau. Des taux de sécrétion plus faibles (traits pointillés) impliquent une augmentation plus tardive de cette concentration. Du reste, le confinement par la goutte joue un rôle important dans la dynamique de capture de la bille. Pour quantifier cette dynamique, définissons τ_x , comme le temps nécessaire pour atteindre $x\%$ de la capacité de capture de la bille.

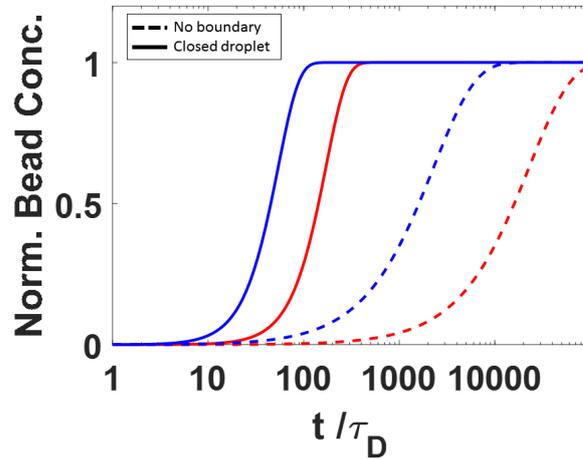


FIGURE 3.33: **Evolution de la concentration de VEGF sur la bille, effet du confinement.** Pour deux taux de sécrétion - $A = 10^{-3}$ (bleu) et $A = 10^{-4}$ (rouge) - simulation de la fixation de VEGF au cours du temps sur la bille au cours du temps, à une position $r = 0.9R_d$, avec une cinétique fixée par $k = 10$. En pointillés, courbes équivalentes en l'absence de confinement par la goutte. La concentration est normalisée par C_M , le temps par le temps de diffusion τ_D .

Dans notre cas, le sphéroïde a un rayon $R_s = 40 \mu\text{m}$ dans une goutte de rayon $R_d = 200 \mu\text{m}$. Le coefficient de diffusion de VEGF est pris égal à $D = 1.33 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ [40].

On peut ainsi évaluer le temps typique de diffusion $\tau_D = R_d^2/D \approx 400$ s. Dans nos conditions expérimentales, le confinement du sphéroïde par la goutte diminue drastiquement le temps nécessaire pour occuper les sites vacants de la bille, comme montré dans le Tableau 3.3.

Temps	En goutte	Sans confinement
τ_{10} (hours)	6.2	272.0
τ_{50} (hours)	15.9	1796.8
τ_{90} (hours)	29.3	5969.3

TABLE 3.3: **Raccourcir par le confinement les temps de capture de VEGF par la bille .**

On note que ces temps typiques de réaction de la bille sont grands devant le temps de diffusion. On propose donc d'utiliser la forme du profil de concentration obtenue dans l'approximation des temps longs à la partie précédente :

$$C(r, t) = S \left(\frac{r^2}{6} + \frac{R_d^3}{3r} \right) + St, \quad (3.11)$$

Avec $S = 3AR_s^2/(R_d^3 - R_s^3)$, que l'on pourrait décrire comme un taux d'accroissement moyen de la concentration dans la goutte. En injectant (eq.3.11) dans (eq.3.10), on obtient une expression analytique de la concentration capturée en fonction du temps.

$$c = c_M \left(1 - e^{-kSt \left(\frac{r^2}{6} + \frac{R_d^3}{3r} + \frac{t}{2} \right)} \right). \quad (3.12)$$

Pour que la concentration sur la bille atteigne une valeur $c = x.c_M$, il est donc nécessaire d'attendre un temps τ_x donné par :

$$\tau_x = -\frac{1}{3} \left(\frac{r^2}{2} + \frac{R_d^3}{r} \right) + \sqrt{\frac{1}{9} \left(\frac{r^2}{2} + \frac{R_d^3}{r} \right)^2 - 2 \frac{\log(1-x)}{ks}} \quad (3.13)$$

Cherchons à connaître l'effet des différents paramètres de l'expérience sur le processus d'occupation de la bille. On choisit de considérer τ_{50} , qui représente le temps pour lequel la moitié des sites actifs de la bille sont occupés par une molécule de VEGF. A ce moment-là, on s'attend à ce que le test immunologique soit très au-dessus des limites de détection, sans être affecté par des problèmes de saturation. Sur la Figure 3.34A, les valeurs de τ_{50} sont représentées en fonction de la position de la bille et du taux de sécrétion du sphéroïde. Il apparaît que la position de la bille a une faible influence sur le temps de remplissage de ses sites actifs. Rien de très surprenant, cela revient à dire que les temps de diffusion sont petits devant les temps de réaction chimique de la bille. Cela nous permet malgré tout de justifier l'étude, à une position donnée, des cinétiques de réaction pour différents taux de sécrétion et vitesses de capture.

La Figure 3.34B permet ainsi de prédire la valeur du temps typique τ_{50} pour une large gamme de A et de k , dans la géométrie qui nous intéresse. Les taux de production et de capture de VEGF impactent très fortement la cinétique du test en goutte, faisant varier τ_{50} de plusieurs ordres de grandeur. Dans nos conditions expérimentales, on a ainsi pu évaluer qu'atteindre 50% d'occupation prend 4.5 h.

Pré-incubation du sphéroïde avant introduction des billes. On vient de montrer que les expériences dans lesquelles la bille et le sphéroïde sont placés ensemble dès $t = 0$ impliquaient des temps de capture – par exemple le temps pour atteindre

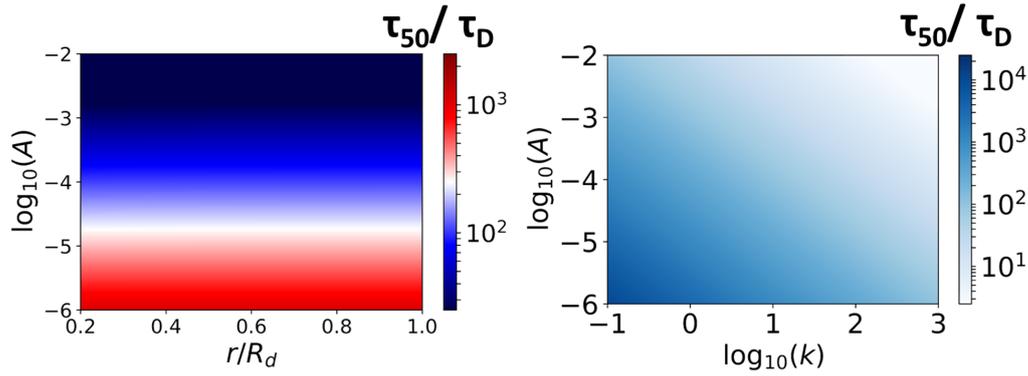


FIGURE 3.34: **Temps caractéristique du test Luminex en goutte.** (A) Valeurs du temps τ_{50} de demi-saturation de la bille, en fonction de la constante du taux de sécrétion A et de la position de la bille. (B) Valeurs du τ_{50} en fonction du taux de sécrétion A et de la constante de capture de la bille k , pour une position donnée réaliste ($r = 0.9R_d$).

50% d'occupation sur les sites de capture de la bille – étaient longs, de l'ordre de plusieurs heures pour des conditions classiques. Pour réduire le temps nécessaire au test immunologique, on se propose de laisser le sphéroïde incuber dans sa goutte pendant un temps t_i *avant* d'y introduire la bille. En introduisant un retard dans le début de la capture, on peut écrire le temps nécessaire pour atteindre $x\%$ d'occupation de la façon suivante :

$$\tau_x(t_i) = -\frac{1}{3} \left(\frac{r^2}{2} + \frac{R_d^3}{r} + 3t_i \right) + \sqrt{\frac{1}{9} \left(\frac{r^2}{2} + \frac{R_d^3}{r} + 3t_i \right)^2 - 2 \frac{\log(1-x)}{ks}} \quad (3.14)$$

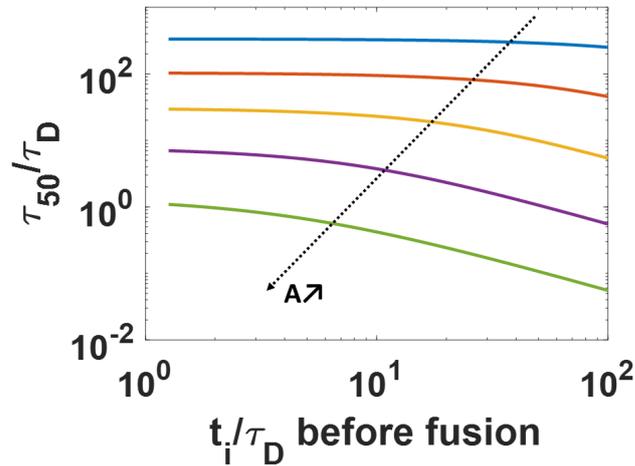


FIGURE 3.35: **Un temps de préincubation diminue artificiellement le temps de réponse du test en goutte.** Evolution du temps de demi-saturation des sites actifs de la bille ($k = 10$) en fonction du temps d'incubation précédant l'arrivée de la bille. Les couleurs représentent des taux de sécrétions décroissants par décade ($\log A = [-5; -1]$).

Sur la Figure 3.35, on montre comment le temps t_i permet d'influencer le temps du test τ_{50} . Quand le temps d'incubation augmente, le VEGF s'accumule dans la goutte. Quand la bille est introduite, elle est confrontée à une concentration bien plus élevée, et réagit donc beaucoup plus vite (eq.3.9). Pour coller à nos conditions

expérimentales, on simule le comportement de la bille pour trois temps d'incubation différents correspondant à 4, 24 et 48 heures. Comme on le voit sur la Figure 3.36, la bille atteint, quelques dizaines de τ_D après son introduction dans la goutte, des niveaux distinct de concentration de VEGF à sa surface, et donc des niveaux de fluorescence distincts.

Dans notre expérience, le temps d'incubation des billes avant lecture est 15 heures, ce qui correspond à la limite droite de la zone bleutée de la Figure 3.36. Le modèle proposé reste en bon accord avec les expériences réalisées dans la partie précédente, décrivant bien l'augmentation progressive des niveaux de fluorescence sur les billes lorsque le sphéroïde passe plus de temps en culture.

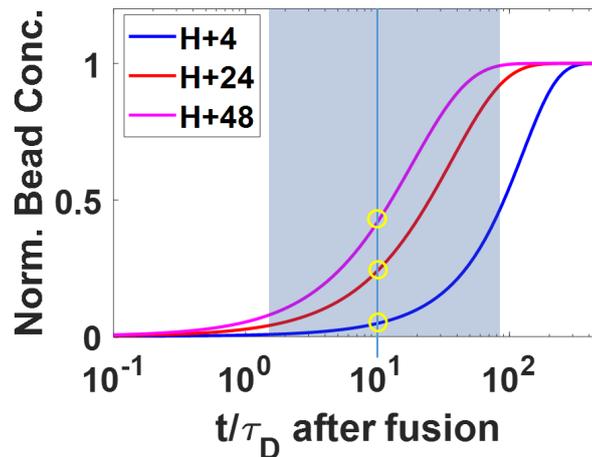


FIGURE 3.36: **Distincts niveaux de fluorescences sur la bille pour des temps d'incubation différents.** A $t=0$, on rajoute à une goutte - qui a contenu un sphéroïde sécrétant ($A = 10^{-3}$) pendant des temps d'incubation variables - une bille de capture ($k = 10$). On représente l'évolution de la concentration sur la bille en fonction du temps normalisé par le temps de diffusion. Seulement 1h après l'introduction de la bille, on peut lire des niveaux élevés et distincts de fluorescence (ronds jaunes). La zone grisée est une fenêtre de temps valable pour effectuer une mesure sans problème de détection ou de saturation.

3.3.3 Pistes d'amélioration du modèle

Notre modèle de diffusion/capture a permis de valider notre protocole expérimental : on a bien intérêt à laisser le sphéroïde incuber, dans une goutte confinée, pour ensuite venir lire le résultat de l'immuno-essai quelques heures plus tard. Il s'agit toutefois de remarquer que l'on peut facilement rajouter des éléments à notre calcul pour nous rapprocher d'une vérité biologique : par exemple, on a considéré jusqu'à présent que le sphéroïde sécrète en continu, sans vieillissement et sans tenir compte de la concentration qui l'entoure. De même, on est parti du principe que le VEGF produit s'accumulait dans la goutte sans se dégrader. Toutes ces hypothèses sont hautement discutables, et on se propose à présent de montrer quelques implémentations possibles aux modèles pour gagner en réalisme.

Une dynamique de sécrétion qui évolue dans le temps

Il est très optimiste d'imaginer un sphéroïde sécrétant en continu une quantité donnée de molécules par seconde. Bien que viables (voir Section 3.1.3), et peu gourmands en

nutriments comparés à des agrégats tumoraux [209, 210], nos sphéroïdes en gouttes ne reçoivent pas de nouveaux nutriments pendant leurs 48 heures d'incubation. Au cours de cette incubation, les cellules sont par exemple susceptibles de manquer de glucose pour leur survie, ou d'acides aminés pour fabriquer et sécréter des protéines. Le taux de sécrétion de cytokine, noté A dans la partie précédente, a peu de chance d'être réellement constant dans le temps. Le problème de diffusion qui nous intéresse devient donc :

$$\partial_t C = \nabla^2 C \quad . \quad (3.15)$$

$$\nabla C|_{S_s} \cdot \mathbf{n} = -A(t) \quad , \quad \nabla C|_{S_g} \cdot \mathbf{n} = 0 \quad . \quad (3.16)$$

A la vérité, ce problème est complexe à résoudre analytiquement, et à ce jour nous ne sommes pas parvenus à obtenir une expression explicite de la concentration en fonction de r , de t et de $A(t)$. Ce que l'on peut faire en revanche, c'est changer la valeur du A à chaque pas de temps de la simulation numérique. Par exemple, on considère que la sécrétion du sphéroïde décroît exponentiellement dans le temps, avec un temps typique de décroissance τ . Si l'on regarde, Figure 3.37A, l'évolution de la concentration dans la goutte pour un τ et un A_0 donnés, on peut par exemple rendre compte d'un aplatissement du profil au cours du temps, jusqu'à atteindre une concentration uniforme et n'augmentant plus à l'intérieur de la goutte après $300\tau_D$.

Côté bille, on peut évaluer l'impact du temps caractéristique de l'épuisement du sphéroïde : Figure 3.37B, on représente ainsi la concentration de VEGF sur la goutte en fonction du temps pour différents τ . Si ce temps est du même ordre de grandeur que le temps de diffusion, le profil de concentration met $10^3\tau_D$ à atteindre la saturation, soit 5 jours. Pour des temps d'épuisement plus longs la courbe de concentration est quasi indiscernable de celle d'un sphéroïde sans vieillissement.

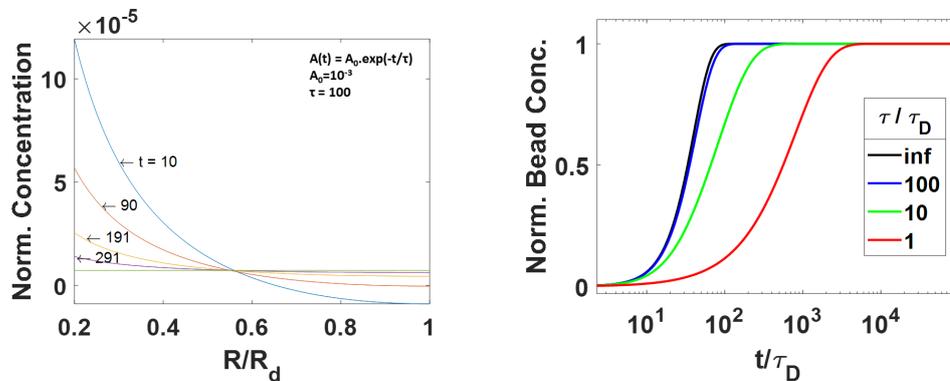


FIGURE 3.37: **Sécrétion changeante du sphéroïde dans le temps.** (A) Profils de concentration en VEGF dans la goutte à différents temps (exprimés en fraction du temps de diffusion). A temps court, on retrouve un profil semblable à celui calculé plus haut. A temps long, on tend vers un profil uniforme. (B) Effet de cette perte d'activité sécrétoire sur la dynamique de la fixation sur la bille. $A = 10^{-4}$, $k = 10$.

Pour justifier le choix de temps typique $\tau = 100$ de la Figure 3.37A, on peut proposer la démarche suivante : dans nos gouttes, les 300 cellules qui composent le sphéroïde mettent typiquement 5 jours à mourir, et donc à cesser leur activité sécrétoire. Si l'on suppose que ce phénomène de mort cellulaire suit une loi exponentielle, on trouve une constante τ valant $189\tau_D$. Il semble donc pertinent de négliger le vieillissement du sphéroïde. La vraie discussion devrait plutôt porter sur le choix du modèle exponentiel, qui est arbitraire : il s'agirait d'étudier dynamiquement la viabilité de nos sphéroïdes jour par jour pour remonter à une loi plus réaliste.

Une cytokine qui se dégrade en solution

Les protéines en solution ont une stabilité limitée dans le temps. Elles se dénaturent spontanément où sous l'effet des molécules voisines, de la chaleur ou du pH, c'est à dire qu'elles perdent leur conformation spatiale, se déplient, et ne peuvent donc plus remplir leur fonction biologique. VEGF étant un marqueur de plus en plus testé dans les échantillons médicaux, des études ont cherché des estimations de son temps de demi-vie [229, 230]. Ces estimations sont extrêmement variables, et dépendent outrageusement de l'environnement biochimique de la molécule. Pour cette étude, considérons que ce temps typique de demi-vie vaut 90 minutes, soit $13.5\tau_D$. En termes d'équation, une dégradation exponentielle de la molécule peut être traduite par l'ajout d'un terme dans l'équation de la chaleur :

$$\partial_t C = \nabla^2 C - \frac{C}{\tau}. \quad (3.17)$$

Là encore, si la résolution analytique est rendue difficile par la cohabitation d'une condition de bord à flux constant avec un amortissement uniforme dans la goutte, on peut tout de même implémenter cette équation dans le modèle, et faire décroître, à chaque pas de temps, la concentration en chaque point de la goutte. Sur la Figure 3.38, on représente la dynamique de fixation du VEGF sur la bille, pour plusieurs temps typiques de dégradation.

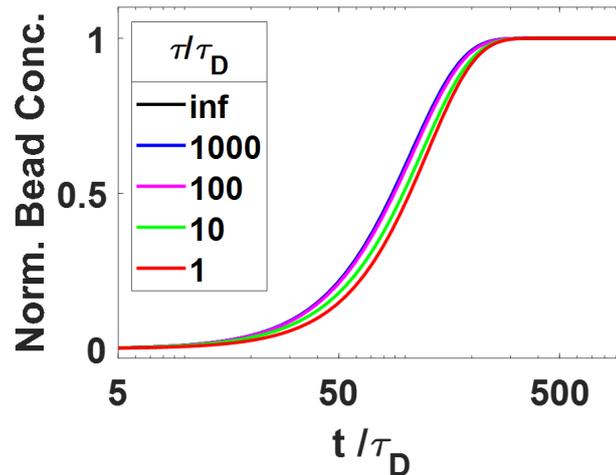


FIGURE 3.38: **Effet du temps de vie de VEGF en solution.** Évolution de la concentration de VEGF sur la bille obtenue numériquement en présence de dégradation, pour $\tau = 10$ (vert) et $\tau = 1$ (rouge). La courbe noire correspond au cas sans dégradation (tau infini).

L'intérêt de ce paragraphe, c'est de se convaincre que même si la protéine se dégrade vite (la courbe rouge correspond à une demi vie de 6 minutes), la dynamique de capture de la bille reste tout à fait comparable. Notamment, le τ_{50} avec ou sans dégradation passe de 80 à 100 τ_D lorsque le temps typique de dégradation prend un facteur 10.

Traduire un effet autocrine

Dans nos équations, nous considérons depuis le début qu'il y a une indépendance de la sécrétion du sphéroïde avec la concentration extérieure de VEGF déjà sécrété. Là encore, il est probable qu'il existe une boucle de rétroaction négative, les sphéroïdes diminuant leur sécrétion lorsque la concentration de VEGF devient élevée [231]. On

peut en rendre compte de façon indirecte, en changeant la loi temporelle de $A(t)$ comme au paragraphe précédent. Ou alors, nous pouvons changer la condition de bord au niveau de la surface du sphéroïde.

Dans les problèmes de diffusion, rajouter un coefficient Da dit de Damkohler pour traduire cette rétro-action est classique, de sorte que la condition à la surface du sphéroïde s'écrive à présent :

$$\nabla C|_{S_s} \cdot \mathbf{n} = -A - DaC(R_s, t) \quad (3.18)$$

Pour un taux de sécrétion donné, on représente ainsi, Figure 3.39, le devenir de l'attachement du VEGF sur la bille pour des rétroactions Da croissantes. De façon attendue, des coefficients plus forts réduisent le niveau instantané de sécrétion du sphéroïde, et ralentissent l'immuno-essai. Plus grave, si l'on monte à des Damkohler plus grands que 10, le modèle cesse de converger : la production du sphéroïde est quasi-stopée par la rétroaction, et la saturation de la bille n'est jamais atteinte numériquement.

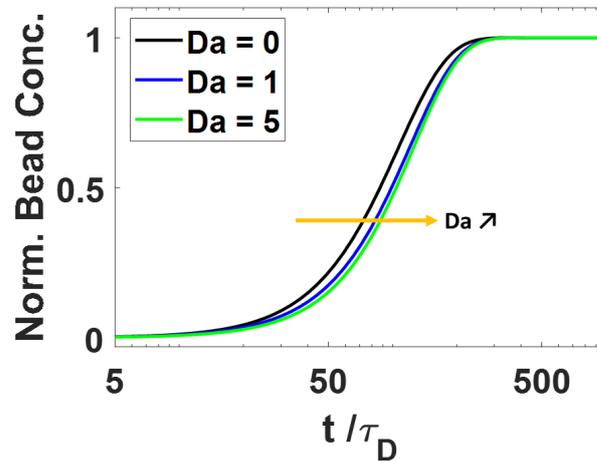


FIGURE 3.39: **Rétroaction négative de la concentration locale sur la sécrétion du sphéroïde.** Évolution de la concentration de VEGF sur la bille obtenue numériquement en présence d'un coefficient de Damkohler, pour $Da=5$ (vert) et $Da=1$ (rouge). La courbe noire correspond au cas sans rétroaction (Da nul). $A = 10^{-4}$.

Sur toute cette partie de simulations numériques et de modèle diffusion-réaction, on peut d'abord retenir l'importance du temps de réaction de notre immuno-essai, même pour des temps de diffusions courts devant les dynamiques de sécrétion. Il faut plusieurs dizaines d'heures pour saturer la bille dans un cas représentatif, et le seul moyen expérimental pour réduire ce temps consiste à pré-incuber le sphéroïde dans la goutte avant que de rajouter la bille. Au delà de l'accord avec notre expérience particulière, le modèle présenté peut être adapté pour coller au mieux au devenir du VEGF - ou d'une autre molécule - dans la goutte au cours du temps.

Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons utilisé la microfluidique du chapitre 1 et nos protocoles d'immuno-essais du Chapitre 2 pour cultiver des agrégats 3D de cellules souches mésenchymateuses. Ces sphéroïdes, maintenus en vie sur une période de trois jours, semblent sécréter en continu des cytokines, en particulier le facteur de croissance

de l'endothélium vasculaire VEGF. Cette production de VEGF a été modulée par un inhibiteur de l'enzyme intracellulaire COX, et l'on a mesuré, sur des distributions de sphéroïdes uniques et isolés, les effets de cette inhibition sur la sécrétion de VEGF, la compaction des agrégats, et les niveaux intracellulaires d'expression de VEGF.

Le modèle de diffusion simple développé ici vise à traduire les dynamiques de sécrétions, d'accumulation et de dégradation dans des conditions de confinement, et nous insistons une fois encore sur son caractère universel : il suffirait de changer les coefficients de diffusion et de sécrétion par ceux de la littérature pour étudier la diffusion un nouvel antigène dans notre système. De même, rien n'empêche de changer les proportions géométriques du problème, par exemple pour considérer un sphéroïde plus petit.

Pour terminer, revenons sur un point de notre étude : il n'y a pas de corrélation évidente entre la taille de nos agrégats et leur niveau sécrétion. Pourtant, les variations de l'aire projetée (typiquement 25%) mesurée par analyse d'image traduisent une variation de 37% dans le nombre de cellule par sphéroïde, soit 78 cellules d'écart typique dans notre population de sphéroïdes. Si les cellules étaient identiques, on devrait obtenir plus de VEGF sécrété pour des agrégats contenant davantage de cellules. Dans le prochain et dernier chapitre, on va chercher à parler de l'hétérogénéité de notre population de cellules primaires, et à la relier à nos observations sur puce microfluidique.

Chapitre 4

Quantifier l'hétérogénéité dans une population de sphéroïdes

Unis dans la diversité

Proverbe Européen

On souhaite s'attarder sur le caractère hautement variable des mesures sur sphéroïdes individuels présentées au chapitre précédent. Ces sphéroïdes, tout en étant issus d'une même suspension cellulaire initiale, semblent produire des quantités différentes de VEGF, au niveau intracellulaire comme extracellulaire, sous forme de sécrétion. Nous allons d'abord prendre le temps de caractériser les différentes hétérogénéités que l'on pourra constater à l'échelle du sphéroïde unique, puis tenter de les relier à une variabilité entre les cellules qui le constitue. Dans un troisième temps, on va s'attacher à discuter des relations entre les deux échelles (cellule unique / sphéroïde), et à relier notre étude à celles menées dans la littérature.

4.1 Hétérogénéités inter-sphéroïdes

4.1.1 Hétérogénéité dans les sécrétions

Dans cette section, on reprend les mesures de fluorescence associées à des niveaux de sécrétion étudiés dans le chapitre précédent. Pour rappel, les expériences consistaient à laisser incuber les sphéroïdes dans leurs gouttes pendant des temps variables, puis à étudier, par un immuno-essai sur bille, leur sécrétion de VEGF. Si l'on regarde la distribution des intensités de fluorescence mesurées sur chaque puce, on constate qu'elle prend toujours une forme piquée mais non gaussienne, avec une tendance asymétrique vers les hautes valeurs de fluorescence (Figure 4.1A-C).

Pour aller plus loin, on se propose de normaliser ces distributions puis de les comparer à une distribution modèle issue de la littérature. Salman et al. [232], en mesurant la production de protéines fluorescentes sur des populations de bactéries, observaient systématiquement une forme de distribution non gaussienne avec un fort moment d'ordre 3. Ils normalisent ces distributions en soustrayant la valeur moyenne, puis en divisant par la déviation standard. A ce stade, ils constatent que toutes leurs distributions sont bien représentées par une distribution modèle dite de Fréchet, dont on donne ici l'expression :

$$F(fluo, k, m, s) = \frac{1}{ks} \left(\frac{fluo - m}{s} \right)^{-(1/k)-1} e^{-((fluo-m)/s)^{-1/k}} \quad (4.1)$$

Dans ce type de distributions, le paramètre de position m (diminutif de *minimum*), représente le point de départ en x de la distribution. Le paramètre s (diminutif de

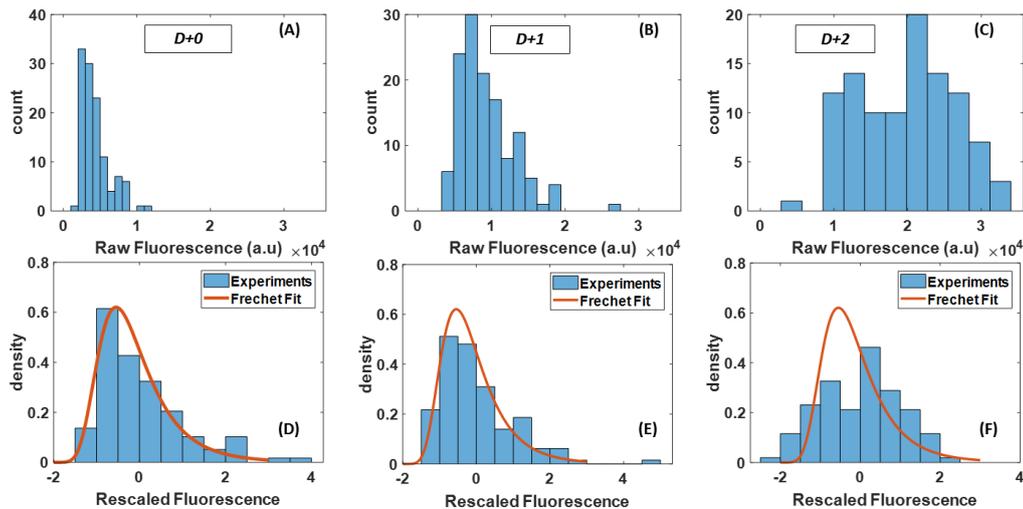


FIGURE 4.1: **Caractère universellement non gaussien des distributions de sécrétome.** (A-C) Distributions d'intensités de fluorescence mesurées sur les billes au côté de sphéroïdes incubés respectivement 4, 24 ou 48 heures avant introduction de l'immuno-essai pour la quantification du VEGF sécrété. (D-F) Distributions correspondantes normalisées et comparées à une distribution de Fréchet. Paramètre du fit Fréchet : $k=0.085$; $m=-7.5$; $s=7$. Coefficients de détermination $R^2_{D+0} = 0.944$, $R^2_{D+1} = 0.921$, $R^2_{D+2} = 0.374$.

scale) donne une indication sur l'étendue en x de la distribution : plus s est grand, plus la distribution est large. Quant à k , le paramètre de forme, il est d'autant plus faible que la distribution est piquée [233].

Dans nos expériences, si l'on procède exactement à la normalisation par soustraction de la moyenne et division par la déviation standard, les distributions de sécrétion à temps courts – c'est à dire sur des sphéroïdes ayant incubé $t = 4$ h – et moyens – i.e. $t = 24$ h – semblent se conformer à une distribution de Fréchet unique avec des paramètres donnés par Salman et al. (Figure 4.1D-E). A temps longs en revanche, la distribution perd son caractère asymétrique et l'on perd l'accord de l'expérience avec notre distribution modèle, comme l'illustre la Figure 4.1F. Toutes ces observations sont répétables sur $N \geq 2$ puces.

Si l'on considère que la forme de nos distributions est directement liée à des différences de sécrétion, et non à des biais expérimentaux, il y a un message fort derrière le choix d'une distribution non-gaussienne comme celle de Fréchet. Elle exclut en effet de voir le processus de sécrétion comme un événement aléatoire, qui donnerait une distribution normale autour d'une valeur moyenne. Ici au contraire, la sécrétion de VEGF apparaît plutôt comme une suite d'événement hautement corrélés traduits par une loi log-normale [232, 234].

Par ailleurs, nous ne sommes pas les premiers à observer une différence entre les signaux à temps courts et à temps longs. Banergee et al. [235], en mesurant la production d'une protéine fluorescente par des bactéries, avaient ainsi constaté un changement de la forme de la distribution de fluorescence des bactéries : entre la 5^{ème} et la 15^{ème} heure de leurs expériences, la population de bactérie passe ainsi d'une distribution log-normale à une distribution gaussienne. Dans leur étude, ils attribuent cette réduction relative du "bruit" biologique à la présence d'un phénomène répresseur – en l'occurrence une concentration de Lac-repressor.

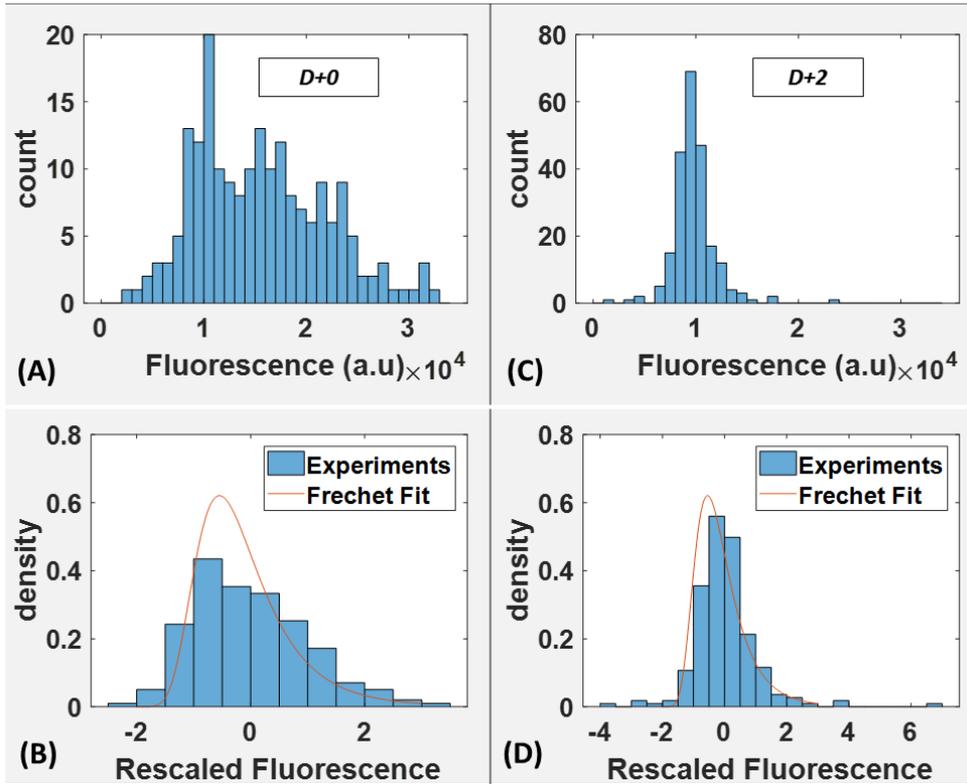


FIGURE 4.2: **Production intracellulaire de VEGF.** Histogrammes de fluorescence des sphéroïdes marqués anti-VEGF intracellulaire. Mesures de fluorescence moyenne sur des sphéroïdes uniques, à D+1 et D+3. Paramètre du fit Fréchet : $k=0.085$; $m=-7.5$; $s=7$. $R_{D+0}^2 = 0.731$, $R_{D+2}^2 = 0.9886$

4.1.2 Hétérogénéité des signaux intracellulaires

On peut rajouter à ce premier constat sur les sécrétions des mesures sur nos populations de sphéroïdes de MSC, que l'on a immuno-marqué pour y détecter le VEGF intracellulaire en fluorescence. On considère ici des sphéroïdes "jeunes", c'est à dire incubés pendant $t = 4h$ avant d'être mis en contact avec des billes de détection. A temps courts donc, on observe là aussi une asymétrie de la distribution des intensités de fluorescence intracellulaires mesurées sur les sphéroïdes, comme le montre la Figure 4.2A-B. Cette asymétrie est dirigée vers des hautes valeurs de fluorescence. Si l'on normalise ces distributions selon la même méthode que dans le paragraphe précédent, on retrouve un bon accord relatif ($R_{D+0}^2 = 0.731$) avec la distribution fréchétienne, avec les mêmes paramètres que pour les distributions extracellulaires.

A temps longs, les distributions brutes de fluorescence intracellulaires deviennent très étroites, mais aussi plus symétriques (voir Figure 4.2C). La normalisation pratiquée jusqu'à présent étale ce pic symétrique et fait apparaître un accord artificiel avec la distribution de Fréchet (voir Figure 4.2D), avec $R_{D+0}^2 = 0.9886$.

Pour valider nos observations à temps courts, on répète l'expérience, sur un autre lot de MSC, avec d'autres paires d'anticorps anti-VEGF, et surtout sans utiliser de test immunologique avec des billes avant de réaliser l'ICC. L'expérience, réalisée par un autre expérimentateur, donne des résultats présentés Figure 4.3. Sur le graphe (A), on voit apparaître une distribution bimodale, avec un pic étroit, à basses valeurs de fluorescence, et un autre plus large, moins symétrique, à de hautes valeurs de fluorescence.

Notons que le pic le plus bas est sans doute attribuable à des signaux non spécifiques à VEGF : au sein de la puce, certains sphéroïdes peuvent ne pas avoir été mis en contact avec les solutions d'anticorps, du fait d'interfaces parasites les isolant des autres. On propose donc de tronquer la distribution bimodale pour ne garder que le pic spécifique. Sur cette distribution, on commence par imposer un modèle de distribution normale, Figure 4.3B, pour évaluer sa valeur moyenne et sa variance. Sur la distribution normalisée par soustraction de la moyenne et division par la déviation standard, on constate une nouvelle fois une forte asymétrie des signaux de fluorescence, que l'on illustre par un fit de Fréchet, toujours avec les paramètres de Salman et al. (Figure 4.3C). On peut également évaluer le paramètre d'asymétrie de la distribution tronquée, qui vaut ici $\gamma = 0.60$. Pour rappel, la skewness γ d'une distribution est le troisième moment de cette distribution. Son signe indique la direction de l'asymétrie, elle est positive pour un étalement vers les valeurs hautes, négatives pour les valeurs basses, et vaut 0 pour une distribution normale. Il est d'usage de considérer que, pour $1/2 < |\gamma| < 1$, la distribution est significativement asymétrique [236].

Le résultat de cette section est donc confirmé : les niveaux de production intracellulaire de VEGF – mesurée par ICC sur les plans médians des sphéroïdes – ne suivent pas une loi normale, et présentent au contraire une asymétrie vers les fortes productions. Cette tendance est traduite par un bon accord avec des lois lognormales comme celles de Fréchet. Par la suite, on se contentera de réaliser des fit avec des lois log-normales simples, plus simples à interpréter.

En conclusion de cette partie, il existe une forte hétérogénéité dans les expressions extra et intracellulaires de VEGF par les sphéroïdes de MSC. De façon répétable, la fluorescence observée sur les sphéroïdes et dans les immuno-essais à temps courts présentent des asymétries vers les fortes valeurs. A temps longs, la distribution de signal intracellulaire devient relativement homogène, gaussien, mais cela est peut-être attribuable à une perte d'activité cellulaire. On renvoie à notre calcul de la Section 3.3.3 : on estimait ainsi que la totalité du glucose de la goutte avait été consommé par le sphéroïde de MSC au bout de 50 heures [210]. Dans la partie suivante, on souhaite comprendre pourquoi nos signaux VEGF sont aussi hétérogènes, en s'intéressant à ceux des cellules qui composent le sphéroïde. On utilisera pour cela l'analyse d'image et la cytométrie de flux pour accéder aux productions individuelles du VEGF par ces cellules.

4.2 Hétérogénéités intra-sphéroïdes

4.2.1 Analyse des cellules dans un sphéroïde

Intéressons-nous donc à l'hétérogénéité entre les cellules qui composent le sphéroïde. Sur la population de sphéroïdes observée en ICC et décrite Figure 4.3, on peut ainsi utiliser une décomposition dite de Voronoï (Figure 4.4), basée sur l'image de fluorescence où l'on repère les noyaux des cellules, pour découper artificiellement le sphéroïdes en ses cellules constitutives. Notons que l'on effectue cette découpe dans le plan médian du sphéroïde, en faisant l'hypothèse qu'il est représentatif de la sphère entière. Notons aussi que c'est à partir de cette méthode que Sart et al. [225] évaluaient la taille typique et l'expression de l'enzyme COX-2 en fonction de la position dans le sphéroïde.

Sur la Figure 4.5 on représente la distribution des fluorescences des cellules qui composent nos sphéroïdes. Comme pour celle des sphéroïdes, on remarque que cette distribution est bimodale, le premier pic rendant compte de cellules non-spécifiquement

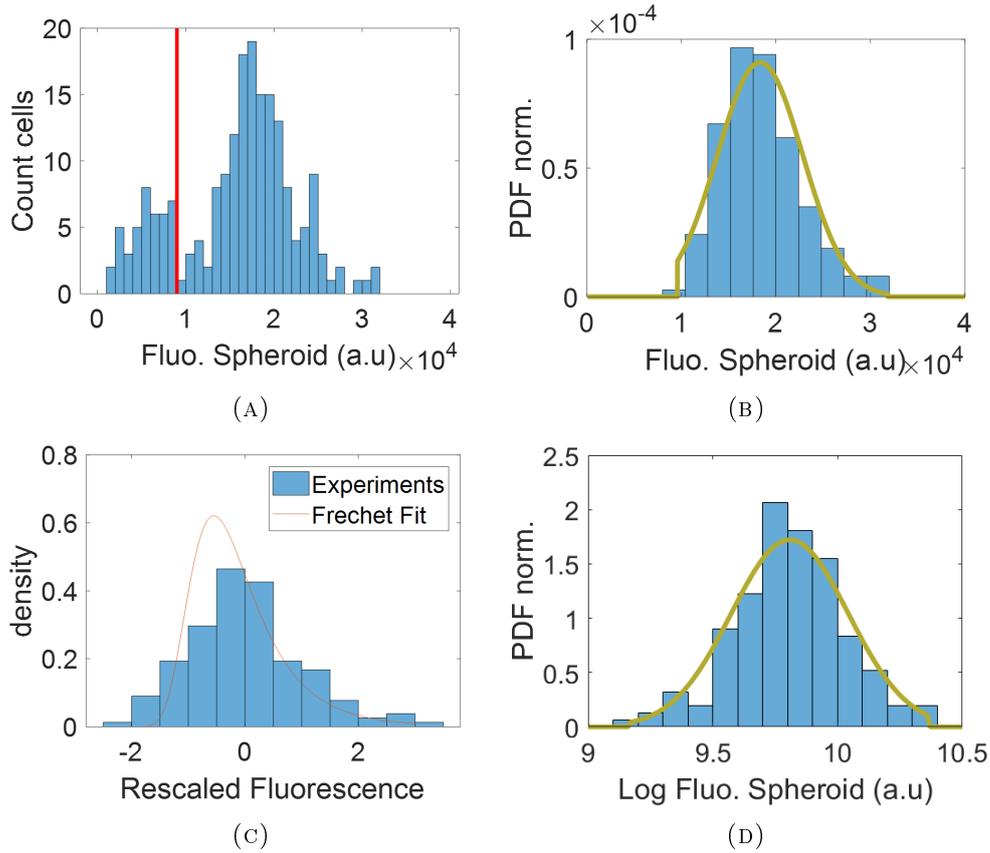


FIGURE 4.3: **Validation avec réplicat biologique.** (A) Distribution de fluorescences moyennes mesurées sur un plan médian du sphéroïde, à $D+1$. Expérience réalisée par Sébastien Sart, traitement avec le code habituel donnée en annexe. (B) Distribution amputée du pic aspécifique et fittée par une distribution normale. ($\mu = 1.83e + 04, \sigma = 4.50e + 03$). (C) Distribution amputée, normalisée par soustraction de la moyenne et division par la std, fittée par une distribution de Fréchet. $k=0.085$; $m=-7.5$; $s=7$; $R_{D+0}^2 = 0.8345$. (D) Distribution amputée, non-normalisée, fittée par une distribution log normale de paramètres ($m = 9.808, \nu = 0.235$)

attachées à l'anticorps anti-VEGF primaire. La distribution a une asymétrie valant 0.63, et un cv de 58%.

Sur cette distribution, le premier pic est retiré par l'application d'une valeur seuil, puis une distribution log-normale de paramètres ($\mu = 9.96, \sigma = 0.45$) est superposée aux données, fit que l'on montre Figure 4.5B. Pour rappel, la loi log-normale a pour fonction densité :

$$f_X(x) = \frac{1}{x\sigma\sqrt{2\pi}} \exp \frac{-(\ln(x) - \mu)^2}{2\sigma^2}. \quad (4.2)$$

En valeur brute de fluorescence, la distribution obtenue a une moyenne de $2.18 \cdot 10^4$ a.u et un C.V de 41%. Le troisième moment de cette distribution expérimentale tronquée vaut $\gamma_{exp} = 0.95$. Ici, on traduit donc une forte asymétrie vers les valeurs élevées de fluorescence au sein de la population de cellules.

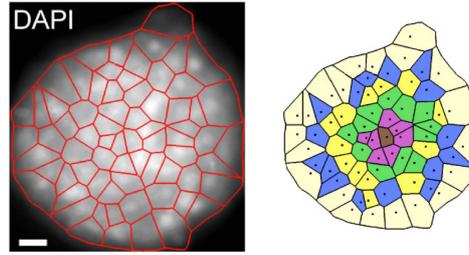


FIGURE 4.4: **Découpage Voronoï du sphéroïde à partir de son marquage nucléaire.** Schéma de principe du découpage par cellule de la microphotographie du sphéroïde. $N=69$ cellules détectées. Adapté de [225].

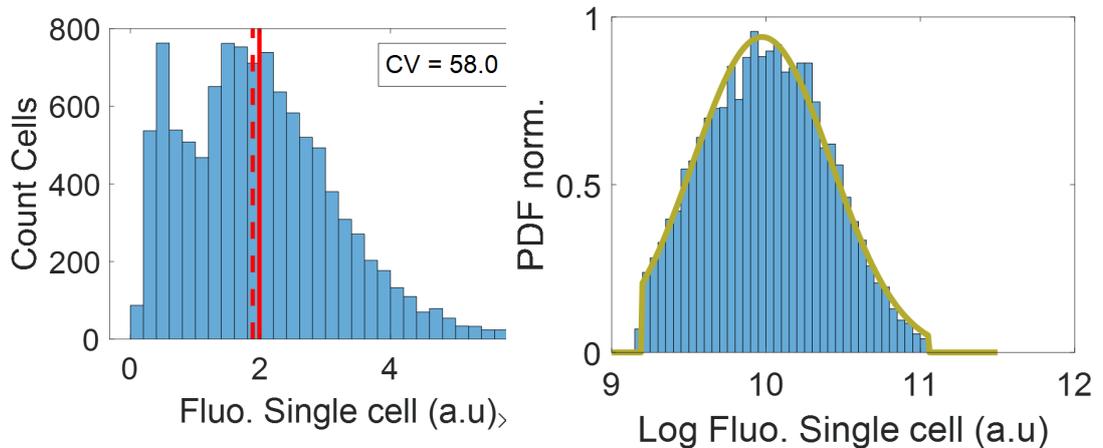


FIGURE 4.5: **Distribution des intensités ICC reliées au VEGF dans les cellules qui composent notre population de sphéroïdes.** (A) Distribution brute de fluorescence des cellules, $n=10683$ cellules, réparties dans $N=234$ sphéroïdes. La ligne pleine représente la moyenne, celle en pointillés la médiane de la distribution. (B) Le pic aspécifique a été soustrait, et la distribution fittée par une fonction log normale tronquée ($\mu = 9.96, \sigma = 0.45$).

4.2.2 Confirmation en cytométrie

Pour confirmer les observations obtenues par analyse d'images, une autre manière de mesurer l'hétérogénéité de nos populations cellulaires consiste à passer nos cellules dans un cytomètre de flux. On cultive à nouveau des sphéroïdes de MSC, que l'on laisse incubé une nuit en goutte fermée. Le lendemain, on réalise, comme dans le chapitre précédent, une ICC pour visualiser le VEGF intracellulaire dans ces sphéroïdes. En guise de contrôle négatif, l'une des puces n'est pas mise en contact avec l'anticorps primaire anti-VEGF, et ne reçoit que l'anticorps isotype de détection. Au lieu d'imager les puces en épifluorescence, on y applique un fort écoulement de solution-tampon PBS pour déloger les sphéroïdes, que l'on récupère dans un tube de $0.5 \mu\text{L}$. En utilisant un agent de clivage des protéines membranaires – la trypsine – on peut disperser les cellules de tous les sphéroïdes, et les analyser en cytométrie de flux. Les événements détectés par le cytomètre sont triés de façon à éliminer les signaux provenant de poussières ou de débris cellulaires.

Sur la Figure 4.6, on montre ainsi les mesures FACS de la puce contrôle-isotype et de la puce positive. On doit noter immédiatement que l'échelle de fluorescence est

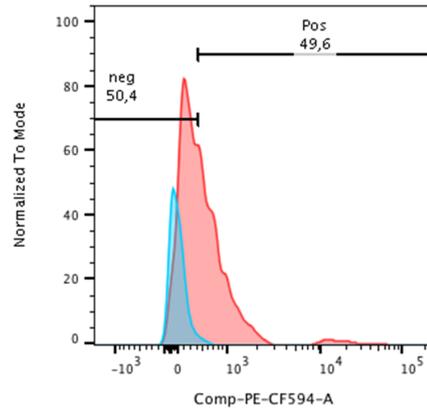


FIGURE 4.6: **Cytométrie de flux pour constater une hétérogénéité de l'expression de VEGF entre les cellules.** Density plot de la fluorescence des cellules qui constituent les sphéroïdes, en échelle semi-logarithmique. Obtenu à parti d'une culture de sphéroïdes de MSC à D+1 après chargement. Le signal bleu est celui du contrôle négatif, correspond au niveau du signal non-spécifique.

logarithmique, pourtant la distribution n'est pas gaussienne. Même en retirant la composante a-spécifique, l'asymétrie de la distribution de fluorescence est extrêmement importante, la skewness γ_{cyto} étant notamment évaluée à 1.094. Les mesures obtenues en microscopie, après discrétisation de Voronoï, sur le plan médian du sphéroïde, traduisent donc bien une réalité biologique : il existe une extrême hétérogénéité d'expression du VEGF dans les cellules qui composent les sphéroïdes de MSC.

4.3 Discussion et modèles

4.3.1 Loto cellulaire

Ce qui se dégage des deux parties précédentes, c'est qu'il existe une grande hétérogénéité inter-cellules de production de VEGF. Une variabilité comparable est observée dans le signal de fluorescence moyenné associé à VEGF dans les populations de sphéroïdes. Ce que nous voudrions, c'est comprendre si cette dernière variabilité est juste l'héritage de celle des cellules uniques, ou bien s'il existe un comportement collectif au sein du sphéroïde qui dépasse la simple addition des signaux de ses cellules constitutives.

Pour commencer, on se propose de faire un petit jeu de probabilités : on considère à nouveau la distribution de fluorescence des cellules marquées anti-VEGF, de fluorescence x_i observée et commentée Figure 4.5. Sur cette distribution, on réalise des tirages aléatoires sans remise de N cellules pour en faire le sphéroïde numéro j , dont la fluorescence X_j s'écrit : $X_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$. On crée ainsi des distributions de fluorescence simulées pour 252 sphéroïdes qui contiennent chacun N cellules. Sur la Figure 4.7, on donne l'exemple de distribution de sphéroïdes obtenues en observant $N=10, 20, 30$ ou 40 cellules par sphéroïde. Ces distributions sont toutes centrées sur une valeur proche de $2,3 \cdot 10^4$ a.u, en revanche leur moment d'ordre 3 passe de 0.47 pour $N=10$ cellules à 0.23 pour $N=20$ cellules, puis passe alternativement par des valeurs positives et négatives proches de 0 pour 30 et 40 cellules considérées.

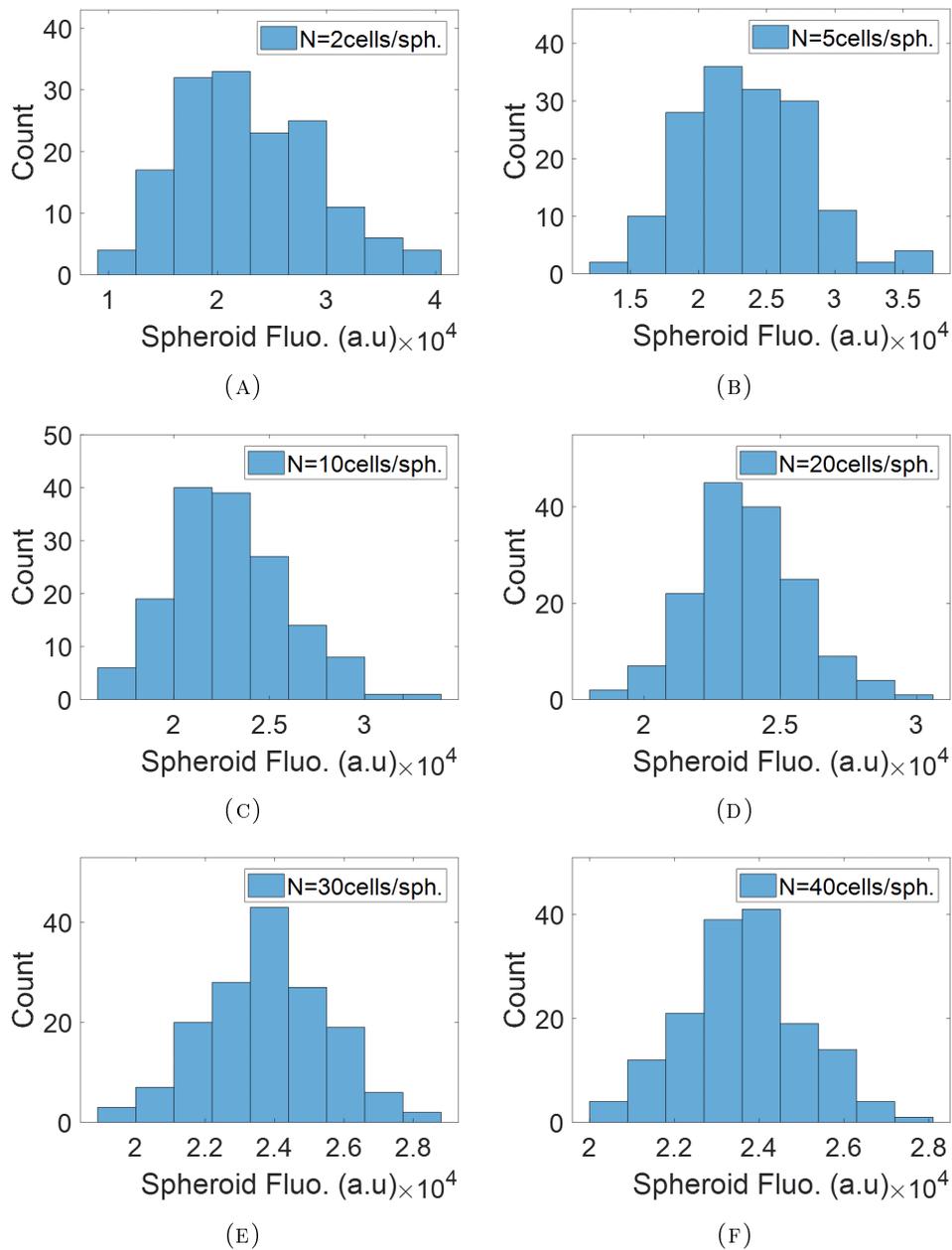


FIGURE 4.7: **Plus de cellules considérées, moins d'hétérogénéité à l'échelle du sphéroïde.** Distributions simulées de fluorescence des sphéroïdes, en considérant (A) 2, (B) 5, (C) 10, (D) 20, (E) 30, (F) 40 cellules dans le plan médian du sphéroïde. $n=155$ sphéroïdes par distribution. La fluorescence des sphéroïdes est calculée comme la moyenne des fluorescences des cellules qui le composent.

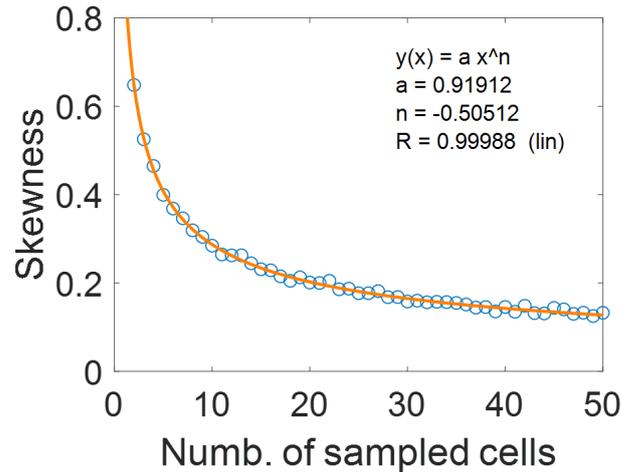


FIGURE 4.8: **Asymétrie évanescence.** Evolution du troisième moment des distributions de fluorescence des sphéroïdes, moyennée sur 1000 itérations de la simulation. Fit avec une loi de puissance, préfacteur $a=0.91$ et puissance $n=-0.505$, $R>0.999$.

En répétant cette expérience plusieurs fois, on peut générer une grande quantité de distributions pour différents N et calculer pour chacune son troisième moment. Figure 4.8, on représente le troisième moment moyenné sur 1000 répétitions de l'expérience, en fonction du nombre de cellules considérées dans le plan médian du sphéroïde. Comme précédemment, on observe que cette "skewness" (asymétrie) diminue lorsque le nombre de cellules augmente, et qu'elle suit relativement bien une loi de puissance en $\frac{1}{\sqrt{N}}$. Le troisième moment lu à l'origine de la courbe est évalué à $\gamma_{simu} = 0.919$, alors que nous devrions retomber sur la valeur de la distribution de cellule unique qui valait $\gamma_{exp} = 0.950$. L'écart des simulations avec les données expérimentales peut s'expliquer par les incertitudes sur les premiers points de la Figure 4.8. Il y a un nombre fini de répétitions pour ces simulations, et pour N de l'ordre de 1, l'asymétrie des distributions simulées devient très variable. Du reste, on peut rapprocher nos observations des conditions d'application du Théorème Central Limite : une somme de N variables aléatoires converge vers la loi normale. Le théorème de Berry-Esseen précise même que cette convergence se fait avec une vitesse de $1/\sqrt{N}$, ce que nous vérifions ici, même avec des N relativement petits. Notons qu'il serait intéressant de trouver le lien théorique pour relier nos distributions X_j à celle des x_i . Trouver la fonction densité de probabilité d'une somme de variables log-normales est cependant un problème complexe, qui fait l'objet d'études anciennes [237, 238] aussi bien que récentes [239, 240].

Terminons en comparant expérience et simulation : avec nos protocoles de culture, le nombre de cellule observées dans le plan médian est de l'ordre de 50. Pour preuve, on peut revoir la Figure 4.4, dans laquelle étaient détectées une soixantaine de cellules. Pour $N = 60$ cellules, la simulation prédit une skewness de 0.11, c'est à dire une distribution proche de la loi normale. Cette prédiction est loin de la valeur mesurée expérimentalement, qui est systématiquement supérieure à 0.60. Il semble donc exister un effet collectif entre les cellules du sphéroïde, qui change sa production globale de VEGF.

En pratique, le nombre de cellules détectées en Voronoï peut varier au sein d'une même puce, et on trouve en fait un mélange de sphéroïdes ayant un nombre de cellules imagées allant de 20 à 70. Pour améliorer la qualité de notre étude numérique, il

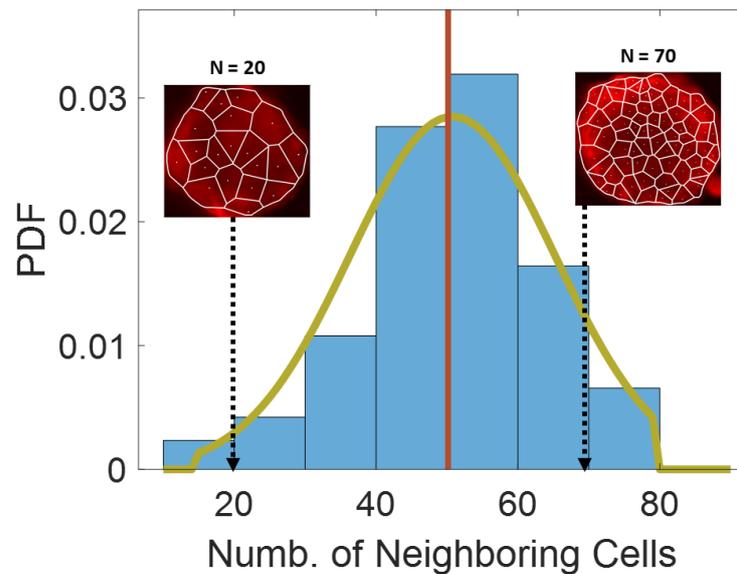


FIGURE 4.9: **Le nombre de cellules imagées est une variable aléatoire.** Distribution du nombre de cellules imagées dans le plan médian des sphéroïdes. Fit loi Normale, $\mu = 50.7$, $\sigma = 14.5$. Moyenne indiquée en rouge, $N = 50.1$.

faudrait considérer N le nombre de cellules imagées comme une variable aléatoire qui suit une loi de probabilité donnée par l'expérience (voir Figure 4.9).

4.3.2 Mot de conclusion sur l'hétérogénéité sur puce

Dans la théorie, le nombre de cellules imagées est crucial dans la perception de nos distributions de sphéroïdes. Si le nombre de cellules est trop petit, typiquement moins d'une trentaine, l'hétérogénéité cellulaire devient prépondérante, et les distributions de fluorescence liées au sphéroïde deviennent asymétriques.

Ainsi, voir de l'asymétrie dans les distributions de sécrétions de VEGF est une information importante : elle révèle que seulement quelques cellules sont impliquées dans l'action paracrine des sphéroïdes. Et identiquement, le fait que les distributions de sécrétomes à temps longs se rapproche d'une loi normale nous indique que le temps vient "gommer" l'hétérogénéité cellule-cellule. L'origine de ce gommage est peut-être simplement dû à un épuisement métabolique des cellules, c'est pourquoi une étude est en cours pour déterminer l'état de ces cellules, en fonction des différents métabolites (sucre, acides aminés, etc.) disponibles dans la goutte après un temps donné d'incubation.

L'une des limitations de notre système pour quantifier cette hétérogénéité est d'ordre optique. L'étude menée dans ce chapitre repose principalement sur le principe d'ICC quantitative, c'est à dire sur une hypothèse de proportionnalité du signal de fluorescence mesuré avec la réalité biologique – ici la quantité de VEGF intracellulaire. Des arguments peuvent s'opposer à cette hypothèse : les anticorps anti-VEGF diffusent-ils suffisamment au sein du sphéroïde ? La lumière émise par le microscope à épifluorescence pénètre-t-elle de façon homogène dans l'ensemble du sphéroïde ? D'un piège capillaire à l'autre, quel est l'effet des variations de distance de travail par rapport à l'objectif, dues à différentes épaisseurs de PDMS ou à la position du sphéroïde ? La plupart de ces effets ont été écartés par des tests-témoins. Cela étant, le plus

simple d'un point de vue de l'analyse d'image comme des interprétations serait de disposer de lignées cellulaires produisant leur propre fluorescence VEGF-dépendante, et de les imager plan-à-plan, par exemple en microscopie confocale, pour disposer de la distribution complète des cellules dans chaque sphéroïde.

Révéler l'hétérogénéité biologique, et la décorréler du bruit expérimental, a été l'objet de l'étude d'Antoine Barizien [241]. Dans son manuscrit de thèse, il met notamment en évidence la possibilité de remonter à des dynamiques de division chez des bactéries élevées en gouttes microfluidiques, et ce malgré la dispersion naturelle des signaux de fluorescence, et la distribution poissonnienne des cellules dans les gouttes. C'est vers ce type d'études mathématiques qu'il faudrait se diriger pour remonter, à partir de nos spectres de fluorescence, à des informations sur la population de cellules dans le sphéroïde.

Conclusions

La problématique posée au départ de cette thèse est essentiellement d'ordre technologique : on se demande s'il est possible de mesurer les sécrétions d'un grand nombre de sphéroïdes uniques, en utilisant la microfluidique, et avec la microscopie comme seul outil de lecture. Pour y répondre, nous avons pris à bras le corps l'idée d'immuno-essai, quitte à revenir aux fondamentaux de fonctionnalisation de surface par des anticorps. Nous avons ainsi mis en place plusieurs protocoles pour quantifier des concentrations de cytokines à l'intérieur de gouttes microfluidiques. Pour moi comme pour mon équipe, cette implémentation d'immuno-essais "on-chip" a représenté un premier contact extrêmement formateur avec le monde des protéines et des macromolécules.

Cette problématique technologique nous a également forcés à affronter de nombreuses questions fondamentales, sur ce que signifie miniaturiser un test immunologique, notamment en termes de dynamique et de sensibilité. Les phénomènes de diffusion, de sécrétion, et de capture des antigènes que l'on cherche à quantifier changent radicalement d'ordres de grandeur lorsque l'on passe d'un système de gouttes très petites, adaptées par exemple à des cellules uniques [76], à des gouttes d'un demi-millimètre de diamètre, utilisable pour la culture cellulaire 3D. En termes de détection de la fluorescence, qui est notre observable de prédilection, les rapports signal sur bruit sont également différents dans une puce microfluidique à double couche de polymère comparé à des systèmes de cytométrie, où des lasers frappent directement la surface à scanner.

L'expérience finale que nous proposons dans cette thèse est conceptuellement simple : fabriquer des puces microfluidique, générer des gouttes, élever des cellules, imager des billes en fluorescence, et exploiter numériquement les images, aucune de ces étapes prises séparément ne représente de difficulté majeure. Cela dit, seule une rigueur d'acier permet de maîtriser l'empilement de ces différentes étapes sans introduire à chaque pas une nouvelle source de variabilité, qu'elle soit optique, fluïdique, ou biologique.

Avec prudence et détermination, l'outil que nous proposons pour lire les sécrétions de ces sphéroïdes sera réutilisable pour d'autres types cellulaires, et d'autres antigènes. Il s'agira au préalable d'adapter les raisonnements développés pendant cette thèse, notamment celui de la diffusion dans une goutte fermée, pour se retrouver rapidement dans une gamme dynamique de lecture. Assez vite, on pourra s'attacher à développer des tests multiplexés de plusieurs cytokines (Figure 4.10) : il suffit en principe de mélanger des billes fonctionnalisées contre différents antigènes et de trouver un moyen efficace de les distinguer en microscopie. Pour cette étape, il faut à tout prix privilégier des solutions commerciales - optimisées si besoin par le fabricant - ou à lier des partenariats avec des équipes qui développent les méthodes de quantifications les plus efficaces [242, 243].

À notre connaissance, les mesures de sécrétion sont encore très centrées sur des échantillons liquides de plusieurs dizaines de microlitres, et les tests *single cell* commencent tout juste à émerger sous forme de produits commerciaux de formats extrêmement divers [244]. Entre l'animal qui produit ces échantillons liquides, et la brique élémentaire que constitue la cellule unique, il manque une échelle intermédiaire

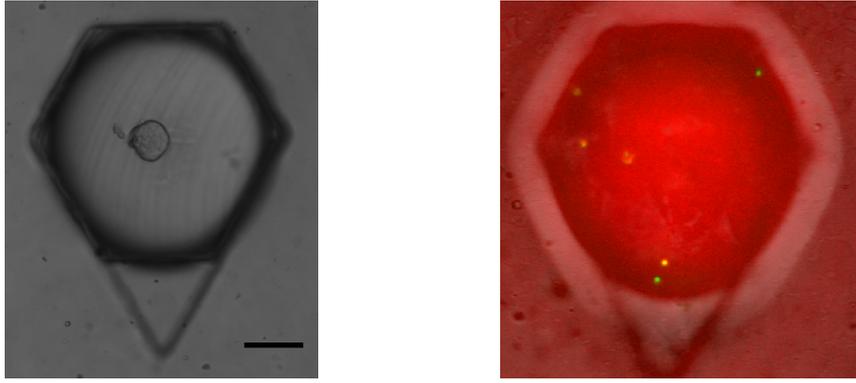


FIGURE 4.10: **Vers des mesures multiplexées sur nos sphéroïdes.** (A) Puits contenant un sphéroïde de cellules cancéreuses A673. (B) Microphotographies combinant lumière blanche, signal du barcode (en vert) et signal spécifique (en rouge). Deux billes dans le même plan focal présente des intensités de fluorescence rouge très différentes : l'une est sans doute fonctionnalisée anti-IL-1 β , l'autre anti-VEGF, mais comment les distinguer ?

d'étude du vivant. Avec notre plateforme microfluidique, nous ouvrons modestement une nouvelle voie d'étude des sphéroïdes uniques, qui s'inscrit dans un mouvement global des scientifiques vers l'étude des phénotypes en 3D [245].

Plus que notre façon colorée et facile d'approche de notre test en goutte, notre protocole se démarque par son caractère haut-débit, qui permet de suivre en parallèle jusqu'à deux cent cinquante agrégats. La quantité de données générées à chaque expérience étant plus dense, il devient aisé de tester des conditions différentes et de révéler des effets légers sur le sécrétome ou la morphologie des sphéroïdes, comme nous l'avons fait avec l'indométacine.

De la même façon que l'étude des cellules uniques a révélé des comportements cellulaires nouveaux et des événements biologiques rares, il est attendu que l'étude de sphéroïdes uniques va nous en apprendre beaucoup sur l'évolution des tissus, leurs réponses à des stimuli bio-mécaniques, leur influence sur les cellules voisines. Dans cette étude, se contenter d'observer la position de quelques protéines membranaires ou cytoplasmiques serait une erreur, et disposer de l'observable sécrétion représente une information précieuse.

Avec le temps, tous nos protocoles seront amenés à se standardiser : notre puce et son test immunologique ne demandera plus les compétences de microfluidicien chevronné, d'analyste d'image honnête, de prudent biochimiste des anticorps, de biologiste cellulaire novice, et de microscopiste amateur, que j'ai dû développer au cours de mes trois ans de thèse. A titre personnel, je suis extrêmement fier d'avoir participé à cet élan vers des systèmes biologiques possiblement plus représentatifs du Vivant. La multiplication des études sur des populations d'agrégats se démocratise, pour mimer des tumeurs ou construire des organes, en témoigne la création de nombreuses start-up commercialisant des dispositifs de culture 3D à destination des laboratoires et des industries [246].

Suivant la montée du véganisme ambiant, et celle de la cause animale en général, on ne peut que souhaiter que ce développement des sphéroïdes concurrence petit à petit l'expérimentation sur les mammifères [247]: comment en effet choisir une cage de surface au sol 60 cm² pour un cobaye unique [248], quand une puce trois fois plus petite, fluide incluse, en contient 250 ? On peut sans doute arguer que les expériences *in vivo* ont une représentativité bien supérieure, avec des tissus cellulaires multiples, des fluides physiologiques circulant, et un cocktail unique de molécules

actives allant de l'hormone à la protéine. Mais pris séparément, on doit pouvoir mimer chacun de ces éléments : un organe est-il si différent d'un ensemble de cellules organisé et irrigué ? D'ailleurs, on ne compte plus les études qui se prêtent au jeu de l'organe sur puce [249]. Des fluides circulants n'apportent que des contraintes mécaniques quantifiables et une diffusion améliorée. Quant au cocktail unique de molécules biologiques, il n'est aujourd'hui d'échantillon que les sciences analytiques puisse décomposer en ses composants. La représentativité de l'*in-vivo* de laboratoire est également à discuter : la souris de laboratoire doit être élevée à température ambiante selon les recommandations européennes [248] : pourtant cette température ne lui est pas naturelle et peut induire des perturbations de son organisme [250]. Comment préférer un système biologique en état de stress thermique, à des sphéroïdes aisément maintenus à 37 degrés sous un incubateur ?

Les biais expérimentaux de la culture 3D existent sans aucun doute, et il nous appartiendra de les corriger ou d'en tenir compte. D'aucuns peuvent par exemple s'interroger sur le caractère physiologique des concentrations qui règnent à l'intérieur d'une goutte si petite au bout de quelques heures. De même, rien ne garantit que des cellules mécano-sensibles supportent sans broncher les contraintes qu'elles subissent lors de leur arrivée dans la goutte.

En attendant d'avoir identifié tous ces biais, je crois en la rigueur des chercheurs qui me succéderont, en particulier ceux de l'équipe de Charles Baroud, pour limiter leur impact, mener les expériences les plus brillantes sur nos géométries microfluidiques, et y faire éclater de solides vérités scientifiques.

Annexe A

Une plateforme microfluidique frugale

A l'échelle d'une simple thèse, on produit typiquement entre 1.5 et 3 Tb de données, principalement des images et des fichiers vidéo. C'est dire l'exploitation quasi-permanente des microscopes de l'équipe. Dans les premières années de ce projet, cette exploitation constitue une importante limitation de nos campagnes expérimentales. Nos opérations microfluidiques, même les plus simples, sont en effet effectuées sur ces microscopes, même si elle ne mobilisent pas leurs performances optiques ou leur motorisation.

Dans cette partie, on expose une stratégie de désengorgement des microscopes en mettant en place des plateformes microfluidiques simplistes mais utilitaires pour les opérations ne nécessitant pas de mesures quantitatives. Ce microprojet est le fruit d'une collaboration avec Caroline Frot, ingénieur de recherche à l'Ecole Polytechnique.

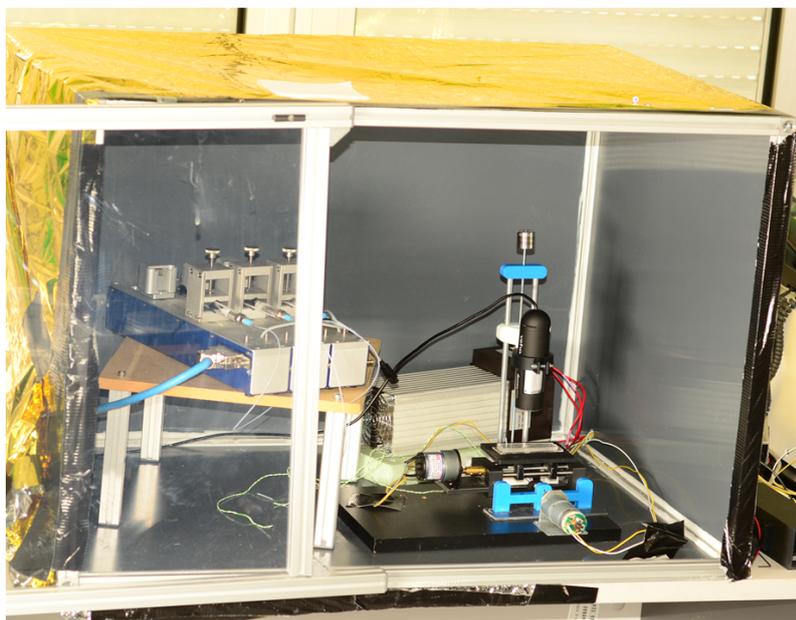


FIGURE A.1: **Une boîte thermostatée pour la microfluidique.** Structure en PVC armature aluminium recouverte d'une couverture de survie. L'ensemble contient les pousse-seringues, un microscope USB, une platine motorisée et un radiateur, le tout contrôlé par un ordinateur voisin. L'ensemble fait $1 \times 1 \times 1$ m.

Sur la Figure A.1, on présente l'aspect général de la boîte à gants : c'est une boîte en PVC avec une armature faites de profilés aluminium, recouverte d'une couverture de survie pour limiter les déperditions de chaleur. La face avant, coulissante,

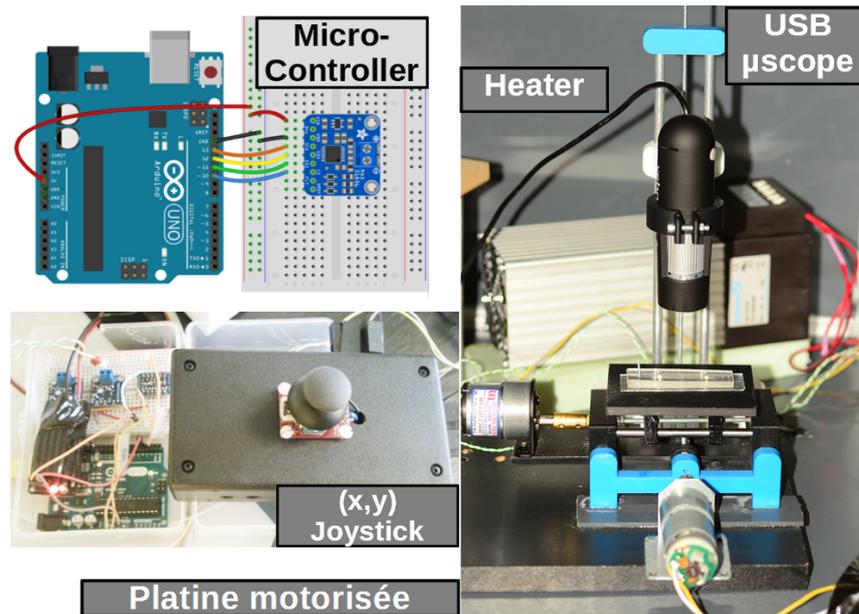


FIGURE A.2: **Elements constitutifs de la boîte à chargement.** Un micro-contrôleur Arduino gère la température de la boîte grâce à deux thermocouples placés au niveau de la platine et des seringues. La platine, fabriquée en impression 3D, est déplaçable via deux moteurs par un joystick analogique. Le microscope USB est réglable en focale, et déplaçable en z entre deux rails verticaux.

est en plexiglass transparent, dans lequel sont percés deux trous, non visibles sur la photographie, pour permettre la manipulation des puces sans déperdition de chaleur. On aperçoit au travers un microscope USB, monté sur deux rails pour pouvoir régler sa hauteur. La puce microfluidique est déposée sur un support imprimé en 3D, motorisé via deux moteurs perpendiculaires. Ces moteurs sont commandables par un joystick. Derrière, un radiateur est contrôlé par une carte électronique Arduino, avec une rétroaction possible via deux thermocouples présents dans la boîte (voir aussi Figure A.2).

Pour l'aspect pratique, l'ensemble est commandé par un ordinateur voisin, et l'on peut régler, sur un même écran, la température, les débits de fluides dans la puce, et la caméra USB pour acquérir des images (Figure A.3). Le code Processing qui gère l'interface du radiateur est facilement modifiable pour changer les gammes de températures à atteindre, ou simplement l'apparence de la courbe de suivi. En attendant, on s'est contenté de coder un enregistrement systématique des données de température en fonction du temps sous la forme d'un fichier texte : dans les incubateurs classiques, cette option fait défaut, et l'on aimerait souvent savoir s'il n'y a pas eu une chute de température, au milieu de la nuit, pendant une acquisition en time-lapse.

Aujourd'hui, il existe deux versions de la boîte à gants microfluidique, l'une à l'École Polytechnique, l'autre à l'Institut Pasteur. La benjamine s'est vue équipée d'un microscope USB beaucoup plus résolu que celui de son aînée, et il est aujourd'hui question de l'équiper d'un système de refroidissement pour pouvoir utiliser des gels à transition thermique inversée (liquides à basse température, solide à température ambiante). Affectueusement surnommée Spoutnik par ses utilisateurs, la boîte à gants permet aux doctorants (Figure A.4) et post-doctorants (Figure A.5) de réaliser leurs opérations microfluidiques sans encombrer ou souiller les précieux microscopes à fluorescence de l'équipe.

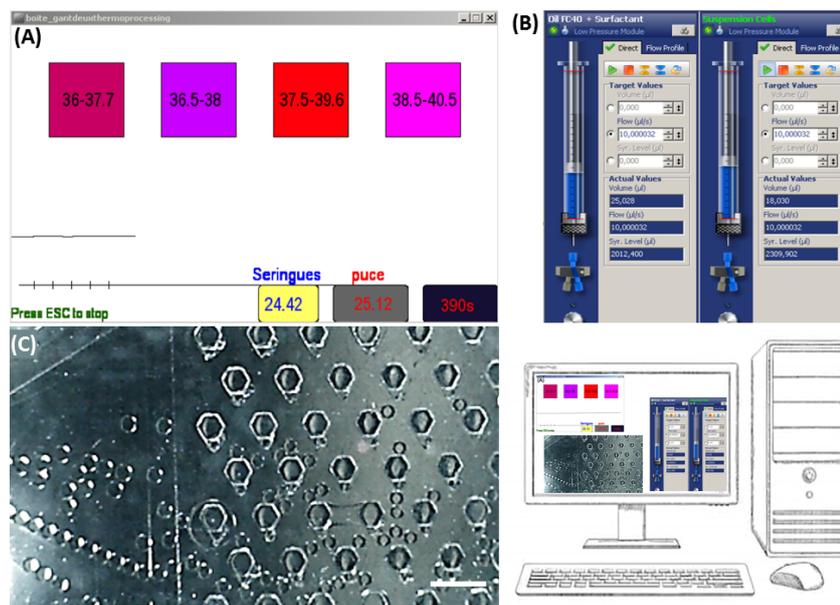


FIGURE A.3: **Gestion simultanée de la température et des débits fluidiques.** (A) Fenêtre de contrôle de la température, interface codée en langage Processing toolbox. On peut y lire la température aux niveaux des deux thermocouples (en bas) mais aussi régler la gamme de température voulue (carrés de couleur). La courbe produite est enregistrée en format texte jusqu'à fermeture du programme. (B) Fenêtre de contrôle des débits fluides via les pousse-seringue Cetoni®. (C) Fenêtre de la caméra USB : visualisation sommaire des événements microfluidiques sur la puce.

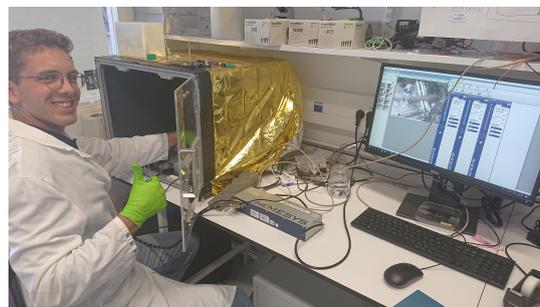


FIGURE A.4: **Spoutnik et un doctorant.**

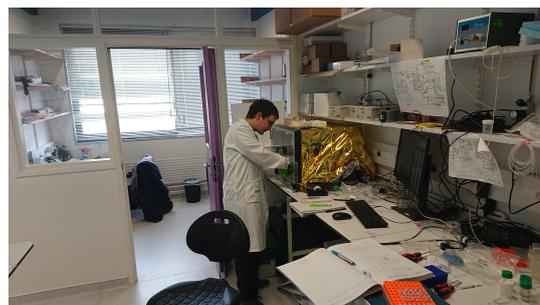


FIGURE A.5: **Spoutnik et un post-doctorant.**

Annexe B

Plateforme microfluidique à taille réduite

Dans le Chapitre 2, on a insisté assez lourdement sur la longueur des temps de diffusion dans notre système de pièges capillaires : pour des macro-molécules biologiques classiques, la diffusion dans une goutte de $400\ \mu\text{m}$ de diamètre prend plusieurs dizaines de minutes, ce qui a par exemple limité notre capacité à extraire les anticorps non-complexés de notre immuno-essai sur puce. Dans cette petite partie, on décrit un projet annexe visant à créer un design microfluidique plus petit pour piéger des doubles gouttes de rayon dix fois inférieurs à celles de la puce de Sart et al. [15]. Ce projet, en particulier la gestion des techniques de microfraisage, a été mené avec l'aide de Caroline Frot au LadHyX, Ecole Polytechnique.

B.1 Fabrication de la puce

Nous voulons fabriquer, guider, et piéger des gouttes de diamètre inférieur à $100\ \mu\text{m}$. Atteindre de telles dimensions est expérimentalement compliqué avec les techniques de microfabrication sur microfilms de résine utilisés au Laboratoire Ladhyx. Les effets de diffraction sur les contours des masques utilisés font diffuser la réticulation des résines, rendant les contours géométriques moins nets sur le moule final.

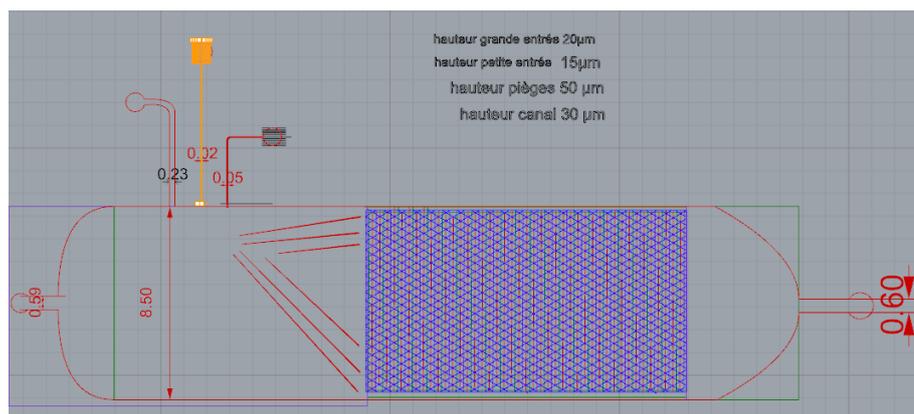


FIGURE B.1: Design de la puce.

On utilise donc des techniques de microfraisage, qui prennent plus de temps – de deux à quatre heures pour un seul moule – et on propose le design de la Figure B.1. On y trouve une entrée large de $230\ \mu\text{m}$ pour la phase continue, et deux entrées plus petites pour la phase à disperser, de largeurs respectives de $50\ \mu\text{m}$ et $20\ \mu\text{m}$. Ces deux entrées ont une section carrée. Dans la chambre principale, de hauteur $30\ \mu\text{m}$, on trouve des rails profonds de $20\ \mu\text{m}$, qui mènent aux pièges capillaires. Ces pièges, au nombre

de 1.100, sont profonds de 50 μm , et disposent d'une encoche secondaire de 20 μm . Une sortie, large de 600 μm , permet l'évacuation des fluides. Notons que l'entrée à l'extrême gauche de la puce a été retirée des versions ultérieures, et remplacée par une entrée dite "de déviation" sur le flanc de la puce.

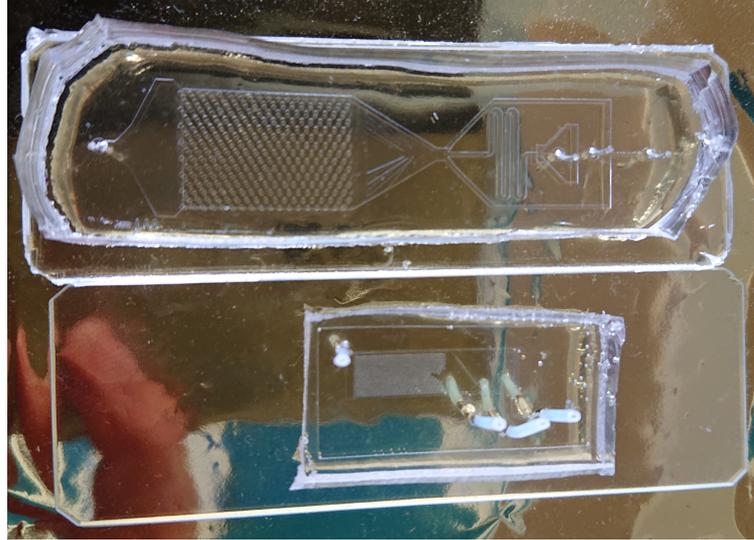


FIGURE B.2: **Miniaturisation.** Photographie des deux designs de puces microfluidiques à pièges doubles : en haut le design de [15], en bas un prototype de la puce miniaturisée.

On montre sur la Figure B.2 un prototype de cette nouvelle géométrie microfluidique. Sa taille réduite sur la lame de verre est un choix stratégique : il serait tout à fait possible d'augmenter la taille de la chambre pour rajouter des pièges, mais le temps de micro-fraisage augmenterait en conséquence.

B.2 Formation de nos gouttes

Commençons par fabriquer des gouttes d'eau dans l'huile fluorée à l'aide de ce dispositif microfluidique. On décrit ici un procédé classique de génération de gouttes, appelé "Step Emulsification" ou émulsification par variation de confinement. Ce procédé descend de la technique de *membrane emulsification*, qui date de bien avant la microfluidique, et qui permettait, en faisant passer une phase liquide dans une autre via des micropores [251], de préparer des émulsions de gouttes très petites et extrêmement stables comparées à ce qui se faisait conventionnellement avec des agitateurs turbulents. Sur la Figure B.3, on illustre les différentes étapes de cette émulsification à l'intérieur de la puce présentée. Le détachement de la goutte a fait l'objet de plusieurs études expérimentales et théoriques [95, 108]. Pour l'étudier, on fait appel à la notion de tension de surface, et de sa corollaire pression de Laplace, vues au Chapitre 1.

Lorsque le fluide rencontre une marche descendante, il occupe l'espace disponible pour minimiser sa tension de surface. Dans l'état quasi-statique de la Figure B.3B, la pression dans la zone bombée – la future goutte – est une combinaison de la pression hydrostatique p_0 et de la pression de Laplace engendrée par les deux courbures de l'interface eau-huile :

$$p_{goutte} = p_0 + \overbrace{\frac{\gamma}{H/2}}^{\text{courbure en } zx} + \overbrace{\frac{\gamma\pi}{4R}}^{\text{courbure en } xy}, \quad (\text{B.1})$$

où H est la hauteur de la chambre principale, et R le rayon de la goutte dans le plan xy visualisé sur les photographies de la Figure B.3. On considère ici que la goutte est assimilable à un pancake régulier qui occupe l'espace disponible en z . Avec la poussée du fluide dans la chambre, R augmente, et la pression dans la goutte diminue. En comparaison, la pression dans l'eau qui se trouve encore dans le micro canal s'écrit :

$$p_{canal} \approx p_0 + \frac{\gamma}{r} \quad (\text{B.2})$$

Cette quantité est bornée : du fait de son confinement par les parois du canal, le rayon de courbure r ne peut pas excéder la hauteur du canal notée h , de sorte que la pression dans l'eau du canal ne pourra pas descendre au-dessous de :

$$p_{min} \approx p_0 + \overbrace{\frac{\gamma}{h/2}}^{\text{courbure minimale en } zy} \quad (\text{B.3})$$

Passé un certain point, la pression dans l'huile du micro-canal devient donc nécessairement plus haute que celle de la chambre, déséquilibre impossible à tenir en état quasi-statique, qui provoque un flux d'eau du canal vers la goutte (Figure B.3B). En conséquence, le jet d'eau qui relie la goutte à sa phase continue s'affine. L'instabilité de Rayleigh-Plateau vient alors rompre ce lien et permet le départ de la goutte. Cette instabilité, quoique s'exprimant "rapidement" (comprendre à des vitesses grandes comparées à celle du débit d'entrée des fluides), produit des gouttes monodisperses, car le même mode propre de rupture sera sélectionné pour une géométrie et un débit donnés [252].

Terminons en notant que la taille des gouttes produites en step emulsification est contrôlable par le jeu des débits : un débit plus fort à l'entrée d'eau donne des gouttes plus grosses [253]. Sur la Figure B.4, on parvient par exemple à tripler la taille typique de la goutte en augmentant le débit de phase à disperser.

Sur la Figure B.4, on décrit ainsi des micro-émulsions d'eau dans l'huile stabilisées par des surfactants. Dans ce design de puce, on a généré en moins d'une minute plusieurs centaines de gouttes d'eau de taille micrométrique dans une phase huile contenant le surfactant fluoré décrit plus haut. La mécanique de génération de la goutte sera détaillée dans la partie suivante. Dans un régime de débits où la génération de goutte se produit vite par rapport à leur évacuation, les gouttes s'accumulent dans la chambre microfluidique (Figure B.4A et B).

Comme on peut le voir dans la photographie donnée en exemple, cette émulsion est stable malgré la proximité prolongée des gouttes entre elles : les gouttes se touchent sans pour autant changer de taille ou coalescer. L'analyse d'image permet de remonter à la taille de chaque goutte. On représente Figure B.4C et D la distribution des diamètres de gouttes produites. Pour le cas des très petites gouttes, on constate que cette distribution de diamètres est très piquée autour d'une valeur moyenne de 30 microns, avec une déviation typique de moins de 3 microns (C.V = 7.5%). Cette faible dispersion se retrouve beaucoup en microfluidique de goutte, où les C.V de tailles mesurés sont souvent inférieurs à 5% [95].

B.3 Manipuler des gouttes

Pour imposer un sens global de déplacement, on peut appliquer des flux d'huile via un système de contrôle en débit ou en pression. C'est ce que l'on montre sur la Figure B.5 : en imposant un écoulement latéral d'huile en plus de l'écoulement principal de la gauche vers la droite, on parvient à dévier la trajectoire initiale de la goutte et à

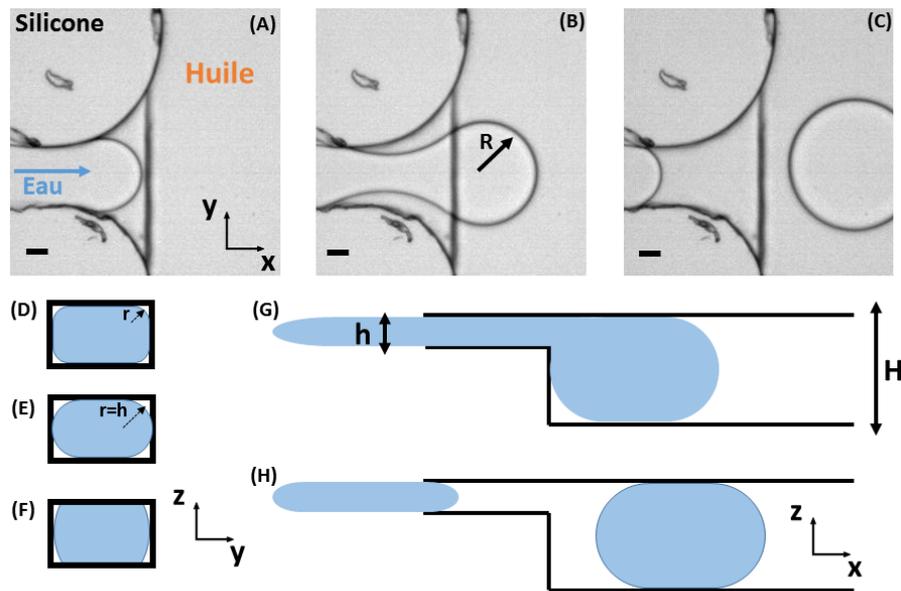


FIGURE B.3: **Step Emulsification.** (A-C) Vue de haut (en xy): le fluide à disperser avance dans un canal de faible section ($20 \times 10\ \mu\text{m}$). En entrant dans la chambre de hauteur $30\ \mu\text{m}$, le fluide abaisse son confinement dans toutes les directions de l'espace. Microphotographies prises à la caméra rapide (10.000fps). Les images sont séparées de 300 frames. La barre d'échelle représente $10\ \mu\text{m}$. (D-F) Vue en coupe du canal (en yz). La pression dans le canal est borné par la géométrie, le cas (F) qui présente un angle de contact supérieur à 180° n'est pas physique. (G) Vue de coupe (en zx). Le confinement de la goutte diminue lors de son entrée dans la chambre, la pression de Laplace à l'intérieur diminue. (H) L'instabilité capillaire a rompu le lien entre la phase continue et la goutte, qui est libérée dans le réservoir.

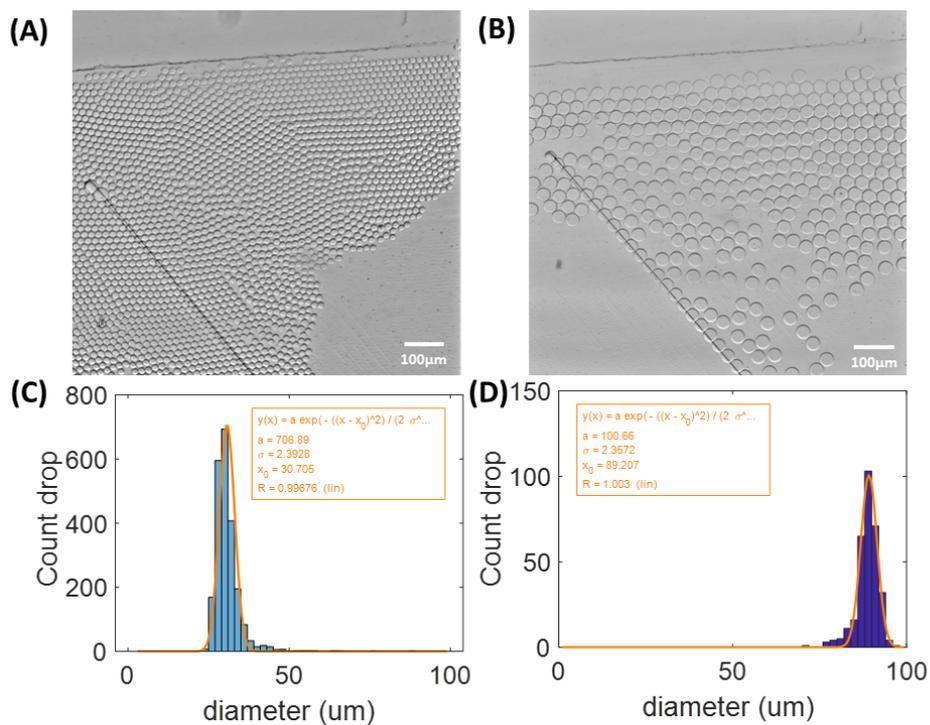


FIGURE B.4: **La monodispersité, deuxième garantie de stabilité pour les émulsions.** (A-B) Microphotographies en lumière blanche de gouttes produites par des débits différents. Embouteillage de gouttes micrométriques à l'entrée de la chambre de stockage. (C-D) Analyse de l'image par transformée de Hough (Matlab2017b), et distribution de tailles des gouttes détectées. Fit Gaussien non-centré, non-normé. Les CV valent respectivement $CV_{small} = 7.8\%$ et $CV_{big} = 2.6\%$.

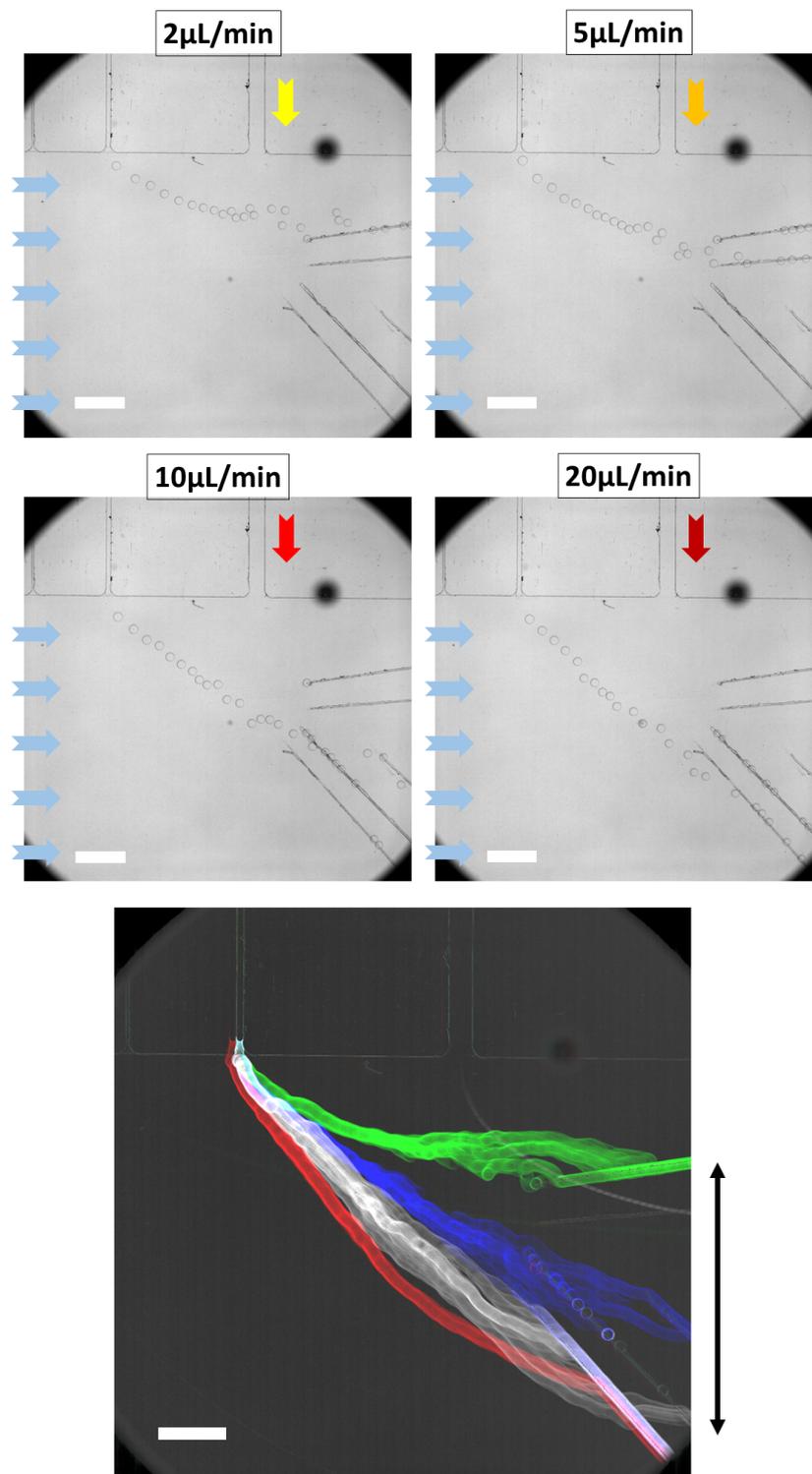


FIGURE B.5: **Guider des gouttes microfluidiques.** (A) Photographies de trajectoires de gouttes pour différentes valeurs de débit en entrée haute (représenté avec une flèche descendante). Les gouttes subissent un écoulement global de la droite vers la gauche (flèches bleues). (B) Chronophotographie de trajectoires à 2, 10, 20 et $40 \mu\text{l min}^{-1}$. Les barres d'échelle représentent $200 \mu\text{m}$.

choisit le rail sur lequel elle arrive. Pour plusieurs débits d'huile sur un même ordre de grandeur, on parvient ainsi à distribuer les gouttes générées en amont sur chacun des quatre rails de la puce. Dans le dispositif microfluidique présenté, on parvient ainsi à dévier la trajectoire des gouttes sur une distance de 10 fois leur rayon.

B.4 Immobiliser les gouttes

Dernière étape, la plus importante, immobiliser les gouttes formées dans des pièges capillaires de taille adaptée. Piéger les gouttes de diamètre $50\ \mu\text{m}$ pour remplir le piège principal ne pose pas de problème, on montre d'ailleurs Figure B.6 une efficacité de piégeage de 100% obtenue sur l'ensemble du tableau de gouttes de la puce. En revanche, il est moins évident d'assurer un piégeage systématique et sans erreur des gouttes de diamètre $30\ \mu\text{m}$ qui sont moins confinées par la hauteur de la chambre, et donc moins prônes à minimiser leur énergie de surface en entrant dans les pièges. Du reste, comme le montre la Figure B.7, les effets de gonflement du PDMS rend cette efficacité de piégeage variable dans la chambre microfluidique.

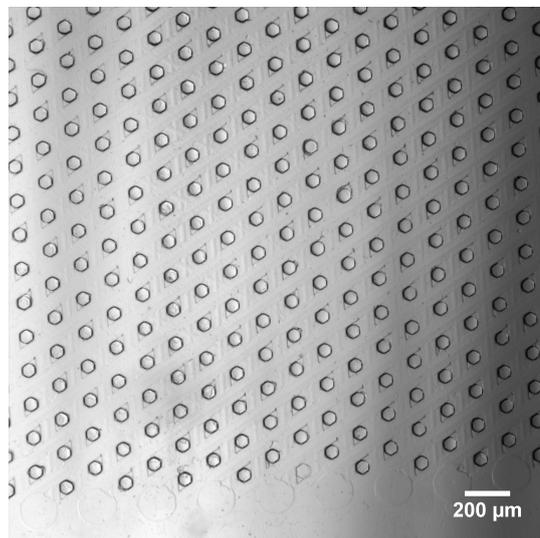


FIGURE B.6: **Piège 1.** Microphotographie d'une partie du tableau de goutte contenant des gouttes de diamètre $50\ \mu\text{m}$.

Notons pour finir que le développement et l'optimisation de cette plateforme microfluidique miniaturisée est toujours en cours au laboratoire, en vue d'augmenter l'efficacité de piégeage et l'homogénéité globale du remplissage de la puce. Des simulations en éléments finis devront peut-être être menées pour guider les modifications à apporter à ce projet.

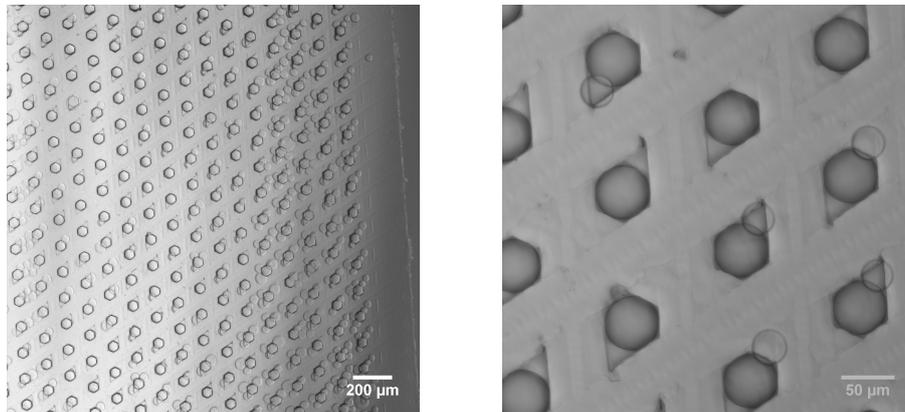


FIGURE B.7: **Piège 2.** Microphotographie du tableau de goutte pendant le piégeage de la deuxième goutte, de diamètre 30 μm . Les effets de gonflement de la chambre rendent le remplissage inhomogène, et diminuent l'efficacité de piégeage.

Annexe C

Quelques codes utiles

C.1 Code Matlab pour la détection de billes barcodées

Le premier code présenté permet d'isoler des billes fluorescentes dans une image, et d'en tirer des informations de géométrie et d'intensité lumineuse dans différents canaux de fluorescence. Une interface à boutons permet à l'utilisateur de centrer son analyse sur les images qui contiennent effectivement des billes.

Le code commence par ouvrir les images, les afficher, demander à l'utilisateur s'il souhaite poursuivre ou passer au piège suivant. Auquel cas, les images sont soumises à un filtre passe-bande, dont on peut régler les paramètres, qui est disponible sur Mathworks. A ce stade, l'utilisateur peut mesurer un background "local", en dessinant, à même la figure, un rectangle sur lequel une valeur d'intensité moyenne sera calculée et stockée.

La suite du code repère et isole les différents objets fluorescents de la photographie, en donnant régulièrement des images intermédiaires à l'utilisateur, qu'il faut désactiver pour améliorer la rapidité du traitement d'images nombreuses. L'ensemble des observables mesurées sont stockées dans une structure appelée *bead*. On décrit de façon succincte chacune de ces observables dans le corps du code.

```

1  %*****
2  %*****ASS-MARS2018-*****
3  %*****
4  clc , clf
5  close all
6  clear all
7
8  folderName=('d:\Users\Adrien\Desktop\ASS_PhD\Datass\
           DoubleTraps-TrousseauPasteur\Merlin\20181011_VEGFresults
           \20190911_calibration8\P6\ ');
9  dir(folderName);
10 numIm=175; % enter number of images to be treated
11
12 %% Part I: detect bright beads by filtering and thresholding.
13 sigma=3;
14 neighborMax=15; % maximal num. of objects that can be
           detected without displaying an error.
15 taillemax=3000; taillemin=5; % choose a size range to
           eliminate dusts and border detections. See the FilterSize
           function.
16 lambda=2; % characteristic lengthscale of noise in pixels.
           Additive noise averaged over this length should vanish.
           May assume any positive floating value.

```

```

17 w=5; %A length in pixels somewhat larger than *half* a
    typical object. Must be an odd valued integer. Make it a
    3-vector if aspect ratio is not 1:1:1
18 THRESH=0.1; % Minimal threshold value, below which finding
    object is unrealistic.

19
20 %% INITIALISATIONS
21 bead.numWell=1:numIm;
22 bead.neighbors=zeros(1,numIm);
23 bead.area=zeros(neighborMax,numIm);
24 bead.perim=zeros(neighborMax,numIm);
25 bead.majAx=zeros(neighborMax,numIm);
26 bead.minAx=zeros(neighborMax,numIm);
27 bead.MeanIntens=zeros(neighborMax,numIm);
28 bead.MeanIntens=zeros(neighborMax,numIm);
29 bead.MaxIntens=zeros(neighborMax,numIm);
30 bead.meanBckgd=zeros(neighborMax,numIm);
31 bead.meanBckgdGross=zeros(neighborMax,numIm);
32 bead.meanperTrap= zeros(1,numIm);
33 bead.stdperTrap= zeros(1,numIm);
34 bead.meanperTrapSans= zeros(1,numIm);
35 bead.meanperTrapSansGross= zeros(1,numIm);
36 bead.sumpx=zeros(neighborMax,numIm);
37 bead.meanSumpx=zeros(1,numIm);
38 bead.stdSumpx=zeros(1,numIm);
39 bead.MeanIntensCY5=zeros(neighborMax,numIm);
40 bead.MaxIntensCY5=zeros(neighborMax,numIm);
41 bead.sumpxCY5=zeros(neighborMax,numIm);
42
43 for k=1:numIm % loop on images/traps
44     k % display trap number
45     %% Loading images (Fluo and BF)
46     tifFileName = strcat('beadxy',num2str(k,'%03d'),'c2','.'
        'tif');
47     fullFileName=fullfile(folderName,tifFileName);
48     imageData = double(imread(char(fullFileName)));
49     %imageData2 =ImStretchNorm(double(imread(char(
        fullFileName))));
50
51     meanBckgdGross=mean(mean(imageData)); % gross measurement
        of the overall fluorescent intensity. Stored.
52
53     tifFileNameCY5 = strcat('beadxy',num2str(k,'%03d'),'c3','.'
        'tif');
54     fullFileNameCY5=fullfile(folderName,tifFileNameCY5);
55     imageDataCY5 = double(imread(char(fullFileNameCY5)));
56
57     tifFileNameBF = strcat('beadxy',num2str(k,'%03d'),'c5','.'
        'tif');
58     fullFileNameBF=fullfile(folderName,tifFileNameBF);
59     imageDataBF = double(imread(char(fullFileNameBF)));

```

```

60
61 %% Band passing of the fluorescent image, then gaussian
    filter
62 figure(2), title('bandPass filtering')
63 movegui(figure(2), 'west');
64 subplot(1,3,1), imagesc(imageDataCY5), title('CY5')
65 subplot(1,3,2), imagesc(imageData), title('TRITC')
66 % pause
67 imageData2CY5=bpas_1(ImStretchNorm(imageDataCY5), lambda,
    w);
68 imageData2=bpas_1(ImStretchNorm(imageData), lambda, w); %
    careful of the target of this filtering.
69 % imageData2=abs(imageData2-imgaussfilt(
    imageData2, sigma)); % step recommended for noisy
    images or faint objects.
70 figure(3), imagesc(imageData)
71 [meanBckgd, dev_bckgd] = cropBckgd(figure(3),
    imageData, 0);
72 figure(2), subplot(1,3,3), imagesc(imageData2CY5), title('
    CY5bandPassed')
73
74 %% Make a mask out of the filter product image
75 level=multithresh(imageData2CY5, 3)
76 idx_thresh=find(level(:)> THRESH, 1); % safety
    measure not to consider a too low thresholding
77
78 figure(4)
79 movegui(figure(4), 'east');
80 % subplot(1,3,1), imagesc(imageData2)
81 subplot(1,3,1), imagesc(imageDataBF)
82 if isempty(idx_thresh)==0
83     mask=imbinarize(imageData2CY5, level(
        idx_thresh));
84
85     % figure(986), imshow(mask)
86     % subplot(1,3,2), imagesc(mask)
87
88     % mask purification from unfitted objects.
89     cc = bwconncomp(logical(mask));
90     cc_PREstats=regionprops(cc, {'Area', 'Perimeter',
        'PixelList', 'MajorAxisLength', '
        MinorAxisLength'});
91     L = labelmatrix(cc);
92     subplot(1,3,2), imagesc(label2rgb(L));
93     %% Roundness-based filter
94 filterObjects=DoublefilterSize_4sphero(cc, ratiomax, ratiomin)
    ;
95     %% Size(area)-based filter
96 filterObjects=DoublefilterSize(cc, taillemax,
    taillemin);

```

```

97     filteredMask=mask;
98     filteredMask (:, :)=0 ;
99
100    %% from the list of purified objects , we
        create a new mask.
101    for j=1:filterObjects.NumObjects
102        filteredMask(filterObjects.PixelIdxList{j}
        )=1;
103    end
104    Lprim = labelmatrix(filterObjects);
105    % figure (68),imshow(label2rgb(Lprim));
106    subplot(1,3,3),imagesc(filteredMask)
107    % figure (69),imshowpair(imageData,
        filteredMask, 'montage');
108    finalCC=bwconncomp(filteredMask);
109    bead_stats =regionprops(finalCC,imageData,{ '
        Area', 'Perimeter', 'PixelList', '
        MajorAxisLength', 'MinorAxisLength', '
        MeanIntensity', 'MaxIntensity', 'PixelValues
        '});
110    bead_statsCY5=regionprops(finalCC,
        imageDataCY5,{ 'PixelList', 'MeanIntensity',
        'MaxIntensity', 'PixelValues' });
111
112    if finalCC.NumObjects>0 && finalCC.NumObjects
        <neighborMax
113        %saving the interesting measured values.
114        bead.numWell(k)=k;
115        bead.neighbors(k)=finalCC.NumObjects;
116        for jj =1:bead.neighbors(k)
117            %geometry measurements
118            bead.area(jj,k)=bead_stats(jj).Area;
119            bead.perim(jj,k)=bead_stats(jj).
                Perimeter;
120            bead.majAx(jj,k)=bead_stats(jj).
                MajorAxisLength;
121            bead.minAx(jj,k)=bead_stats(jj).
                MinorAxisLength;
122            % TRITC fluorescence
123            bead.MeanIntens(jj,k)=bead_stats(jj).
                MeanIntensity;
124            bead.MaxIntens(jj,k)=bead_stats(jj).
                MaxIntensity;
125            bead.sumpx(jj,k)=sum(bead_stats(jj).
                PixelValues);
126            % Backgrounds
127            bead.meanBckgdGross(jj,k)=
                meanBckgdGross;
128            bead.meanBckgd(jj,k)=meanBckgd;
129            bead.devBckgd(jj,k)=dev_bckgd;
130            % CY5 fluorescence

```

```

131         bead.MeanIntensCY5(jj,k)=
            bead_statsCY5(jj).MeanIntensity;
132         bead.MaxIntensCY5(jj,k)=bead_statsCY5
            (jj).MaxIntensity;
133         bead.sumpxCY5(jj,k)=sum(bead_statsCY5
            (jj).PixelValues);
134         bead.pxApX(jj,k)=sum(bead_stats(jj).
            PixelValues./bead_statsCY5(jj).
            PixelValues);
135     end
136     bead.meanperTrap(k)=mean(nonzeros(bead.
            MeanIntens(:,k)));
137     bead.stdperTrap(k)=std(nonzeros(bead.
            MeanIntens(:,k)));
138     bead.meanperTrapSans(k)=mean(nonzeros(
            bead.MeanIntens(:,k)))-meanBckgd;
139     bead.meanperTrapSansGross(k)=mean(
            nonzeros(bead.MeanIntens(:,k)))-
            meanBckgdGross;
140     bead.meanSumpX(k)=mean(nonzeros(bead.
            sumpX(:,k)));
141     bead.stdSumpX(k)=std(nonzeros(bead.sumpX
            (:,k)));
142     elseif finalCC.NumObjects==0
143         display('Sorry, no bead detected so far')
144     elseif finalCC.NumObjects>neighborMax
145         display('too many beads detected, have a
            look at your threshold')
146     end
147
148     end
149 end
150 close all

```

C.2 Code pour lire la fluorescence d'une goutte entière

La fonction suivante a été massivement utilisée dans le Chapitre 2 pour mesurer la coloration de nos gouttes lors de tests ELISA sur puce pour la mesure de l'IL-1 β .

Après ouverture des images, on applique la fonction *imfindcircle* à deux reprises, pour déterminer la position et la taille de la goutte dans sans piège. Cette détection permet de créer un masque logique qui ne conserve que les pixels de la goutte. Les valeurs de ces pixels sont alors mesurées, moyennées et sauvegardées sous forme de vecteur.

```

1 %For time lapses on single traps, detect fluorescence of the
    entire droplet.
2 clc, clf
3 close all
4 folderName=('D:\Users\Adrien\Desktop\ASS_PhD\Datass\
    DoubleTraps-TrousseauPasteur\Merlin\20180109_kinetics_QR
    \20170118_khi3\');

```

```

5  dir(folderName);
6
7  % experimental parameters.
8  numIm=10; loops=206; %khi3
9  duree=max(Classeur1.Times); % to be removed if time vector
    well defined.
10
11 % image treatment parameters.
12 taillemax=100000; taillemin=20000;
13
14 %Initialisations
15 trapTouf=zeros(loops,numIm);
16 times=zeros(loops,numIm);
17 X=[];Y=[];Z=[];
18 coord=struct(X,Y,Z);
19
20 for k=1:numIm % loop on the trap number
21     k % display trap number.
22     % get trap coordinates
23     coord.X(k)=Classeur1.XCoordm(k);
24     coord.Y(k)=Classeur1.YCoordm(k);
25     coord.Z(k)=Classeur1.TiZDrivem(k)
26     for t=1:loops % loop on time step.
27         times(t,k)=Classeur1.Times(k+(t-1)*numIm);
28         tifFileName = strcat('fusionxy',num2str(k,'%02d'),'
            c2t',num2str(t,'%03d'),' .tif ');
29         fullFileName=fullfile(folderName,tifFileName);
30
31         tifFileNameBF = strcat('fusionxy',num2str(k,'%02d'),'
            c1t',num2str(t,'%03d'),' .tif ');
32         fullFileNameBF=fullfile(folderName,tifFileNameBF);
33
34         imageData = imread(char(fullFileName));
35         imageDataBF = imread(char(fullFileNameBF));
36
37         % Find the main droplet.
38         figure(3),imagesc(imageDataBF)
39         %           d = imdistline; delete(d); % activate
            this tool to measure radius on you picture.
40         [centers_big,radii_big] = imfindcircles(imageDataBF
            ,[110 150], 'ObjectPolarity','bright','Sensitivity'
            ,0.97,'EdgeThreshold',0.05)
41         if isempty(radii_big)==0
42             seetheRing = viscircles(centers_big(1,:),radii_big(1)
                );
43             [columnsInImage rowsInImage] = meshgrid(1:512, 1:512)
                ;
44
45         % create binary mask based on the found circle

```

```

46     mask_neat = (rowsInImage - centers_big(1,2)).^2 + (
           columnsInImage - centers_big(1,1)).^2 <= radii_big
           (1).^2;
47 %     imagesc(mask_neat)
48     cc = bwconncomp(mask_neat);
49     stats =regionprops(mask_neat, imageData, {'Area', '
           BoundingBox', 'Centroid', 'PixelValues'});
50
51     if cc.NumObjects>=1 %stockage de la fluorescence
52         trapTouf(t,k)=mean(stats.PixelValues);
53     end
54     else
55         display('Did not find the drop, so sorry Master')
56     end
57     if t==1 % For the first image, you might want to
           measure the size of a secondary droplet, before it
           is fused. Remove if useless.
58         figure(3), imagesc(imageDataBF)
59         %         d = imdistline; delete(d);
60         [centers_small, radii_small] = imfindcircles(
           imageDataBF, [60 90], 'ObjectPolarity', 'bright',
           'Sensitivity', 0.93, 'EdgeThreshold', 0.05) %
           0.92, 'EdgeThreshold', 0.05)
61         seetheRing = viscircles(centers_small(1,:),
           radii_small(1));
62         [columnsInImage rowsInImage] = meshgrid(1:512,
           1:512);
63         pause(1)
64         mask_neat = (rowsInImage - centers_small(1,2)).^2
           + (columnsInImage - centers_small(1,1)).^2 <=
           radii_small(1).^2;
65         imagesc(mask_neat)
66         cc = bwconncomp(mask_neat);
67         stats_small =regionprops(mask_neat, imageData, {'
           Area', 'BoundingBox', 'Centroid', 'PixelValues'
           });
68         if cc.NumObjects>=1
69             smallDrop_Radius_px(t,k)=radii_small(1);
70             smallDrop_Area_px2(t,k)=stats_small.Area;
71             smallDrop_fluorescence(t,k)=mean(stats_small.
           PixelValues);
72         end
73
74     end
75 end
76 end
77
78 %% Plotting quickly fluorescence, and obtaining data from
           these measurements.
79 % edges=linspace(0,60000,101);
80 % CM = jet(numIm);

```

```

81 % correlation position // fluorescence intensity
82 figure(20)
83 for k=1:numIm
84 subplot(1,3,1),plot(coord.X(k),trapTouf(floor(t/2),k),'o',
      'color',CM(k,:)),xlabel('X(um)') ,hold on
85 subplot(1,3,2),plot(coord.Y(k),trapTouf(floor(t/2),k),'o'
      , 'color',CM(k,:)),xlabel('Y(um)') ,hold on subplot
      (1,3,3),plot(coord.Z(k),trapTouf(floor(t/2),k),'x', '
      color',CM(k,:)),xlabel('Z(um)') ,hold on
86 end
87 % obtaining initial slopes :
88
89 figure(1),clf; % raw fluorescence.
90 hold on
91 nbTraps = size(trapTouf,2);
92 cm = colormap(jet(nbTraps));
93 for iTrap = 1:nbTraps
94     plot(times(:,iTrap)/10000, trapTouf(:,iTrap), 'o', 'Color
95         ', cm(iTrap,:))
96     drawnow
97     pause;
98 end
99 xlabel('Time (s)')
100 ylabel('Fluo (a.u)')
101 set(gca, 'FontSize',22, 'Fontweight', 'bold')
102 % set(gca, 'XScale', 'log')
103 % set(gca, 'YScale', 'log')
104 box on
105
106 % load('d:\Users\Adrien\Desktop\ASS_PhD\Datass\DoubleTraps-
      TrousseauPasteur\Merlin\20180109_kinetics_QR\re-exploit\
      khi4.mat')
107
108 % figure(2); % plot of derivative
109 % hold on
110 % for iTrap = 1:nbTraps
111 %     plot(diff(times(:,iTrap)), 'o-', 'Color', cm(iTrap,:))
112 % end
113 % print('Figure2_Diffcourbes','-djpeg')
114 % savefig('Figure2_Diffcourbes')
115 % Calculate slope according to 2 different methods
116 maxNbPoints = 50;
117 iniPoint = 2;
118
119 figure(3), title('Direct slope'), xlabel('Time'), ylabel('
      slope')
120 hold on
121 figure(4), title('Average slope'), ylabel('slope'), xlabel('
      Time')
122 hold on

```

```

123 figure(5), title('slopes'), ylabel('average slope'), xlabel(
    'direct slope')
124 hold on
125 directSlope = zeros(maxNbPoints+1, nbTraps);
126 avgSlope = zeros(maxNbPoints+1, nbTraps);
127
128 %% using a threshold on the variation values to detect the
    initial moment after fusion.
129 seuil_decollage=7*mean(abs(diff(trapTouf(1:4,:),1)),1);
130 [r,c]=find(diff(trapTouf,1)>seuil_decollage);
131 interesting_slope=diff(trapTouf(r,c));
132
133 try
134     for iTrap = 1:nbTraps
135         directSlope(:,iTrap) = (trapTouf(iniPoint:iniPoint+
            maxNbPoints,iTrap) - trapTouf(iniPoint-1, iTrap))
            ./ (times(iniPoint:iniPoint+maxNbPoints, iTrap)-
            times(iniPoint-1, iTrap));
136         figure(3)
137         plot(times(iniPoint:iniPoint+maxNbPoints,iTrap),
            directSlope(:,iTrap), 'o-', 'Color', cm(iTrap,:))
138         % print('Figure3_directSlope','-djpeg')
139         % savefig('Figure3_directSlope')
140     end
141 end
142
143 for iTrap = 1:nbTraps
144     for iSlope = 1:maxNbPoints
145         curve = fit(times(iniPoint:iniPoint+iSlope,iTrap),
            trapTouf(iniPoint:iniPoint+iSlope,iTrap), 'poly1')
            ;
146         polyCoeffs=coeffvalues(curve);
147         avgSlope(iSlope, iTrap) = polyCoeffs(1);
148     end
149     figure(4)
150     plot(times(iniPoint:iniPoint+maxNbPoints,iTrap), avgSlope
        (:,iTrap), 'o-', 'Color', cm(iTrap,:))
151     % print('Figure4_averagedSlope','-djpeg')
152     % savefig('Figure4_averagedSlope')
153     figure(5)
154     plot(directSlope(:,iTrap), avgSlope(:,iTrap), 'o-', '
        Color', cm(iTrap,:))
155     % print('Figure5_compareSlopes','-djpeg')
156     % savefig('Figure5_compareSlopes')
157 end

```

C.3 Code Matlab pour la lecture des caractéristiques d'un sphéroïde

La fonction présentée ici a été massivement utilisée pour discuter de nos populations de sphéroïdes dans les chapitres 3 et 4. Elle prend en entrée des images de microscopie de fluorescence de sphéroïdes, et mesure des intensités de fluorescence et des paramètres morphologiques. Une petite subtilité réside dans les variables notées "Elite" : elles ont vocation à mesurer uniquement les pixels associés aux cellules les X% plus brillantes dans le plan médian du sphéroïde, X valant de 10 à 90 selon le niveau d'exigence.

```

1 folderName=('d:\Users\Adrien\Desktop\ASS_PhD\Datass\
  DoubleTraps-TrousseauPasteur\Merlin\20181011_VEGResults
  \20181207_campaign_highSens\puce_III\ICC\Single_traps\CY5\
  ');
2 folderNameDAPI=('d:\Users\Adrien\Desktop\ASS_PhD\Datass\
  DoubleTraps-TrousseauPasteur\Merlin\20181011_VEGResults
  \20181207_campaign_highSens\puce_III\ICC\Single_traps\DAPI
  \');
3 dir(folderName);
4
5 numIm=252; % number of images
6 neighborMax=1; % no more than a spheroid per trap otherwise
  Error.
7 edges=linspace(1,30000,200);
8 dim = [.15 .6 .3 .3];
9 taillemax=75000;
10 taillemin=5000;
11 criterElite=0.7; % then your are interested in the (1-
  criterElite)x100% brightest pixels of the spheroid.
12
13 sphero.allAreas=zeros(neighborMax,numIm);
14 sphero.allMeans=zeros(neighborMax,numIm);
15 sphero.allSTD=zeros(neighborMax,numIm);
16 sphero.allElite=zeros(9,numIm);
17
18 for k=166:numIm
19     k
20     tifFileName = strcat('trap_xy',num2str(k,'%03d'),'_CY3','
      .tif');
21     fullFileName=fullfile(folderName,tifFileName);
22     imageData = double(imread(char(fullFileName)));
23
24     tifFileNameDAPI = strcat('trap_xy',num2str(k,'%03d'),'
      _DAPI','.tif');
25     fullFileNameDAPI=fullfile(folderNameDAPI,tifFileNameDAPI)
      ;
26     imageDataDAPI = double(imread(char(fullFileNameDAPI)));
27
28     figure(1),imagesc(imageData),title('CY5')
29     movegui(figure(1),'south'),

```

```

30     answer = questdlg('Is there a nice spheroid in figure ?',
31         ...
32         'Bead in trap eye-checking', ...
33         'Definitely', 'No', 'OUT', 'OUT');
34
35 %% Handle response
36 switch answer
37     case 'Definitely'
38         disp([answer ' , Then let s find it in DAPI mode'
39             ])
40         dessert(k)=1;
41         thresh=multithresh(imageDataDAPI,2)/65000;
42         realThresh=thresh*65000;
43         mask=im2bw(double(imageDataDAPI)/65000,thresh(1))
44         ;
45         mask=imfill(mask , 'holes ');
46         % figure(2),imagesc(imageDataDAPI),title('DAPI')
47         % movegui(figure(1),'north'),
48         cc = bwconncomp(mask);
49
50         pre_stat=regionprops(cc , 'Area ');
51         filterObjects=DoublefilterSize(cc , taillemax ,
52             taillemin);
53         filteredMask=mask;
54         filteredMask (: , :) = 0 ;
55
56         for j=1:filterObjects.NumObjects
57             filteredMask(filterObjects.PixelIdxList{j})
58                 =1;
59         end
60         cc_filt = bwconncomp(filteredMask);
61         %and there back to CY5 image
62         stats =regionprops(cc_filt ,imageData ,{'Area' , '
63             Perimeter' , 'PixelList' , 'MeanIntensity' , '
64             MaxIntensity' , 'PixelValues' });
65
66         figure(69) ,
67         imshowpair(imageData ,filteredMask , 'montage ');
68         set(gcf , 'Position' , [100 , 100 , 500 , 400])
69         movegui(figure(69) , 'east ')
70         % pause
71         figure(43) ,
72         h=histogram(imageData(cc_filt.PixelIdxList{1,1}) ,
73             'normalization' , 'cdf ');
74         movegui(figure(43) , 'west ')
75             for criterElite = 0.1:0.1:0.9
76                 criterElite
77             idx_elite=find(h.Values>criterElite);
78             thresh_elite=h.BinEdges(idx_elite(1))
79             mask_elite=imageData>thresh_elite;
80             brightCells=mask_elite.*filteredMask.*imageData;

```

```

73     sphero.allElite(floor(10*criterElite), k)= nnz(
        brightCells) ; % area of the brightest pixels
        of the spheroid.
74         end
75
76     sphero.allAreas(k)= nnz(filteredMask) ; % total
        spheroid projected area
77     sphero.allMeans(k)= mean(nonzeros(imageData.*
        filteredMask)) ;
78     sphero.allSTD(k)= std(nonzeros(imageData.*
        filteredMask)) ;
79
80     case 'No'
81         disp([answer ', then next trap engaged'])
82         dessert(k) = 0;
83     case 'OUT'
84         disp([answer ', exiting of loops now'])
85         dessert(k) = 0;
86     %         close all % remettre
87         return
88     end
89     %     pause ;
90 end

1 function cclarge = DoublefilterSize(cc, taillemax, taillemin)
2 rp=regionprops(cc, 'Area', 'Perimeter');
3 a = [rp.Area];
4 idx=find(a<taillemin | a>taillemax);
5 %Here we take out all the objects that are outside our size
   gate.
6 cclarge=cc;
7 cclarge.PixelIdxList(idx)=[];
8 cclarge.NumObjects=cc.NumObjects-length(idx);

```

Annexe D

Phénomènes d'agrégation cellulaire

D.1 Introduction

Dans le Chapitre 3, la variabilité de taille observée dans des populations de sphéroïdes au sein d'une même puce a été partiellement attribuée à des phénomènes d'agrégation en amont du chargement microfluidique. Dans cette partie, on s'intéresse à ces phénomènes d'agrégation, en particulier à leur temps caractéristique. Pour cela, on se propose de travailler sur les instants qui suivent le piégeage de la goutte contenant la suspension de cellules dans les pièges capillaires de la puce décrite au Chapitre 1. Ce projet a débuté aux côtés d'Antoine Barizien, doctorant microbiologiste de l'équipe P μ B jusqu'en Mai 2019.

D.2 Protocole

Une suspension de cellules tumorales H4-II-EC3 est introduite sous forme de gouttes dans des pièges capillaires de diamètre 400 μm . Les cellules sont suspendues dans du milieu de culture (DMEM, Gibco), additionné de 1% de surfactant Pluronic 127. On travaille à une concentration de 3.10^6 cellules par millilitre, on a donc typiquement 150 cellules par goutte. Les cellules sont marquées par un colorant fluorescent (Vybrant[®] Cell-Labeling Solutions, MolecularProbes, Eugene, Oregon, États-Unis). Une fois piégées, un écoulement d'huile fluorée FC40 est maintenu au sein de la puce pendant 30 min. Pendant ce temps, les puits sont imagés en microscopie de fluorescence, avec une cadence d'acquisition d'une image toutes les 2s. Les débits utilisés vont de 30 à 180 $\mu\text{L min}^{-1}$. Une expérience en conditions statiques, à 0 $\mu\text{L min}^{-1}$ est également réalisée. Les images obtenues sont binarisées par FiJi, puis analysées avec Matlab, pour mesurer le nombre d'agrégats cellulaires présents dans la goutte, ainsi que leurs caractéristiques géométriques - aire et périmètre.

D.3 Resultats

D.3.1 Condition Statique

Qualitativement, on peut observer, en observant la chrono-photographie en condition statique (voir les vidéo <https://figshare.com/s/90f572ee1c553618872c>) qu'en l'absence d'écoulement, les cellules sédimentent au fond du piège. Cette sédimentation s'effectue dans la minute qui suit l'arrêt des écoulements de phase continue.

Par l'analyse d'image sur les photographies de fluorescence, on parvient à identifier, à chaque pas de temps, des agrégats cellulaires distincts, indépendamment de la qualité de la mise au point en lumière blanche (Figure D.1).

Figure D.2, on représente en fonction du temps, pour un seul piège, le nombre d'agrégats cellulaires détectés, ainsi que l'aire du plus gros objet détecté – la grosseur

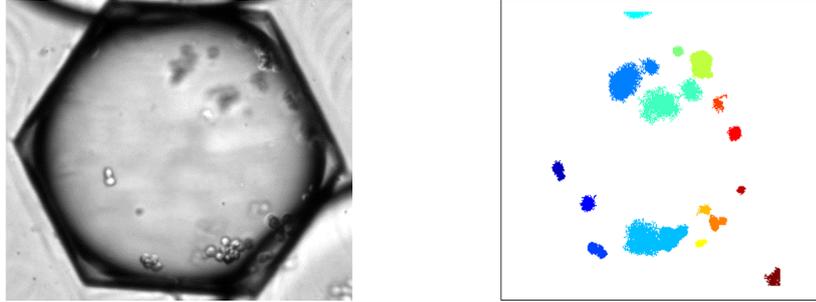


FIGURE D.1: **Analyse d'image et isolation dynamique des agrégats cellulaires.** (A) Microphotographie en lumière blanche 4 secondes après l'arrêt de l'écoulement. (B) Détection des agrégats à partir de l'image de fluorescence correspondante. Pour rappel, le piège mesure 400 μm de bord à bord.

étant définie comme l'aire projetée de l'objet. Sur la courbe (A), le nombre d'objets s'effondre en l'espace de 5 minutes, et l'on passe d'une douzaine d'objets détectés à un agrégat cellulaire unique. Sur la courbe (B), il apparaît deux comportements distincts : à temps courts, i.e inférieurs à 2.1 min, l'aire et le périmètre du plus gros objet détecté augmente linéairement avec le temps. L'aire du plus gros objet triple en l'espace de trois minutes, passant de 9.10^3 à $25.10^3 \mu\text{m}^2$. On atteint alors un régime moins rapide, dans lequel l'agrégat se contracte, perdant 18% de sa surface apparente. Ce comportement est répétable d'un piège à l'autre, et l'on peut représenter une moyenne des courbes précédentes obtenues sur plusieurs puits sans changer le message.

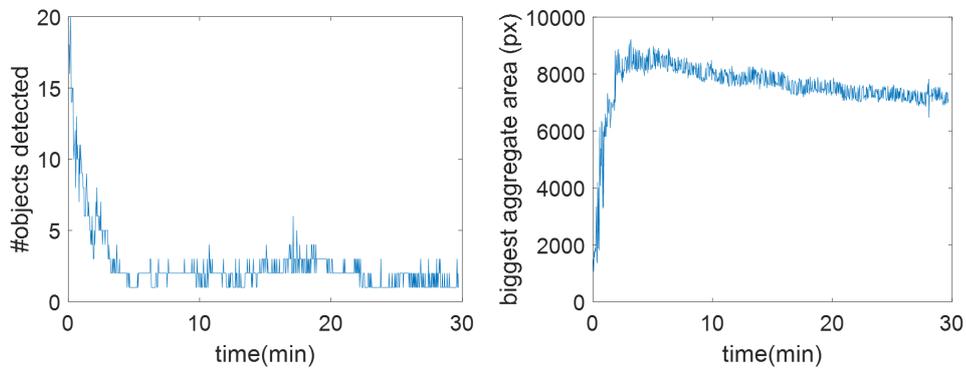


FIGURE D.2: **Agrégation efficace en conditions statiques.** (A) Evolution du nombre d'objets détectés dans une seule goutte, en fonction du temps. (B) Evolution de l'aire apparente du plus gros de ces objets détectés dans la goutte au cours du temps.

D.3.2 Cas dynamiques

Intéressons-nous aux cas dynamiques, dans lesquels un écoulement à débit constant est appliqué sur la goutte pendant toute la durée de l'acquisition. Qualitativement, on peut d'emblée observer une agrégation efficace, en quelques minutes ; mais cette agrégation se produit sous l'effet d'un mouvement continu imposé par la vitesse de l'huile qui entoure les gouttes. Les cellules se rencontrent au hasard de ce mouvement, et s'attachent les unes aux autres de façon apparemment irréversible. Selon le débit imposé, on repère 1 ou 2 "pôles d'attraction" dans lesquels les agrégats se forment et stationnent. On décrit cette agrégation dynamique dans la Figure D.3.

Comme toujours, des vidéos sont disponibles sur FigShare (<https://figshare.com/s/4244c7835b69f2e6bf85>)

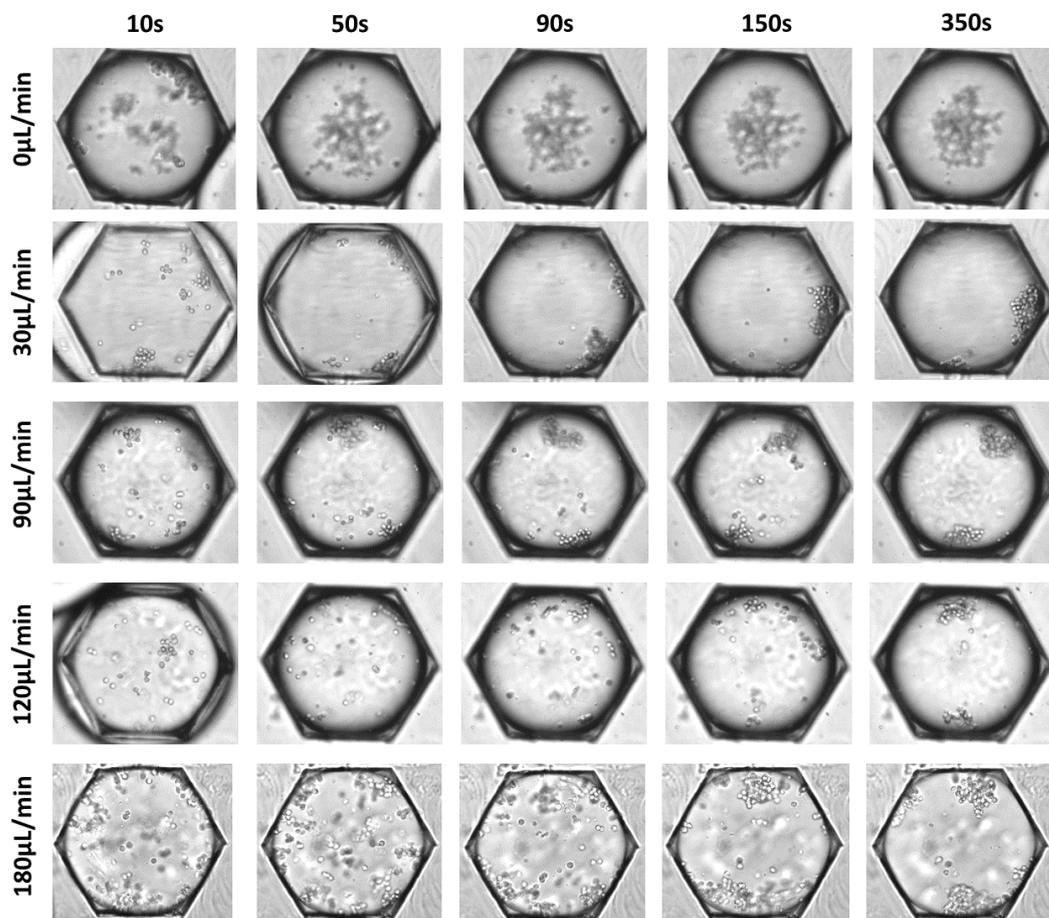


FIGURE D.3: **Expériences d'agrégation sous écoulement visqueux.** Microphotographies d'un puits au cours du temps, sous différentes vitesses d'écoulement.

Pour quantifier ces phénomènes d'agrégation dynamiques, on procède comme précédemment à une analyse d'image, et l'on représente l'évolution temporelle du nombre d'objets, ainsi que celle de l'aire et du périmètre du plus gros objet détecté. Pour illustration, on représente, Figure D.4A, l'évolution du nombre d'agrégats détectés dans les gouttes au cours des trente minutes de l'expérience. On y retrouve une décroissance rapide pendant les premières minutes de l'expérience, puis une saturation autour de la valeur 2, ce qui correspond bien au phénomène observé à la Figure D.4, avec l'existence de deux "pôles" à l'intérieur de chaque goutte.

Sur les courbes individuelles correspondant à chaque puits, on peut fitter une fonction exponentielle de la forme : $f(t) = A \exp(-\frac{t}{\tau}) + B$. Dès lors, on peut représenter, en fonction du débit de phase continue, les constantes τ de chacune des observables (Figure D.5). On constate que l'ordre de grandeur des constantes de temps τ , typiquement de l'ordre de la minute, n'est pas modifié par l'écoulement sur la gamme explorée. Pour les τ mesurés sur les évolutions du nombre d'agrégats au cours du temps (Figure D.5A), on note que, quelle que soit la vitesse de l'écoulement, l'agrégation reste plus lente que dans le cas statique, tendance vérifiée sur les τ obtenues sur les courbes d'évolution de la taille du plus gros agrégat.

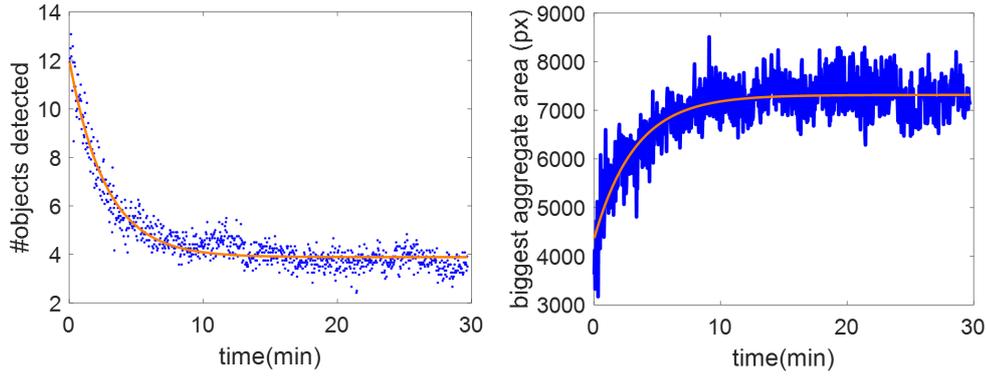


FIGURE D.4: **Agrégation en conditions dynamiques.** (A) Valeur moyenne du nombre d'objets détectés dans les gouttes en fonction du temps. Les gouttes sont soumises à un écoulement de $90 \mu\text{L min}^{-1}$. Temps caractéristique de l'agrégation de cellules. Fit exponentiel $f(t) = A \exp(-\frac{t}{\tau}) + B$ avec $\tau = 2.79$, $A = 8.1$, $B = 3.88$. $R^2 = 0.899$. (B) Valeur moyenne de l'aire du plus gros objet détecté dans les gouttes. Moyennes sur $N=12$ puits. Fit exponentiel $f(t) = A \exp(-\frac{t}{\tau}) + B$ avec $\tau = 3.22$, $A = -2973$, $B = 7316$. $R^2 = 0.71$.

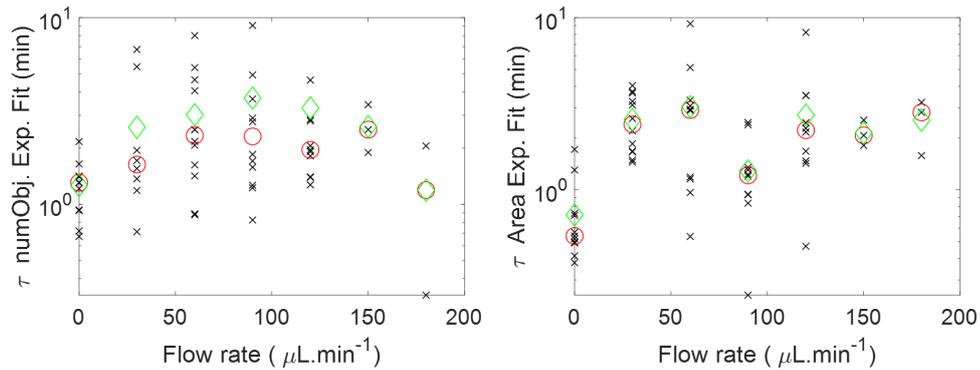


FIGURE D.5: **Temps caractéristique de l'agrégation de cellules.** (A) Temps caractéristique obtenu sur les courbes du nombre d'objet en fonction du temps. Chaque "x" est obtenu sur un puits. Les losanges verts représentent le tau moyen pour une valeur d'écoulement, le rond rouge la médiane. (B) Idem, obtenu sur les courbes de taille du plus gros agrégat en fonction du temps.

On peut tenter de distinguer deux grands comportements dans nos expériences : pour des écoulements de débit inférieurs à $90 \mu\text{L min}^{-1}$, les cellules finissent par s'agréger à un seul endroit du piège, dans la partie de la goutte qui fait face à l'écoulement.

D.4 Discussion et Perspectives

Les phénomènes d'agrégation cellulaire ont fait l'objet de nombreuses études, en particulier dans le cas des globules rouges, qui, lorsqu'ils forment des caillots, peuvent obstruer les canaux sanguins et provoquer des thromboses [254, 255]. Les cellules adhérentes sont également à l'honneur, d'autant plus depuis l'émergence de la culture sous forme sphéroïde [256]. La littérature s'intéresse tout particulièrement à l'effet des contraintes mécaniques – notamment du cisaillement – sur cette agrégation [254, 256, 257]. Ainsi Tsai et al. [258] ont récemment étudié la formation d'agrégats de MSC en présence d'un mouvement d'agitation périodique, et ont montré que des mouvements

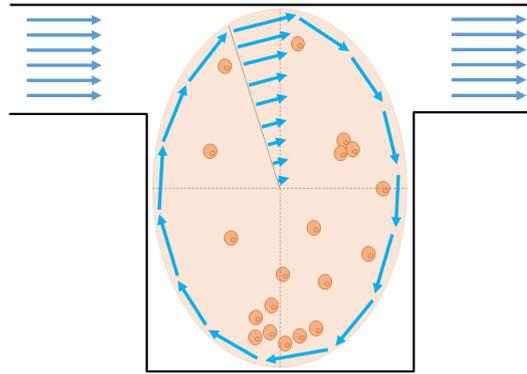


FIGURE D.6: **Schéma d'une goutte d'eau soumise à un écoulement d'huile.**
Les proportions de la géométrie microfluidique sont respectées.

plus amples et plus rapides de la flasque de culture donnaient des agrégats plus petits. A chaque mouvement de la flasque, les cisaillements (le *shear*) engendrés sont de l'ordre de la dizaine de mPa.

Quel est le shear typique ressenti par les cellules lors de l'expérience en gouttes microfluidiques ? Pour répondre de façon correcte, il s'agirait d'étudier le champ de vitesse à l'intérieur de la goutte sur laquelle passe un flux laminaire, comme le font Sugiyama et Sbragaglia [259] sur une demi-goutte. Pour cette annexe, on peut plutôt proposer un raisonnement en loin d'échelle, associé à la Figure D.6 : dans la goutte, la vitesse passe de la valeur imposée par l'écoulement au niveau de l'interface, à une valeur nulle en son centre. Sous ces hypothèses, le shear $\tau = \eta \frac{\partial v}{\partial r}$ a pour échelle : $\tau \sim \eta \frac{v-0}{R}$. Une application numérique donne un shear de l'ordre de quelques centaines de mPa.

De façon surprenante, avec des cisaillements dix fois plus élevés que la littérature, nous observons de l'agrégation cellulaire dans nos gouttes, et parvenons à regrouper les cellules sous la forme d'un à deux agrégats. Il y a donc un effet autre que le shear à prendre en compte dans nos expériences. Ce pourrait être la densité d'ensemencement, i.e. la concentration de cellules dans le milieu de culture. Tsai et al. ont ainsi fait varier la *seeding density* de 25 à 100×10^3 cell/mL. Ils enregistrent certes une augmentation significative de la taille des agrégats dans les flasques(Figure D.7). La raison de la rapide agrégation dans nos goutte serait donc liée au confinement et à la grande concentration des cellules dans un petit volume.

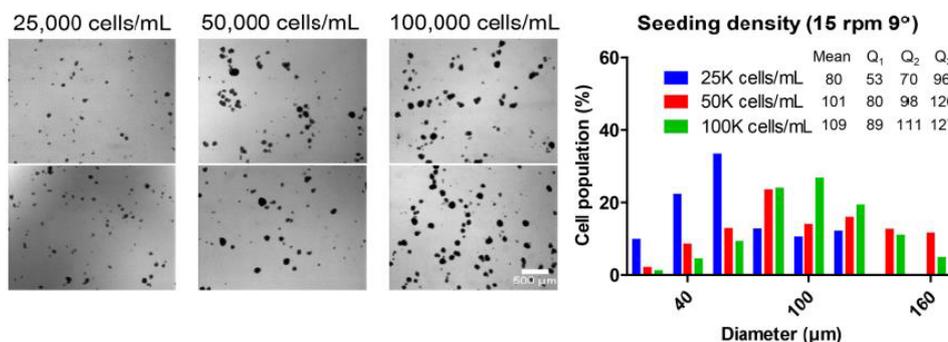


FIGURE D.7: **Effet de la concentration d'ensemencement sur la formation d'agrégats de MSC.** Photographies du contenu de la flasque contenant des MSCs après 18h de culture sous agitation contrôlée. Tirée de [258].

Bibliographie

- [1] N.H. Cho et al. “IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045”. *Diabetes Research and Clinical Practice* (2018). DOI: [10.1016/j.diabres.2018.02.023](https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023).
- [2] Matteo Mascolo. *Autoimmune Diseases – Modern Diseases*. Tech. rep. 2017.
- [3] John J. O’Shea, Averil Ma, and Peter Lipsky. “Cytokines and autoimmunity”. *Nature Reviews Immunology* (2002). DOI: [10.1038/nri702](https://doi.org/10.1038/nri702).
- [4] Mathilde Gerard. “L’obésité, de plus en plus répandue dans les zones rurales”. *lemonde.fr* (2019).
- [5] NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). “Rising rural body-mass index is the main driver of the global obesity epidemic in adults”. *Nature* (2019). DOI: [10.1038/s41586-019-1171-x](https://doi.org/10.1038/s41586-019-1171-x).
- [6] Huxing Cui, Miguel López, and Kamal Rahmouni. “The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity”. *Nature Reviews Endocrinology* (2017). DOI: [10.1038/nrendo.2016.222](https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.222).
- [7] Devesh Mishra et al. “Parabrachial Interleukin-6 Reduces Body Weight and Food Intake and Increases Thermogenesis to Regulate Energy Metabolism”. *Cell Reports* (2019). DOI: [10.1016/j.celrep.2019.02.044](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.044).
- [8] John Arrowsmith. “Phase III and submission failures: 2007–2010”. *Nature Reviews Drug Discovery* (2011). DOI: [10.1038/nrd3375](https://doi.org/10.1038/nrd3375).
- [9] Alexander Kamb, Susan Wee, and Christoph Lengauer. “Why is cancer drug discovery so difficult?” *Nature Reviews Drug Discovery* (2007). DOI: [10.1038/nrd2155](https://doi.org/10.1038/nrd2155).
- [10] R. Thorpe, M. Wadhwa, C.R. Bird, and A.R. Mire-Sluis. “Detection and measurement of cytokines”. *Blood Reviews* (1992). DOI: [10.1016/0268-960X\(92\)90025-L](https://doi.org/10.1016/0268-960X(92)90025-L).
- [11] Eva Engvall and Peter Perlmann. “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa: III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes”. *The Journal of Immunology* (1972).
- [12] Allon M. Klein et al. “Droplet Barcoding for Single-Cell Transcriptomics Applied to Embryonic Stem Cells”. *Cell* (2015). DOI: [10.1016/j.cell.2015.04.044](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.044).
- [13] Paul Bogdan, Bridget M. Deasy, Burhan Gharaibeh, Timo Roehrs, and Radu Marculescu. “Heterogeneous Structure of Stem Cells Dynamics: Statistical Models and Quantitative Predictions”. *Scientific Reports* (2015). DOI: [10.1038/srep04826](https://doi.org/10.1038/srep04826).
- [14] Huabing Yin and Damian Marshall. “Microfluidics for single cell analysis”. *Current Opinion in Biotechnology* (2012). DOI: [10.1016/j.copbio.2011.11.002](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.002).

- [15] Sébastien Sart, Raphaël F.-X. Tomasi, Gabriel Amselem, and Charles N. Baroud. “Multiscale cytometry and regulation of 3D cell cultures on a chip”. *Nature Communications* (2017). DOI: [10.1038/s41467-017-00475-x](https://doi.org/10.1038/s41467-017-00475-x).
- [16] D. C. Dumonde et al. ““Lymphokines”: Non-Antibody Mediators of Cellular Immunity generated by Lymphocyte Activation”. *Nature* (1969). DOI: [10.1038/224038a0](https://doi.org/10.1038/224038a0).
- [17] D. G. Tubergen. “Production of macrophage migration inhibition factor by continuous cell lines”. *Journal of Experimental Medicine* (1972). DOI: [10.1084/jem.135.2.255](https://doi.org/10.1084/jem.135.2.255).
- [18] Stanley Cohen, Pierluigi E. Bigazzi, and Takeshi Yoshida. “Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production”. *Cellular Immunology* (1974). DOI: [10.1016/0008-8749\(74\)90066-5](https://doi.org/10.1016/0008-8749(74)90066-5).
- [19] Ksenya Kveler et al. “Immune-centric network of cytokines and cells in disease context identified by computational mining of PubMed”. *Nature Biotechnology* (2018). DOI: [10.1038/nbt.4152](https://doi.org/10.1038/nbt.4152).
- [20] J Vela. “Interleukin-1 Regulates Proliferation and Differentiation of Oligodendrocyte Progenitor Cells”. *Molecular and Cellular Neuroscience* (2002). DOI: [10.1006/mcne.2002.1127](https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1127).
- [21] S. Z. Ben-Sasson et al. “IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2009). DOI: [10.1073/pnas.0902745106](https://doi.org/10.1073/pnas.0902745106).
- [22] Elena Voronov, Yaron Carmi, and Ron N. Apte. “The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis”. *Frontiers in Physiology* (2014). DOI: [10.3389/fphys.2014.00114](https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00114).
- [23] Yong Luo et al. “Pretreating mesenchymal stem cells with interleukin-1beta and transforming growth factor-beta synergistically increases vascular endothelial growth factor production and improves mesenchymal stem cell-mediated myocardial protection after acute ischemia”. *Surgery* (2012). DOI: [10.1016/j.surg.2011.09.033](https://doi.org/10.1016/j.surg.2011.09.033).
- [24] Young D Jung et al. “Vascular endothelial growth factor is upregulated by interleukin-1b in human vascular smooth muscle cells via the P38 mitogen-activated protein kinase pathway”. *Angiogenesis* (2001).
- [25] F. Cozzolino et al. “Interleukin 1 is an autocrine regulator of human endothelial cell growth.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1990). DOI: [10.1073/pnas.87.17.6487](https://doi.org/10.1073/pnas.87.17.6487).
- [26] Sunyoung Lee et al. “Autocrine VEGF Signaling Is Required for Vascular Homeostasis”. *Cell* (2007). DOI: [10.1016/j.cell.2007.06.054](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.054).
- [27] Hermann Gram. “Preclinical characterization and clinical development of ILARIS® (canakinumab) for the treatment of autoinflammatory diseases”. *Current Opinion in Chemical Biology* (2016). DOI: [10.1016/j.cbpa.2015.12.003](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.12.003).
- [28] Fawaz Awad et al. “Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation”. *PLOS ONE* (2017). Ed. by Hsin-Chih Lai. DOI: [10.1371/journal.pone.0175336](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175336).
- [29] Gloria Lopez-Castejon and David Brough. “Understanding the mechanism of IL-1Beta secretion”. *Cytokine & Growth Factor Reviews* (2011). DOI: [10.1016/j.cytogfr.2011.10.001](https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001).

- [30] I. Jéru and S. Amselem. “Inflammasome et interleukine 1”. *La Revue de Médecine Interne* (2011). DOI: [10.1016/j.revmed.2010.02.013](https://doi.org/10.1016/j.revmed.2010.02.013).
- [31] Fawaz Awad et al. “Chronic myelomonocytic leukemia as a cause of fatal uncontrolled inflammation in familial Mediterranean fever”. *Orphanet Journal of Rare Diseases* (2015). DOI: [10.1186/s13023-015-0295-9](https://doi.org/10.1186/s13023-015-0295-9).
- [32] Sonia Carta et al. “The Rate of Interleukin-1Beta Secretion in Different Myeloid Cells Varies with the Extent of Redox Response to Toll-like Receptor Triggering”. *Journal of Biological Chemistry* (2011). DOI: [10.1074/jbc.M110.203398](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.203398).
- [33] Napoleone Ferrara, Hans-Peter Gerber, and Jennifer LeCouter. “The biology of VEGF and its receptors”. *Nature Medicine* (2003). DOI: [10.1038/nm0603-669](https://doi.org/10.1038/nm0603-669).
- [34] Napoleone Ferrara. “VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors”. *Nature Reviews Cancer* (2002). DOI: [10.1038/nrc909](https://doi.org/10.1038/nrc909).
- [35] Bernhard Barleon, Silvano Sozzani, Herbert A Weich, Alberto Mantovani, and Dieter Marme. “Migration of Human Monocytes in Response to Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Is Mediated via the VEGF Receptor flt-2”. *Blood* (1996).
- [36] N. Gupta. “Diabetic Retinopathy and VEGF”. *The Open Ophthalmology Journal* (2013). DOI: [10.2174/1874364101307010004](https://doi.org/10.2174/1874364101307010004).
- [37] B M Beckermann et al. “VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma”. *British Journal of Cancer* (2008). DOI: [10.1038/sj.bjc.6604508](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604508).
- [38] Jean-Philippe Coppé, Pierre-Yves Desprez, Ana Krtolica, and Judith Campisi. “The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression”. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* (2010). DOI: [10.1146/annurev-pathol-121808-102144](https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144).
- [39] Xiaohui Du et al. “Droplet Array-Based 3D Coculture System for High-Throughput Tumor Angiogenesis Assay”. *Analytical Chemistry* (2018). DOI: [10.1021/acs.analchem.7b04772](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04772).
- [40] Feilim Mac Gabhann, James W. Ji, and Aleksander S. Popel. “Computational Model of Vascular Endothelial Growth Factor Spatial Distribution in Muscle and Pro-Angiogenic Cell Therapy”. *PLoS Computational Biology* (2006). DOI: [10.1371/journal.pcbi.0020127](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020127).
- [41] Stacey D Finley, Marianne O Engel-Stefanini, Pi Imoukhuede, and Aleksander S Popel. “Pharmacokinetics and pharmacodynamics of VEGF-neutralizing antibodies”. *BMC Systems Biology* (2011). DOI: [10.1186/1752-0509-5-193](https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-193).
- [42] Sadegh Dehghani et al. “Aptamer-based biosensors and nanosensors for the detection of vascular endothelial growth factor (VEGF): A review”. *Biosensors and Bioelectronics* (2018). DOI: [10.1016/j.bios.2018.03.037](https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.03.037).
- [43] B. Zhang, R. Iezzi, and T. Cui. “Low-cost and flexible VEGF sensors based on microfluidic induced tunable graphene films”. *2013 Transducers & Euroensors XXVII: The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS & EUROSENSORS XXVII)*. Barcelona, Spain: IEEE, 2013. DOI: [10.1109/Transducers.2013.6626722](https://doi.org/10.1109/Transducers.2013.6626722).
- [44] Micaela Tamara Vitor, Sébastien Sart, Antoine Barizien, Lucimara Gaziola De La Torre, and Charles N. Baroud. “Tracking the Evolution of Transiently Transfected Individual Cells in a Microfluidic Platform”. *Scientific Reports* (2018). DOI: [10.1038/s41598-018-19483-y](https://doi.org/10.1038/s41598-018-19483-y).

- [45] Pratip K Chattopadhyay, Todd M Gierahn, Mario Roederer, and J Christopher Love. "Single-cell technologies for monitoring immune systems". *Nature Immunology* (2014). DOI: [10.1038/ni.2796](https://doi.org/10.1038/ni.2796).
- [46] Qing Han, Elizabeth M. Bradshaw, Björn Nilsson, David A. Hafler, and J. Christopher Love. "Multidimensional analysis of the frequencies and rates of cytokine secretion from single cells by quantitative microengraving". *Lab on a Chip* (2010). DOI: [10.1039/b926849a](https://doi.org/10.1039/b926849a).
- [47] Jonghoon Choi, Yoon Jeong, Kwan Hong Lee, and Hansoo Park. "Enhanced detection of single-cell-secreted proteins using a fluorescent immunoassay on the protein-G-terminated glass substrate". *International Journal of Nanomedicine* (2015). DOI: [10.2147/IJN.S92596](https://doi.org/10.2147/IJN.S92596).
- [48] J Christopher Love, Jehnna L Ronan, Gijsbert M Grotenbreg, Annemarthe G van der Veen, and Hidde L Ploegh. "A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies". *Nature Biotechnology* (2006). DOI: [10.1038/nbt1210](https://doi.org/10.1038/nbt1210).
- [49] Victor G. Sendra, Anthony Lie, Gabrielle Romain, Sandeep K. Agarwal, and Navin Varadarajan. "Detection and isolation of auto-reactive human antibodies from primary B cells". *Methods* (2013). DOI: [10.1016/j.ymeth.2013.06.018](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.06.018).
- [50] Alexis J. Torres, Abby S. Hill, and J. Christopher Love. "Nanowell-Based Immunoassays for Measuring Single-Cell Secretion: Characterization of Transport and Surface Binding". *Analytical Chemistry* (2014). DOI: [10.1021/ac4030297](https://doi.org/10.1021/ac4030297).
- [51] Gregory P Adams and Louis M Weiner. "Monoclonal antibody therapy of cancer". *Nature Biotechnology* (2005). DOI: [10.1038/nbt1137](https://doi.org/10.1038/nbt1137).
- [52] Jonghoon Choi, Kerry Routenberg Love, Yuan Gong, Todd M. Gierahn, and J. Christopher Love. "Immuno-Hybridization Chain Reaction for Enhancing Detection of Individual Cytokine-Secreting Human Peripheral Mononuclear Cells". *Analytical Chemistry* (2011). DOI: [10.1021/ac2013916](https://doi.org/10.1021/ac2013916).
- [53] N. Varadarajan et al. "Rapid, efficient functional characterization and recovery of HIV-specific human CD8+ T cells using microengraving". *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2012). DOI: [10.1073/pnas.1111205109](https://doi.org/10.1073/pnas.1111205109).
- [54] Q. Han et al. "Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines". *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2012). DOI: [10.1073/pnas.1117194109](https://doi.org/10.1073/pnas.1117194109).
- [55] Elizabeth M. Bradshaw et al. "Concurrent detection of secreted products from human lymphocytes by microengraving: Cytokines and antigen-reactive antibodies". *Clinical Immunology* (2008). DOI: [10.1016/j.clim.2008.06.009](https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.06.009).
- [56] James C. Weaver, Patrica McGrath, and Sharlene Adams. "Gel microdrop technology for rapid isolation of rare and high producer cells". *Nature Medicine* (1997).
- [57] James C. Weaver et al. "Microbiological Measurements by Immobilization of Cells within Small-Volume Elements". *Annals of the New York Academy of Sciences* (1984). DOI: [10.1111/j.1749-6632.1984.tb29858.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1984.tb29858.x).
- [58] G B Williams, S R Threefoot, J W Lorenz, A L Demain, and A M Klibanov. "Rapid Detection of *E. coli* Immobilized in Gel Microdroplets". *Annals of the New York Academy of Sciences* (1987).

- [59] James C. Weaver, Gregory B. Williams, Alexander Klibanov, and Arnold L. Demain. "Gel Microdroplets: Rapid Detection and Enumeration of Individual Microorganisms by their Metabolic Activity | Nature Biotechnology". *Nature Biotechnology* (1988).
- [60] James C. Weaver, Jonathan G. Bliss, Gail I. Harrison, Kevin T. Powell, and Gregory B. Williams. "Microdrop technology: A general method for separating cells by function and composition". *Methods* (1991). DOI: [10.1016/S1046-2023\(05\)80066-0](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(05)80066-0).
- [61] Kevin T. Powell and James C. Weaver. "Gel Microdroplets and Flow Cytometry: Rapid Determination of Antibody Secretion by Individual Cells Within a Cell Population | Powell, Kevin T.; Weaver, James C. | download". *Nature Biotechnology* (1990).
- [62] James C. Weaver, Jonathan G. Bliss, Kevin T. Powell, Gail I. Harrison, and Gregory B. Williams. "Rapid Clonal Growth Measurements at the Single-Cell Level: Gel Microdroplets and Flow Cytometry". *Nature Biotechnology* (1991). DOI: [10.1038/nbt0991-873](https://doi.org/10.1038/nbt0991-873).
- [63] O Atochina. "Comparison of results using the gel microdrop cytokine secretion assay with ELISPOT and intracellular cytokine staining assay". *Cytokine* (2004). DOI: [10.1016/j.cyto.2004.04.003](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2004.04.003).
- [64] Susan M. Browne and Mohamed Al-Rubeai. "Selection methods for high-producing mammalian cell lines". *Trends in Biotechnology* (2007). DOI: [10.1016/j.tibtech.2007.07.002](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.07.002).
- [65] Victor Turcanu and Neil A. Williams. "Cell identification and isolation on the basis of cytokine secretion: A novel tool for investigating immune responses". *Nature Medicine* (2001). DOI: [10.1038/85533](https://doi.org/10.1038/85533).
- [66] Victor Turcanu, Timothy R. Hirst, and Neil A. Williams. "Modulation of human monocytes by Escherichia coli heat-labile enterotoxin B-subunit; altered cytokine production and its functional consequences". *Immunology* (2002). DOI: [10.1046/j.1365-2567.2002.01429.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01429.x).
- [67] Zhengtuo Zhao, Mohammad Ali Al-Ameen, Kai Duan, Gargi Ghosh, and Joe Fujiou Lo. "On-chip porous microgel generation for microfluidic enhanced VEGF detection". *Biosensors and Bioelectronics* (2015). DOI: [10.1016/j.bios.2015.06.047](https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.047).
- [68] David C. Appleyard, Stephen C. Chapin, and Patrick S. Doyle. "Multiplexed Protein Quantification with Barcoded Hydrogel Microparticles". *Analytical Chemistry* (2011). DOI: [10.1021/ac1022343](https://doi.org/10.1021/ac1022343).
- [69] Alain Pluen, Paolo A. Netti, Rakesh K. Jain, and David A. Berk. "Diffusion of Macromolecules in Agarose Gels: Comparison of Linear and Globular Configurations". *Biophysical Journal* (1999). DOI: [10.1016/S0006-3495\(99\)76911-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)76911-0).
- [70] Nicolas Fatin-Rouge, Konstantin Starchev, and Jacques Buffle. "Size Effects on Diffusion Processes within Agarose Gels". *Biophysical Journal* (2004). DOI: [10.1016/S0006-3495\(04\)74325-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74325-8).
- [71] Nina-Beate Liabakk, Kjell Nustad, and Terje Espevik. "A rapid and sensitive immunoassay for tumor necrosis factor using magnetic monodisperse polymer particles". *Journal of Immunological Methods* (1990). DOI: [10.1016/0022-1759\(90\)90387-B](https://doi.org/10.1016/0022-1759(90)90387-B).

- [72] Reza Riahi et al. “Automated microfluidic platform of bead-based electrochemical immunosensor integrated with bioreactor for continual monitoring of cell secreted biomarkers”. *Scientific Reports* (2016). DOI: [10.1038/srep24598](https://doi.org/10.1038/srep24598).
- [73] Jung-uk Shim et al. “Ultrarapid Generation of Femtoliter Microfluidic Droplets for Single-Molecule-Counting Immunoassays”. *ACS Nano* (2013). DOI: [10.1021/nn401661d](https://doi.org/10.1021/nn401661d).
- [74] Xingyue An et al. “Single-cell profiling of dynamic cytokine secretion and the phenotype of immune cells”. *PLOS ONE* (2017). Ed. by Golo Ahlenstiel. DOI: [10.1371/journal.pone.0181904](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181904).
- [75] Venkatachalam Chokkalingam et al. “Probing cellular heterogeneity in cytokine-secreting immune cells using droplet-based microfluidics”. *Lab on a Chip* (2013). DOI: [10.1039/c3lc50945a](https://doi.org/10.1039/c3lc50945a).
- [76] Klaus Eyer et al. “Single-cell deep phenotyping of IgG-secreting cells for high-resolution immune monitoring”. *Nature Biotechnology* (2017). DOI: [10.1038/nbt.3964](https://doi.org/10.1038/nbt.3964).
- [77] Michael Junkin et al. “High-Content Quantification of Single-Cell Immune Dynamics”. *Cell Reports* (2016). DOI: [10.1016/j.celrep.2016.03.033](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.033).
- [78] Lawrence A. Sasso et al. “Automated microfluidic processing platform for multiplexed magnetic bead immunoassays”. *Microfluidics and nanofluidics* (2012). DOI: [10.1007/s10404-012-0980-0](https://doi.org/10.1007/s10404-012-0980-0).
- [79] R D Sochol, B P Casavant, M E Dueck, L P Lee, and L Lin. “A dynamic bead-based microarray for parallel DNA detection”. *Journal of Micromechanics and Microengineering* (2011). DOI: [10.1088/0960-1317/21/5/054019](https://doi.org/10.1088/0960-1317/21/5/054019).
- [80] R.D. Sochol et al. “Microfluidic Ping Pong for cytokine detection”. *2011 IEEE 24th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*. Cancun, Mexico: IEEE, 2011. DOI: [10.1109/MEMSYS.2011.5734580](https://doi.org/10.1109/MEMSYS.2011.5734580).
- [81] Jin-Woo Choi et al. “An integrated microfluidic biochemical detection system for protein analysis with magnetic bead-based sampling capabilities”. *Lab on a Chip* (2002). DOI: [10.1039/b107540n](https://doi.org/10.1039/b107540n).
- [82] Ramakrishna S. Sista et al. “Heterogeneous immunoassays using magnetic beads on a digital microfluidic platform”. *Lab on a Chip* (2008). DOI: [10.1039/b807855f](https://doi.org/10.1039/b807855f).
- [83] Tania Konry, Alexander Golberg, and Martin Yarmush. “Live single cell functional phenotyping in droplet nano-liter reactors”. *Scientific Reports* (2013). DOI: [10.1038/srep03179](https://doi.org/10.1038/srep03179).
- [84] Xin Cui et al. “A fluorescent microbead-based microfluidic immunoassay chip for immune cell cytokine secretion quantification”. *Lab on a Chip* (2018). DOI: [10.1039/C7LC01183K](https://doi.org/10.1039/C7LC01183K).
- [85] Kyung Jin Son et al. “Microfluidic compartments with sensing microbeads for dynamic monitoring of cytokine and exosome release from single cells”. *The Analyst* (2016). DOI: [10.1039/C5AN01648G](https://doi.org/10.1039/C5AN01648G).
- [86] J. Baudry et al. “Acceleration of the recognition rate between grafted ligands and receptors with magnetic forces”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2006). DOI: [10.1073/pnas.0607991103](https://doi.org/10.1073/pnas.0607991103).
- [87] W.M. Saltzman, M.L. Radomsky, K.J. Whaley, and R.A. Cone. “Antibody diffusion in human cervical mucus”. *Biophysical Journal* (1994). DOI: [10.1016/S0006-3495\(94\)80802-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80802-1).

- [88] Chao Ma et al. “A clinical microchip for evaluation of single immune cells reveals high functional heterogeneity in phenotypically similar T cells”. *Nature Medicine* (2011). DOI: [10.1038/nm.2375](https://doi.org/10.1038/nm.2375).
- [89] Yao Lu et al. “High-Throughput Secretomic Analysis of Single Cells to Assess Functional Cellular Heterogeneity”. *Analytical Chemistry* (2013). DOI: [10.1021/ac400082e](https://doi.org/10.1021/ac400082e).
- [90] Piotr Garstecki, Michael J. Fuerstman, Howard A. Stone, and George M. Whitesides. “Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction—scaling and mechanism of break-up”. *Lab on a Chip* (2006). DOI: [10.1039/b510841a](https://doi.org/10.1039/b510841a).
- [91] Shelley L. Anna, Nathalie Bontoux, and Howard A. Stone. “Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels”. *Applied Physics Letters* (2003). DOI: [10.1063/1.1537519](https://doi.org/10.1063/1.1537519).
- [92] Piotr Garstecki, Howard A. Stone, and George M. Whitesides. “Mechanism for Flow-Rate Controlled Breakup in Confined Geometries: A Route to Monodisperse Emulsions”. *Physical Review Letters* (2005). DOI: [10.1103/PhysRevLett.94.164501](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.94.164501).
- [93] M. Valet, L.-L. Pontani, A.M. Prevost, and E. Wandersman. “Quasistatic Microdroplet Production in a Capillary Trap”. *Physical Review Applied* (2018). DOI: [10.1103/PhysRevApplied.9.014002](https://doi.org/10.1103/PhysRevApplied.9.014002).
- [94] J. Bibette, D. C. Morse, T. A. Witten, and D. A. Weitz. “Stability criteria for emulsions”. *Physical Review Letters* (1992). DOI: [10.1103/PhysRevLett.69.2439](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.69.2439).
- [95] Z. Li, A. M. Leshansky, L. M. Pismen, and P. Tabeling. “Step-emulsification in a microfluidic device”. *Lab on a Chip* (2015). DOI: [10.1039/C4LC01289E](https://doi.org/10.1039/C4LC01289E).
- [96] Jean-Christophe Baret. “Surfactants in droplet-based microfluidics”. *Lab Chip* (2012). DOI: [10.1039/C1LC20582J](https://doi.org/10.1039/C1LC20582J).
- [97] Thomas Krebs, Karin Schroën, and Remko Boom. “Coalescence dynamics of surfactant-stabilized emulsions studied with microfluidics”. *Soft Matter* (2012). DOI: [10.1039/c2sm26122g](https://doi.org/10.1039/c2sm26122g).
- [98] Deniz Pekin et al. “Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics”. *Lab on a Chip* (2011). DOI: [10.1039/c11c20128j](https://doi.org/10.1039/c11c20128j).
- [99] Sofia André Dias et al. “Perfluorocarbon induces alveolar epithelial cell response through structural and mechanical remodeling”. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* (2018). DOI: [10.1007/s10237-018-1005-z](https://doi.org/10.1007/s10237-018-1005-z).
- [100] Fabienne Courtois et al. “Controlling the Retention of Small Molecules in Emulsion Microdroplets for Use in Cell-Based Assays”. *Analytical Chemistry* (2009). DOI: [10.1021/ac802658n](https://doi.org/10.1021/ac802658n).
- [101] Philipp Gruner et al. “Stabilisers for water-in-fluorinated-oil dispersions: Key properties for microfluidic applications”. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* (2015). DOI: [10.1016/j.cocis.2015.07.005](https://doi.org/10.1016/j.cocis.2015.07.005).
- [102] Philipp Gruner et al. “Controlling molecular transport in minimal emulsions”. *Nature Communications* (2016). DOI: [10.1038/ncomms10392](https://doi.org/10.1038/ncomms10392).
- [103] C. Holtze et al. “Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions”. *Lab on a Chip* (2008). DOI: [10.1039/b806706f](https://doi.org/10.1039/b806706f).
- [104] Ivo Leibacher, Peter Reichert, and Jürg Dual. “Microfluidic droplet handling by bulk acoustic wave (BAW) acoustophoresis”. *Lab on a Chip* (2015). DOI: [10.1039/C5LC00083A](https://doi.org/10.1039/C5LC00083A).

- [105] Jean-Maxime Roux, Yves Fouillet, and Jean-Luc Achard. “3D droplet displacement in microfluidic systems by electrostatic actuation”. *Sensors and Actuators A: Physical* (2007). DOI: [10.1016/j.sna.2006.05.012](https://doi.org/10.1016/j.sna.2006.05.012).
- [106] Matthieu Robert de Saint Vincent and Jean-Pierre Delville. “Microfluidic Transport Driven by Opto-Thermal Effects”. *Advances in Microfluidics*. Ed. by Ryan Kelly. InTech, 2012. DOI: [10.5772/37030](https://doi.org/10.5772/37030).
- [107] Etienne Fradet et al. “Combining rails and anchors with laser forcing for selective manipulation within 2D droplet arrays”. *Lab on a Chip* (2011). DOI: [10.1039/c1lc20541b](https://doi.org/10.1039/c1lc20541b).
- [108] R. Dangla, S. C. Kayi, and C. N. Baroud. “Droplet microfluidics driven by gradients of confinement”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2013). DOI: [10.1073/pnas.1209186110](https://doi.org/10.1073/pnas.1209186110).
- [109] Etienne Fradet, Paul Abbyad, Marten H. Vos, and Charles N. Baroud. “Parallel measurements of reaction kinetics using ultralow-volumes”. *Lab on a Chip* (2013). DOI: [10.1039/c3lc50768h](https://doi.org/10.1039/c3lc50768h).
- [110] Etienne Fradet, Christopher Bayer, Florian Hollfelder, and Charles N. Baroud. “Measuring Fast and Slow Enzyme Kinetics in Stationary Droplets”. *Analytical Chemistry* (2015). DOI: [10.1021/acs.analchem.5b03567](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03567).
- [111] Si Hyung Jin et al. “Programmable Static Droplet Array for the Analysis of Cell-Cell Communication in a Confined Microenvironment”. *Analytical Chemistry* (2017). DOI: [10.1021/acs.analchem.7b01462](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01462).
- [112] Hesam Babahosseini, Tom Misteli, and Don L. DeVoe. “Microfluidic on-demand droplet generation, storage, retrieval, and merging for single-cell pairing”. *Lab on a Chip* (2019). DOI: [10.1039/C8LC01178H](https://doi.org/10.1039/C8LC01178H).
- [113] Liangfei Tian et al. “Spontaneous assembly of chemically encoded two-dimensional coacervate droplet arrays by acoustic wave patterning”. *Nature Communications* (2016). DOI: [10.1038/ncomms13068](https://doi.org/10.1038/ncomms13068).
- [114] Dino Di Carlo, Nima Aghdam, and Luke P. Lee. “Single-Cell Enzyme Concentrations, Kinetics, and Inhibition Analysis Using High-Density Hydrodynamic Cell Isolation Arrays”. *Analytical Chemistry* (2006). DOI: [10.1021/ac060541s](https://doi.org/10.1021/ac060541s).
- [115] Richard W. Rambach, Kevin Linder, Michael Heymann, and Thomas Franke. “Droplet trapping and fast acoustic release in a multi-height device with steady-state flow”. *Lab on a Chip* (2017). DOI: [10.1039/C7LC00378A](https://doi.org/10.1039/C7LC00378A).
- [116] W.-H. Tan and S. Takeuchi. “A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2007). DOI: [10.1073/pnas.0606625104](https://doi.org/10.1073/pnas.0606625104).
- [117] Hakim Boukellal, Šeila Selimović, Yanwei Jia, Galder Cristobal, and Seth Fraden. “Simple, robust storage of drops and fluids in a microfluidic device”. *Lab Chip* (2009). DOI: [10.1039/B808579J](https://doi.org/10.1039/B808579J).
- [118] Swastika S. Bithi and Siva A. Vanapalli. “Collective dynamics of non-coalescing and coalescing droplets in microfluidic parking networks”. *Soft Matter* (2015). DOI: [10.1039/C5SM01077B](https://doi.org/10.1039/C5SM01077B).
- [119] Longxiang Zhang et al. “Trapping a moving droplet train by bubble guidance in microfluidic networks”. *RSC Advances* (2018). DOI: [10.1039/C7RA13507F](https://doi.org/10.1039/C7RA13507F).
- [120] Swastika S. Bithi and Siva A. Vanapalli. “Microfluidic cell isolation technology for drug testing of single tumor cells and their clusters”. *Scientific Reports* (2017). DOI: [10.1038/srep41707](https://doi.org/10.1038/srep41707).

- [121] Meng Ting Chung, Daniel Núñez, Dawen Cai, and Katsuo Kurabayashi. “Deterministic droplet-based co-encapsulation and pairing of microparticles via active sorting and downstream merging”. *Lab Chip* (2017). DOI: [10.1039/C7LC00745K](https://doi.org/10.1039/C7LC00745K).
- [122] Weiwei Shi et al. “Droplet microfluidics for characterizing the neurotoxin-induced responses in individual *Caenorhabditis elegans*”. *Lab on a Chip* (2010). DOI: [10.1039/c01c00256a](https://doi.org/10.1039/c01c00256a).
- [123] Louai Labanieh, Thi Nguyen, Weian Zhao, and Dong-Ku Kang. “Floating Droplet Array: An Ultrahigh-Throughput Device for Droplet Trapping, Real-time Analysis and Recovery”. *Micromachines* (2015). DOI: [10.3390/mi6101431](https://doi.org/10.3390/mi6101431).
- [124] Rémi Dangla, Sungyon Lee, and Charles N. Baroud. “Trapping Microfluidic Drops in Wells of Surface Energy”. *Physical Review Letters* (2011). DOI: [10.1103/PhysRevLett.107.124501](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.107.124501).
- [125] K. Leung et al. “A programmable droplet-based microfluidic device applied to multiparameter analysis of single microbes and microbial communities”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2012). DOI: [10.1073/pnas.1106752109](https://doi.org/10.1073/pnas.1106752109).
- [126] Ansgar Huebner et al. “Static microdroplet arrays: a microfluidic device for droplet trapping, incubation and release for enzymatic and cell-based assays”. *Lab Chip* (2009). DOI: [10.1039/B813709A](https://doi.org/10.1039/B813709A).
- [127] Yunpeng Bai et al. “A double droplet trap system for studying mass transport across a droplet-droplet interface”. *Lab on a Chip* (2010). DOI: [10.1039/b925133b](https://doi.org/10.1039/b925133b).
- [128] Riëlle de Ruiter et al. “Electrostatic potential wells for on-demand drop manipulation in microchannels”. *Lab on a Chip* (2014). DOI: [10.1039/c31c51121a](https://doi.org/10.1039/c31c51121a).
- [129] Raphael Tomasi. “Multiscale cytometry of 3D cell cultures in microfluidic hydrogel droplet arrays”. PhD thesis. Ecole Polytechnique, 2016.
- [130] Raphael Tomasi, Sebastien Sart, Tiphaine Champetier, and Charles Baroud. “Studying 3D cell cultures in a microfluidic droplet array under multiple time-resolved conditions” (2018). DOI: [10.1101/407759](https://doi.org/10.1101/407759).
- [131] Jean-Christophe Baret, Felix Kleinschmidt, Abdeslam El Harrak, and Andrew D. Griffiths. “Kinetic Aspects of Emulsion Stabilization by Surfactants: A Microfluidic Analysis”. *Langmuir* (2009). DOI: [10.1021/la9000472](https://doi.org/10.1021/la9000472).
- [132] Ye-Jin Eun, Andrew S. Utada, Matthew F. Copeland, Shoji Takeuchi, and Douglas B. Weibel. “Encapsulating Bacteria in Agarose Microparticles Using Microfluidics for High-Throughput Cell Analysis and Isolation”. *ACS Chemical Biology* (2011). DOI: [10.1021/cb100336p](https://doi.org/10.1021/cb100336p).
- [133] Xuefei Leng, Wenhua Zhang, Chunming Wang, Liang Cui, and Chaoyong James Yang. “Agarose droplet microfluidics for highly parallel and efficient single molecule emulsion PCR”. *Lab on a Chip* (2010). DOI: [10.1039/c01c00145g](https://doi.org/10.1039/c01c00145g).
- [134] Wei-Heong Tan and Shoji Takeuchi. “Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation”. *Adv. Mater.* (2007).
- [135] Chang-Hyung Choi et al. “Generation of monodisperse alginate microbeads and in situ encapsulation of cell in microfluidic device”. *Biomed Microdevices* (2007).

- [136] Nadine Pernodet, Mounir Maaloum, and Bernard Tinland. “Pore size of agarose gels by atomic force microscopy”. *Electrophoresis* (1997). DOI: [10.1002/elps.1150180111](https://doi.org/10.1002/elps.1150180111).
- [137] Kuen Yong Lee. “Alginate: Properties and biomedical applications”. *Progress in Polymer Science* (2012).
- [138] Jeffrey Kunkel and Prashanth Asuri. “Function, Structure, and Stability of Enzymes Confined in Agarose Gels”. *PLoS ONE* (2014). Ed. by Pratul K. Agarwal. DOI: [10.1371/journal.pone.0086785](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086785).
- [139] Charles N. Baroud, Matthieu Robert de Saint Vincent, and Jean-Pierre Delville. “An optical toolbox for total control of droplet microfluidics”. *Lab on a Chip* (2007). DOI: [10.1039/b702472j](https://doi.org/10.1039/b702472j).
- [140] Mohsen Karbaschi, Payam Shahi, and Adam R. Abate. “Rapid, chemical-free breaking of microfluidic emulsions with a hand-held antistatic gun”. *Biomeicrofluidics* (2017). DOI: [10.1063/1.4995479](https://doi.org/10.1063/1.4995479).
- [141] Y Yoshitake, S Mitani, K Sakai, and K Takagi. “Surface tension and elasticity of gel studied with laser-induced surface-deformation spectroscopy”. *PHYSICAL REVIEW E* (2008).
- [142] Jean-Louis Salager, Ana Forgiarini, and Johnny Bullón. “Properties Over a Century”. *Surfactant Science and Technology*. 2014.
- [143] Alexey Kabalnov. “Macroemulsion Stability: The Oriented Wedge Theory Revisited”. *Langmuir* (1995).
- [144] R. A. Sperling and W. J. Parak. “Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles”. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* (2010). DOI: [10.1098/rsta.2009.0273](https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0273).
- [145] Sandeep Kumar Vashist, Edmond Lam, Sabahudin Hrapovic, Keith B. Male, and John H. T. Luong. “Immobilization of Antibodies and Enzymes on 3-Aminopropyltriethoxysilane-Functionalized Bioanalytical Platforms for Biosensors and Diagnostics”. *Chemical Reviews* (2014). DOI: [10.1021/cr5000943](https://doi.org/10.1021/cr5000943).
- [146] Julie M. Goddard and David Erickson. “Bioconjugation techniques for microfluidic biosensors”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2009). DOI: [10.1007/s00216-009-2731-y](https://doi.org/10.1007/s00216-009-2731-y).
- [147] Chandra Kumar Dixit, Sandeep Kumar Vashist, Brian D MacCraith, and Richard O’Kennedy. “Multisubstrate-compatible ELISA procedures for rapid and high-sensitivity immunoassays”. *Nature Protocols* (2011). DOI: [10.1038/nprot.2011.304](https://doi.org/10.1038/nprot.2011.304).
- [148] Jacob Bart et al. “Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices”. *Lab on a Chip* (2009). DOI: [10.1039/b914270c](https://doi.org/10.1039/b914270c).
- [149] L A Cantarero, J E Butler, and J W Osborne. “The Adsorptive Characteristics of Proteins for Polystyrene and Their Significance in Solid-Phase Immunoassays”. *Analytical Biochemistry* (1980).
- [150] W. G. Wood and A. Gadow. “Immobilisation of Antibodies and Antigens on Macro Solid Phases — A Comparison Between Adsorptive and Covalent Binding. A critical study of macro solid phases for use in immunoassay systems, Part I”. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (1983). DOI: [10.1515/cclm.1983.21.12.789](https://doi.org/10.1515/cclm.1983.21.12.789).

- [151] Marsha D Bale, Susan J Danielson, John L Daiss, Kim E Goppert, and Richard C Sutton. "Influence of copolymer composition on protein adsorption and structural rearrangements at the polymer surface". *Journal of Colloid and Interface Science* (1989). DOI: [10.1016/0021-9797\(89\)90227-0](https://doi.org/10.1016/0021-9797(89)90227-0).
- [152] Tomoko Okada and Toshihiko Ogura. "High-resolution imaging of living mammalian cells bound by nanobeads-connected antibodies in a medium using scanning electron-assisted dielectric microscopy". *Scientific Reports* (2017). DOI: [10.1038/srep43025](https://doi.org/10.1038/srep43025).
- [153] Michael Reth. "Matching cellular dimensions with molecular sizes". *Nature Immunology* (2013). DOI: [10.1038/ni.2621](https://doi.org/10.1038/ni.2621).
- [154] Clifford T. Gee, Eric Kehoe, William C. K. Pomerantz, and R. Lee Penn. "Quantifying Protein Concentrations Using Smartphone Colorimetry: A New Method for an Established Test". *Journal of Chemical Education* (2017). DOI: [10.1021/acs.jchemed.6b00676](https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00676).
- [155] Jorge P. López-Alonso et al. "Carbodiimide EDC Induces Cross-Links That Stabilize RNase A C-Dimer against Dissociation: EDC Adducts Can Affect Protein Net Charge, Conformation, and Activity". *Bioconjugate Chemistry* (2009). DOI: [10.1021/bc9001486](https://doi.org/10.1021/bc9001486).
- [156] Meredith E. Wiseman and Curtis W. Frank. "Antibody Adsorption and Orientation on Hydrophobic Surfaces". *Langmuir* (2012). DOI: [10.1021/la203095p](https://doi.org/10.1021/la203095p).
- [157] Isabelle Jérú et al. "Role of interleukin-1beta in NLRP12-associated autoinflammatory disorders and resistance to anti-interleukin-1 therapy". *Arthritis & Rheumatism* (2011). DOI: [10.1002/art.30378](https://doi.org/10.1002/art.30378).
- [158] CLAUDE E SHANNONt. "Communication in the Presence of Noise". *PROCEEDINGS OF THE I.R.E.* (1949).
- [159] C. Parent et al. "Quantitative biological assays with on-chip calibration using versatile architecture and collapsible chambers". *Sensors and Actuators B: Chemical* (2018). DOI: [10.1016/j.snb.2018.01.111](https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.01.111).
- [160] John A. Smith, J.G.R. Hurrell, and S.J. Leach. "Elimination of nonspecific adsorption of serum proteins by Sepharose-bound antigens". *Analytical Biochemistry* (1978). DOI: [10.1016/0003-2697\(78\)90679-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90679-6).
- [161] Gerald Kada, Heinz Falk, and Hermann J Gruber. "Accurate measurement of avidin and streptavidin in crude biofluids with a new, optimized biotin-fluorescein conjugate". *Biochimica et Biophysica Acta* (1999).
- [162] Andrew Evan Kamholz, Eric A. Schilling, and Paul Yager. "Optical Measurement of Transverse Molecular Diffusion in a Microchannel". *Biophysical Journal* (2001). DOI: [10.1016/S0006-3495\(01\)76166-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76166-8).
- [163] D. Horejsh. "A molecular beacon, bead-based assay for the detection of nucleic acids by flow cytometry". *Nucleic Acids Research* (2005). DOI: [10.1093/nar/gni015](https://doi.org/10.1093/nar/gni015).
- [164] Dan Ding, Kai Li, Bin Liu, and Ben Zhong Tang. "Bioprobes Based on AIE Fluorogens". *Accounts of Chemical Research* (2013). DOI: [10.1021/ar3003464](https://doi.org/10.1021/ar3003464).
- [165] L. Song, E.J. Hennink, I.T. Young, and H.J. Tanke. "Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy". *Biophysical Journal* (1995). DOI: [10.1016/S0006-3495\(95\)80442-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80442-X).

- [166] Loling Song, R.P.M. van Gijlswijk, I. Ted Young, and Hans J. Tanke. “Influence of fluorochrome labeling density on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy”. *Cytometry* (1997). DOI: [10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19970301\)27:3<213::AID-CYT02>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19970301)27:3<213::AID-CYT02>3.0.CO;2-F).
- [167] Jean-Yves Tinevez et al. “TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking”. *Methods* (2017). DOI: [10.1016/j.ymeth.2016.09.016](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.09.016).
- [168] J. Crank and P. Nicolson. “A practical method for numerical evaluation of solutions of partial differential equations of the heat-conduction type”. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* (1947). DOI: [10.1017/S0305004100023197](https://doi.org/10.1017/S0305004100023197).
- [169] Marco Gattorno et al. “Pattern of interleukin-1Beta secretion in response to lipopolysaccharide and ATP before and after interleukin-1 blockade in patients withCIAS1 mutations”. *Arthritis & Rheumatism* (2007). DOI: [10.1002/art.22842](https://doi.org/10.1002/art.22842).
- [170] Gabriel Amselem, Cyprien Guermontprez, Benoît Droque, Sébastien Michelin, and Charles N. Baroud. “Universal microfluidic platform for bioassays in anchored droplets”. *Lab on a Chip* (2016). DOI: [10.1039/C6LC00968A](https://doi.org/10.1039/C6LC00968A).
- [171] Chrysiis Michaloglou et al. “BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi”. *Nature* (2005). DOI: [10.1038/nature03890](https://doi.org/10.1038/nature03890).
- [172] Maria Grazia Vizioli et al. “thyrocytes: molecular effectors and inflammatory secretome”. *Oncotarget* (2014).
- [173] Yuchao Chen, Pan Mao, Antoine M. Snijders, and Daojing Wang. “Senescence chips for ultrahigh-throughput isolation and removal of senescent cells”. *Aging Cell* (2018). DOI: [10.1111/ace1.12722](https://doi.org/10.1111/ace1.12722).
- [174] A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhjan, and K. S. Lalykina. “THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS”. *Cell Proliferation* (1970). DOI: [10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x).
- [175] George W. Bush. *President Discusses Stem Cell Research*. gov. 2001.
- [176] M. F. Pittenger. “Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells”. *Science* (1999). DOI: [10.1126/science.284.5411.143](https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143).
- [177] Jennifer M Ryan, Frank P Barry, J Mary Murphy, and Bernard P Mahon. “Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection”. *Journal of Inflammation* (2005).
- [178] Arnold I. Caplan and James E. Dennis. “Mesenchymal stem cells as trophic mediators”. *Journal of Cellular Biochemistry* (2006). DOI: [10.1002/jcb.20886](https://doi.org/10.1002/jcb.20886).
- [179] P. Bianco. “Life in plastic is fantastic”. *Blood* (2007). DOI: [10.1182/blood-2007-06-093781](https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-093781).
- [180] Paolo Bianco et al. “The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine”. *Nature Medicine* (2013). DOI: [10.1038/nm.3028](https://doi.org/10.1038/nm.3028).
- [181] Arnold I. Caplan and Diego Correa. “The MSC: An Injury Drugstore”. *Cell Stem Cell* (2011). DOI: [10.1016/j.stem.2011.06.008](https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.06.008).
- [182] Matthew B Murphy, Kathryn Moncivais, and Arnold I Caplan. “Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine”. *Experimental & Molecular Medicine* (2013). DOI: [10.1038/emm.2013.94](https://doi.org/10.1038/emm.2013.94).

- [183] J Michael Sorrell. "Influence of Adult Mesenchymal Stem Cells on In Vitro Vascular Formation". *Tissue Engineering Part A* (2009). DOI: [10.1089=ten.tea.2008.0254](https://doi.org/10.1089=ten.tea.2008.0254).
- [184] Suk Ho Bhang et al. "Angiogenesis in ischemic tissue produced by spheroid grafting of human adipose-derived stromal cells". *Biomaterials* (2011). DOI: [10.1016/j.biomaterials.2010.12.035](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.035).
- [185] Liwen Chen, Edward E. Tredget, Philip Y. G. Wu, and Yaojiong Wu. "Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing". *PLoS ONE* (2008). Ed. by Patricia Bozza. DOI: [10.1371/journal.pone.0001886](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001886).
- [186] Quanhu Ge et al. "VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms". *Molecular Medicine Reports* (2017). DOI: [10.3892/mmr.2017.8059](https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8059).
- [187] Elena Redondo-Castro et al. "Changes in the secretome of tri-dimensional spheroid-cultured human mesenchymal stem cells in vitro by interleukin-1 priming". *Stem Cell Research & Therapy* (2018). DOI: [10.1186/s13287-017-0753-5](https://doi.org/10.1186/s13287-017-0753-5).
- [188] Siu Kwan Sze, Hui Zhao, Wayne Mitchell, Reida Menshawe El Oakley, and Sai-Kiang Lim. "Elucidating the Secretion Proteome of Human Embryonic Stem Cell-derived Mesenchymal Stem Cells". *Molecular & Cellular Proteomics* (2007). DOI: [10.1074/mcp.M600393-MCP200](https://doi.org/10.1074/mcp.M600393-MCP200).
- [189] Ming Zhang et al. "SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction". *The FASEB Journal* (2007). DOI: [10.1096/fj.06-6558com](https://doi.org/10.1096/fj.06-6558com).
- [190] Zongwei Li, Hua Wei, Linzi Deng, Xiangfeng Cong, and Xi Chen. "Expression and secretion of interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10 by hypoxia- and serum-deprivation-stimulated mesenchymal stem cells: Paracrine anti-fibrotic effects of MSCs in vitro". *FEBS Journal* (2010). DOI: [10.1111/j.1742-4658.2010.07770.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07770.x).
- [191] Amelia Bartholomew et al. "Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo". *Experimental Hematology* (2002).
- [192] Robert Newman, Dana Yoo, Michelle LeRoux, and Alla Danilkovitch-Miagkova. "Treatment of Inflammatory Diseases with Mesenchymal Stem Cells". *Inflammation & Allergy - Drug Targets* (2009). DOI: [10.2174/187152809788462635](https://doi.org/10.2174/187152809788462635).
- [193] Francesco Dazzi and Mauro Krampera. "Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases". *Best Practice & Research Clinical Haematology* (2011). DOI: [10.1016/j.beha.2011.01.002](https://doi.org/10.1016/j.beha.2011.01.002).
- [194] Sadaki Asari et al. "Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation". *Experimental Hematology* (2009).
- [195] M. Di Nicola. "Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli". *Blood* (2002). DOI: [10.1182/blood.V99.10.3838](https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3838).

- [196] Joni H. Ylöstalo, Thomas J. Bartosh, Katie Coble, and Darwin J. Prockop. “Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells Cultured as Spheroids are Self-activated to Produce Prostaglandin E2 that Directs Stimulated Macrophages into an Anti-inflammatory Phenotype: hMSC Spheroids Promote M2 Macrophage Phenotype”. *STEM CELLS* (2012). DOI: [10.1002/stem.1191](https://doi.org/10.1002/stem.1191).
- [197] Timothy P Martens et al. “Mesenchymal lineage precursor cells induce vascular network formation in ischemic myocardium”. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* (2006). DOI: [10.1038/ncpcardio0404](https://doi.org/10.1038/ncpcardio0404).
- [198] Jin-Ok Jeong et al. “Malignant Tumor Formation After Transplantation of Short-Term Cultured Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Experimental Myocardial Infarction and Diabetic Neuropathy”. *Circulation Research* (2011). DOI: [10.1161/CIRCRESAHA.110.239848](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.239848).
- [199] Sohee Jeon et al. “Shift of EMT gradient in 3D spheroid MSCs for activation of mesenchymal niche function”. *Scientific Reports* (2017). DOI: [10.1038/s41598-017-07049-3](https://doi.org/10.1038/s41598-017-07049-3).
- [200] Paul S. Frenette, Sandra Pinho, Daniel Lucas, and Christoph Scheiermann. “Mesenchymal Stem Cell: Keystone of the Hematopoietic Stem Cell Niche and a Stepping-Stone for Regenerative Medicine”. *Annual Review of Immunology* (2013). DOI: [10.1146/annurev-immunol-032712-095919](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095919).
- [201] Bjarke Follin et al. “Increased Paracrine Immunomodulatory Potential of Mesenchymal Stromal Cells in Three-Dimensional Culture”. *Tissue Engineering Part B: Reviews* (2016). DOI: [10.1089/ten.teb.2015.0532](https://doi.org/10.1089/ten.teb.2015.0532).
- [202] Jessica E. Frith, Brian Thomson, and Paul G. Genever. “Dynamic Three-Dimensional Culture Methods Enhance Mesenchymal Stem Cell Properties and Increase Therapeutic Potential”. *Tissue Engineering Part C: Methods* (2010). DOI: [10.1089/ten.tec.2009.0432](https://doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0432).
- [203] Thomas J. Bartosh, Joni H. Ylöstalo, Nikolay Bazhanov, Jessica Kuhlman, and Darwin J. Prockop. “Dynamic compaction of human mesenchymal stem/precursor cells into spheres self-activates caspase-dependent IL1 signaling to enhance secretion of modulators of inflammation and immunity (PGE2, TSG6, and STC1): Activation of IL1-Signaling in MSC Spheres”. *STEM CELLS* (2013). DOI: [10.1002/stem.1499](https://doi.org/10.1002/stem.1499).
- [204] Joshua A. Zimmermann and Todd C. Mcdevitt. “Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion”. *Cytotherapy* (2014). DOI: [10.1016/j.jcyt.2013.09.004](https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.09.004).
- [205] Sébastien Sart, Ang-Chen Tsai, Yan Li, and Teng Ma. “Three-Dimensional Aggregates of Mesenchymal Stem Cells: Cellular Mechanisms, Biological Properties, and Applications”. *Tissue Engineering Part B: Reviews* (2014). DOI: [10.1089/ten.teb.2013.0537](https://doi.org/10.1089/ten.teb.2013.0537).
- [206] Elena Redondo-Castro et al. “Generation of Human Mesenchymal Stem Cell 3D Spheroids Using Low-binding Plates”. *BIO-PROTOCOL* (2018). DOI: [10.21769/BioProtoc.2968](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2968).
- [207] A. V. Aleksandrova et al. “Mathematical and Experimental Model of Oxygen Diffusion for HepaRG Cell Spheroids”. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* (2016). DOI: [10.1007/s10517-016-3326-1](https://doi.org/10.1007/s10517-016-3326-1).
- [208] Kaitlin C. Murphy et al. “Measurement of oxygen tension within mesenchymal stem cell spheroids”. *Journal of The Royal Society Interface* (2017). DOI: [10.1098/rsif.2016.0851](https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0851).

- [209] Francesca Maddalena et al. “Evaluation of Glucose Uptake in Normal and Cancer Cell Lines by Positron Emission Tomography”. *Molecular Imaging* (2015). DOI: [10.2310/7290.2015.00021](https://doi.org/10.2310/7290.2015.00021).
- [210] Austin Nuschke, Melanie Rodrigues, Albin W. Wells, Kyle Sylakowski, and Alan Wells. “Mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells (MSCs) are glycolytic and thus glucose is a limiting factor of in vitro models of MSC starvation”. *Stem Cell Research & Therapy* (2016). DOI: [10.1186/s13287-016-0436-7](https://doi.org/10.1186/s13287-016-0436-7).
- [211] Olivier Frey, Patrick M. Misun, David A. Fluri, Jan G. Hengstler, and Andreas Hierlemann. “Reconfigurable microfluidic hanging drop network for multi-tissue interaction and analysis”. *Nature Communications* (2014). DOI: [10.1038/ncomms5250](https://doi.org/10.1038/ncomms5250).
- [212] Yi-Chung Tung et al. “High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array”. *The Analyst* (2011). DOI: [10.1039/C0AN00609B](https://doi.org/10.1039/C0AN00609B).
- [213] Paola Occhetta et al. “High-Throughput Microfluidic Platform for 3D Cultures of Mesenchymal Stem Cells, Towards Engineering Developmental Processes”. *Scientific Reports* (2015). DOI: [10.1038/srep10288](https://doi.org/10.1038/srep10288).
- [214] E. L. Jackson-Holmes, T. C. McDevitt, and H. Lu. “A microfluidic trap array for longitudinal monitoring and multi-modal phenotypic analysis of individual stem cell aggregates”. *Lab Chip* (2017). DOI: [10.1039/C7LC00763A](https://doi.org/10.1039/C7LC00763A).
- [215] Hans Kleine-Brüggeney et al. “Long-Term Perfusion Culture of Monoclonal Embryonic Stem Cells in 3D Hydrogel Beads for Continuous Optical Analysis of Differentiation”. *Small* (2019). DOI: [10.1002/smll.201804576](https://doi.org/10.1002/smll.201804576).
- [216] Paul Abbyad, Pierre-Louis Tharaux, Jean-Louis Martin, Charles N. Baroud, and Antigoni Alexandrou. “Sickling of red blood cells through rapid oxygen exchange in microfluidic drops”. *Lab on a Chip* (2010). DOI: [10.1039/c004390g](https://doi.org/10.1039/c004390g).
- [217] K.F. Karpinski, S. Hayward, and H. Tryphonas. “Statistical considerations in the quantitation of serum immunoglobulin levels using the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)”. *Journal of Immunological Methods* (1987). DOI: [10.1016/0022-1759\(87\)90289-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(87)90289-4).
- [218] Marisol R. Castro, David Lutz, and Jeffrey L. Edelman. “Effect of COX inhibitors on VEGF-induced retinal vascular leakage and experimental corneal and choroidal neovascularization”. *Experimental Eye Research* (2004). DOI: [10.1016/j.exer.2004.04.008](https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.04.008).
- [219] Xinpeng Zhang et al. “Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair”. *Journal of Clinical Investigation* (2002). DOI: [10.1172/JCI0215681](https://doi.org/10.1172/JCI0215681).
- [220] Charles H. Rundle et al. “Retroviral-based gene therapy with cyclooxygenase-2 promotes the union of bony callus tissues and accelerates fracture healing in the rat”. *The Journal of Gene Medicine* (2008). DOI: [10.1002/jgm.1148](https://doi.org/10.1002/jgm.1148).
- [221] Oreste Gallo et al. “Cyclooxygenase-2 Pathway Correlates with VEGF Expression in Head and Neck Cancer. Implications for Tumor Angiogenesis and Metastasis”. *Neoplasia* (2001). DOI: [10.1038/sj.neo.7900127](https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900127).

- [222] Burkhard H.A. von Rahden et al. “Coexpression of Cyclooxygenases (COX-1, COX-2) and Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF-A, VEGF-C) in Esophageal Adenocarcinoma”. *Cancer Research* (2005). DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-04-1107](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1107).
- [223] D.P. Toomey, J.F. Murphy, and K.C. Conlon. “COX-2, VEGF and tumour angiogenesis”. *The Surgeon* (2009). DOI: [10.1016/S1479-666X\(09\)80042-5](https://doi.org/10.1016/S1479-666X(09)80042-5).
- [224] Felisbina L. Queiroga, Isabel Pires, Margarida Parente, Hugo Gregório, and Carlos S. Lopes. “COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer”. *The Veterinary Journal* (2011). DOI: [10.1016/j.tvjl.2010.06.022](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.06.022).
- [225] Sebastien Sart et al. *Mapping Structure and Biological Functions within Mesenchymal Bodies using Microfluidics*. preprint. Cell Biology, 2019. DOI: [10.1101/514158](https://doi.org/10.1101/514158).
- [226] Kentaro Ozawa, Tohru Ohshima, and Satoshi Ogawa. “Expression of the oxygen-regulated protein ORP150 accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport”. *Journal of Clinical Investigation* (2001).
- [227] Maria Luisa Guzmán-Hernández, Gael Potter, Kristóf Egervári, Jozsef Z. Kiss, and Tamas Balla. “Secretion of VEGF-165 has unique characteristics, including shedding from the plasma membrane”. *Molecular Biology of the Cell* (2014). Ed. by Thomas F. J. Martin. DOI: [10.1091/mbc.e13-07-0418](https://doi.org/10.1091/mbc.e13-07-0418).
- [228] D W Mason and A F Williams. “The kinetics of antibody binding to membrane antigens in solution and at the cell surface”. *Biochemical Journal* (1980). DOI: [10.1042/bj1870001](https://doi.org/10.1042/bj1870001).
- [229] Johannes Kleinheinz, Susanne Jung, Kai Wermker, Carsten Fischer, and Ulrich Joos. “RReesealrechase kinetics of VEGF165 from a collagen matrix and structural matrix changes in a circulation model” (2010).
- [230] Jun Yang et al. “Stability Analysis of Vascular Endothelial Growth Factor in Cerebrospinal Fluid”. *Neurochemical Research* (2011). DOI: [10.1007/s11064-011-0517-z](https://doi.org/10.1007/s11064-011-0517-z).
- [231] J. Kim, W.-J. Oh, N. Gaiano, Y. Yoshida, and C. Gu. “Semaphorin 3E-Plexin-D1 signaling regulates VEGF function in developmental angiogenesis via a feedback mechanism”. *Genes & Development* (2011). DOI: [10.1101/gad.2042011](https://doi.org/10.1101/gad.2042011).
- [232] Hanna Salman et al. “Universal Protein Fluctuations in Populations of Microorganisms”. *Physical Review Letters* (2012). DOI: [10.1103/PhysRevLett.108.238105](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.108.238105).
- [233] Wikipedia. *Fréchet distribution - Wikipedia*.
- [234] Naama Brenner et al. “Universal protein distributions in a model of cell growth and division”. *Physical Review E* (2015). DOI: [10.1103/PhysRevE.92.042713](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.92.042713).
- [235] B. Banerjee, S. Balasubramanian, G. Ananthakrishna, T.V. Ramakrishnan, and G.V. Shivashankar. “Tracking Operator State Fluctuations in Gene Expression in Single Cells”. *Biophysical Journal* (2004). DOI: [10.1016/S0006-3495\(04\)74354-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74354-4).
- [236] Bulmer. *Principles of Statistics - M. G. Bulmer - Google Livres*. Dover. 1979.
- [237] L. Fenton. “The Sum of Log-Normal Probability Distributions in Scatter Transmission Systems”. *IEEE Transactions on Communications* (1960). DOI: [10.1109/TCOM.1960.1097606](https://doi.org/10.1109/TCOM.1960.1097606).

- [238] D. Schleher. “Generalized Gram-Charlier series with application to the sum of log-normal variates (Corresp.)” *IEEE Transactions on Information Theory* (1977). DOI: [10.1109/TIT.1977.1055686](https://doi.org/10.1109/TIT.1977.1055686).
- [239] Daniel Dufresne. “The Log-Normal Approximation in Financial and Other Computations”. *Advances in Applied Probability* (2004).
- [240] Jingxian Wu, N.B. Mehta, and Jin Zhang. “Flexible lognormal sum approximation method”. *GLOBECOM '05. IEEE Global Telecommunications Conference, 2005*. St. Louis, MO, USA: IEEE, 2005. DOI: [10.1109/GLOCOM.2005.1578407](https://doi.org/10.1109/GLOCOM.2005.1578407).
- [241] Antoine Barizien. “Studying the variability of bacterial growth in microfluidic-droplets”. PhD thesis. Univ. Paris-Saclay, 2019.
- [242] Sadegh Dehghani et al. “Aptamer-based biosensors and nanosensors for the detection of vascular endothelial growth factor (VEGF): A review”. *Biosensors and Bioelectronics* (2018). DOI: [10.1016/j.bios.2018.03.037](https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.03.037).
- [243] Tobias Wimmer, Eva Schroeter, Birgit Lorenz, and Knut Stieger. “Detection of the Vascular Endothelial Growth Factor with a Novel Bioluminescence Resonance Energy Transfer Pair Using a Two-Component System”. *Sensors* (2017). DOI: [10.3390/s17010145](https://doi.org/10.3390/s17010145).
- [244] Konstantinos Tsioris, Alexis J. Torres, Thomas B. Douce, and J. Christopher Love. “A New Toolbox for Assessing Single Cells”. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* (2014). DOI: [10.1146/annurev-chembioeng-060713-035958](https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-060713-035958).
- [245] Dongeun Huh, Geraldine A. Hamilton, and Donald E. Ingber. “From 3D cell culture to organs-on-chips”. *Trends in Cell Biology* (2011). DOI: [10.1016/j.tcb.2011.09.005](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.005).
- [246] Nathalie Jollien. “Des mini-organes au service de la recherche”. *lemonde.fr* (2016).
- [247] Mihir Zaveri, Mariel Padilla, and Jaclyn Peiser. *E.P.A. Says It Will Drastically Reduce Animal Testing - The New York Times*.
- [248] Ministère de la transition écologique et solidaire. *JO num299*. 2014.
- [249] Amir M. Ghaemmaghami, Matthew J. Hancock, Helen Harrington, Hirokazu Kaji, and Ali Khademhosseini. “Biomimetic tissues on a chip for drug discovery”. *Drug Discovery Today* (2012). DOI: [10.1016/j.drudis.2011.10.029](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.10.029).
- [250] K. M. Kokolus et al. “Baseline tumor growth and immune control in laboratory mice are significantly influenced by subthermoneutral housing temperature”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2013). DOI: [10.1073/pnas.1304291110](https://doi.org/10.1073/pnas.1304291110).
- [251] Tadao Nakashima, Masataka Shimizu, and Masato Kukizaki. “Particle control of emulsion by membrane emulsification and its applications”. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2000). DOI: [10.1016/S0169-409X\(00\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00099-5).
- [252] Pierre-Gilles de Gennes, Françoise Brochard-Wyart, and David Quere. *Gouttes, bulles, perles et ondes*. Belin. Echelles.
- [253] Rémi Dangla, Etienne Fradet, Yonatan Lopez, and Charles N Baroud. “The physical mechanisms of step emulsification”. *Journal of Physics D: Applied Physics* (2013). DOI: [10.1088/0022-3727/46/11/114003](https://doi.org/10.1088/0022-3727/46/11/114003).
- [254] J. Heinrich Joist, Joan E. Bauman, and Salvatore P. Sutera. “Platelet adhesion and aggregation in pulsatile shear flow: Effects of red blood cells”. *Thrombosis Research* (1998). DOI: [10.1016/S0049-3848\(98\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(98)00160-1).

- [255] Yu Du et al. “Combined modeling of cell aggregation and adhesion mediated by receptor–ligand interactions under shear flow”. *Theoretical and Applied Mechanics Letters* (2015). DOI: [10.1016/j.taml.2015.09.004](https://doi.org/10.1016/j.taml.2015.09.004).
- [256] é. Török et al. “Optimization of Hepatocyte Spheroid Formation for Hepatic Tissue Engineering on Three-Dimensional Biodegradable Polymer within a Flow Bioreactor prior to Implantation”. *Cells Tissues Organs* (2001). DOI: [10.1159/000047858](https://doi.org/10.1159/000047858).
- [257] Changliang Fu, Chunfang Tong, Cheng Dong, and Mian Long. “Modeling of Cell Aggregation Dynamics Governed by Receptor–Ligand Binding Under Shear Flow”. *Cellular and Molecular Bioengineering* (2011). DOI: [10.1007/s12195-011-0167-x](https://doi.org/10.1007/s12195-011-0167-x).
- [258] Ang-Chen Tsai, Yijun Liu, Xuegang Yuan, Ravindran Chella, and Teng Ma. “Aggregation kinetics of human mesenchymal stem cells under wave motion”. *Biotechnology Journal* (2017). DOI: [10.1002/biot.201600448](https://doi.org/10.1002/biot.201600448).
- [259] K. Sugiyama and M. Sbragaglia. “Linear shear flow past a hemispherical droplet adhering to a solid surface”. *arXiv:cond-mat/0703488* (2007). arXiv: cond-mat/0703488.

Titre : Microfluidique pour la mesure de biomolécules sécrétées

Mots clés : microfluidique, culture cellulaire 3D, cytokine, sécrétome, variabilité, ELISA

Résumé : Cette thèse porte sur l'étude et la quantification des molécules sécrétées par des cellules mammifères, organisées sous forme de sphéroïdes 3D dans des gouttes microfluidiques.

Le sécrétome joue un rôle prépondérant dans la régulation des communications entre cellules eucaryotes, et contribue à la réponse collective des cellules de l'organisme. Caractériser la diversité des protéines sécrétées par des populations de cellules est ainsi une clé pour relier leur phénotype à leurs fonctions sécrétoires. Au cours des deux dernières décennies, des solutions technologiques ont ainsi permis de quantifier séparément le sécrétome de cellules non-adhérentes individuelles. Ces technologies, qui ouvrent la voie vers des mesures multiplexées de plusieurs molécules sécrétées par un très grand nombre de cellules, sont cependant difficiles à transposer dans le cas de cellules ayant besoin d'un substrat physique pour survivre.

On commence donc par présenter la plateforme microfluidique utilisée au cours de la thèse pour la culture de cellules adhérentes sous forme d'agrégats 3D particuliers, appelés sphéroïdes. Dans cette plateforme, nous développons un premier test immunologique type ELISA pour la quantification de la cytokine inflammatoire IL-1 β , en utilisant des billes fonctionnalisées par des anticorps spécifiques à cette cytokine. L'utilisation combinée de la microscopie de fluorescence et de l'analyse informatisée des images permet de relier un signal optique lié au test immunologique à une grandeur biologique, ici la concentration de cytokine.

Dans une goutte de 400 μ m, la vitesse de diffusion des molécules concurrence la cinétique chimique du test immunologique : une part importante de la réflexion se voit donc dédiée à l'étude, expérimentale et théorique, de la capture des cytokines sur le substrat du test ELISA en goutte. On applique ce test immunologique à la sécrétion de sphéroïdes de cellules souches mésenchymateuses humaines hMSC. Ces cellules constituent une population hétérogène progénitrice de plusieurs types cellulaires, et démontrent une action trophique importante lorsqu'elles sont cultivées en 3D. Dans la plateforme microfluidique présentée, on mesure ainsi des sécrétions importantes d'IL-1 β , mais aussi de la molécule-signal de l'angiogenèse VEGF. Un modèle numérique de réaction-diffusion permet de prédire les temps caractéristiques de capture par le test immunologique. En plus de mettre en évidence l'accumulation des molécules dans le temps, ce test révèle les effets d'un médicament non-stéroïdien sur la sécrétion de VEGF. Ces effets sur le sécrétome sont combinés à l'observation de la morphologie du sphéroïde, et à la mesure de sa production intracellulaire de VEGF.

Les signaux associés à la production intra et extra-cellulaire présentent une large variabilité au sein d'un même répliqua biologique. Le dernier chapitre relie ces variabilités à celles de la population de cellules qui constituent nos sphéroïdes. Il semble exister un effet collectif à l'intérieur de l'agrégat qui dépasse la simple sommation des hétérogénéités cellulaires.

Title : Microfluidics for measuring secreted biomolecules

Keywords : microfluidics, 3D cell culture, cytokine, secretomics, variability, ELISA

Abstract : This thesis presents some results about secretome quantification by 3D-organized mammalian cells. Secretome has a key role in cell-to-cell interactions, and ultimately contributes to collective cellular response. The characterization of individual diversity within a population for protein secretion is therefore required to better understanding the link between cellular phenotype and secretory functions. Researches of the last two decades have led to multiplexed and high-throughput methods for quantifying cellular secretion of anchorage-independent cells. But these methods are difficult to transpose to cells needing a physical substrate to adhere on. In this manuscript is presented a microfluidic platform that allows the culture of anchorage-dependent cells as a dense array of spheroids. In this platform, we developed an immuno-assay to quantify the presence of the cytokines IL-1 β , based on antibody-grafted beads. Using fluorescence microscopy and image analysis, an optical signal read on micrometric beads is translated to a biological information on cytokine concentration. As diffusion times compete with reaction kinetics within our device, a theoretical study of cytokine transport and capture inside the droplet is developed.

This immune-assay is tested on human mesenchymal stem cells spheroids. hMSCs constitute a cell population of progenitors of several cellular types of connective tissues and display important trophic functions while cultivated in 3D. In our microfluidic device, we demonstrated important secretions of IL-1 β , but also of the angiogenesis chemokine VEGF. A numerical model of reaction-diffusion allows to predict characteristic times of cytokine capture by the immune-assay. In addition of evidencing VEGF accumulation over time, the assay unravels the effect of a non-steroidal drug on VEGF secretion.

Signals associated with intra and extracellular production of VEGF by spheroids show a wide variability within a single biological replicate. The last chapter is therefore trying this variability with heterogeneities at the cell level, as there seems to be a collective effect within spheroids that goes beyond the simple summation of cellular features.

