HAL open science

Analyseur optofluidique pour capsules cellulaires

Nelson Hélaine

To cite this version:

Nelson Hélaine. Analyseur optofluidique pour capsules cellulaires. Optique [physics.optics]. Université de Bordeaux, 2020. Français. NNT : 2020BORD0158 . tel-03053725

HAL Id: tel-03053725

https://theses.hal.science/tel-03053725

Submitted on 11 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.

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DE SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR

SPÉCIALITÉ LASERS, MATIÈRE, NANOSCIENCES

Par Nelson HÉLAINE

Analyseur optofluidique pour capsules cellulaires

Sous la direction de : Pierre NASSOY

Soutenue le 23 Octobre 2020

Membres du jury :

M. BARET, Jean-Christophe	Professeur, Université de Bordeaux	Président
Mme RIVIÈRE, Charlotte	Maître de conférences, Université Claude Bernard	Rapporteur
M. FATTACCIOLI, Jacques	Maître de conférences, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Mme LEDUC, Cécile	Chargée de recherches, Institut Pasteur	Examinateur
M. DELVILLE, Jean-Pierre	Directeur de recherches, Université de Bordeaux	Examinateur

Titre : Analyseur optofluidique pour capsules cellulaires

Résumé :

Ce travail de thèse consiste en la conception et l'utilisation d'un système d'analyse d'agrégats multicellulaires par mesure de l'atténuation de la lumière. La technologie des capsules cellulaires brevetée au sein de l'équipe d'accueil peut générer plusieurs milliers de sphéroïdes/organoïdes en quelques secondes. L'objectif est ici de caractériser ces échantillons submillimétriques encapsulés dans une coque transparente par une mesure de leur rayon et de leur coefficient d'atténuation, sans recourir à une technique d'imagerie intrinsèquement lente et bas débit. Pour exploiter le fait que la technique de production est à haut débit, nous proposons de développer un analyseur optofluidique inspiré dans son principe de fonctionnement des cytomètres classiques, mais sans marquage fluorescent des échantillons. Nous avons tout d'abord simulé l'interaction d'un faisceau laser gaussien avec une sphère de rayon et coefficient d'atténuation connus, puis développé le module optique de détection. Les mesures expérimentales ont été confrontées aux simulations pour valider notre approche. Ensuite, nous avons conçu un circuit microfluidique capable de convoyer les capsules cellulaires pesantes au travers du faisceau en utilisant une approche par impression 3D. Enfin, notre système optique a été combiné au module fluidique et modifié pour déterminer la vitesse de déplacement de chaque capsule convoyée au moment de son interaction avec le faisceau d'interrogation. Nous apportons la preuve de concept que le caractère haut-débit d'un tel instrument permet d'analyser un très grand nombre d'échantillons (plusieurs milliers) en peu de temps (quelques heures). L'instrument présenté a été utilisé pour déterminer les courbes de croissance de deux lignées cellulaires de lymphocytes tumoraux (tumeurs « liquides »), ainsi que des modifications de coefficient d'atténuation liées à la fixation sur cellules hépatiques tumorales ou à la stimulation chimique de cellules souches adipeuses qui génèrent des chapelets de gouttelettes lipidiques au cours de leur différenciation. La sensibilité de notre instrument laisse envisager son utilisation dans le cadre d'essais précliniques sur des agrégats de cellules tumorales, afin de déterminer la croissance de ces « micro-tumeurs » et donc estimer l'efficacité de traitements de chimiothérapie par exemple. Enfin, un aspect « open source » a été souhaité dans la conception de l'infrastructure électronique et informatique du prototype, ouvrant ce travail à la copie et l'amélioration, notamment par l'ajout d'un module de tri d'échantillons.

Mots clés : Optofluidique, organoïdes, interaction lumière-tissu vivant

Title : Optofluidic analyzer for cellular capsules

Abstract :

This work consists in the design and use of a micro-device dedicated to the analysis of multicellular aggregates based on the measure of light attenuation. The celllular capsule technology, which was patented by the host team, can generate several thousand spheroids/organoids in a few seconds. Our objective is to characterize these submillimetric samples encapsulated in a transparent shell by measuring their radius and extinction coefficient without resorting to an inherently slow and low throughput imaging technique. To exploit the high throughput capabilities of the technique, we propose to develop a fluorescence-free optofluidic analyzer inspired from classical cytometers. We first simulated the interaction of a Gaussian laser beam with a sphere of known radius and extinction coefficient and developed the optical detection module. Experimental measurements were compared with simulations to validate our approach. Then, we designed a microfluidic device aimed at conveying the heavy cellular capsules through the beam using a 3D printing approach. Finally, our optical system was combined with the fluidic module and modified to determine the displacement speed of each conveyed capsule as it interacts with the laser beam. We provide a proof of concept that the high throughput of such an instrument allows the analysis of a very large number of samples (several thousands) in a short time (a few hours). The instrument was then used to determine the growth curves of two tumor lymphocyte cell lines ("liquid" tumors), as well as the modifications in the extinction coefficients when cancer cells are fixed and when adipose stem cells undergo differentiation into adipocytes that store lipid droplets. The sensitivity of our instrument is compatible with a further use in pre-clinical trials on tumour cell aggregates to estimate the efficacy of chemotherapy treatments for instance. Finally, an "open source" dimension was integrated into the design of the electronic and software parts of the project to promote copying and improvement, e.g through the addition of a sorting module.

Keywords : Optofluidics, Multicellular aggregates, Light-living matter interaction

---

Unité de recherche

Laboratoire de Photonique, Numérique et Nanosciences, CNRS UMR 5298, Institut d'optique d'Aquitaine, 1 rue François Mitterrand, 33400 Talence, France

Remerciements

Je remercie tout d'abord Mesdames et Messieurs Baret, Delville, Fattaccioli, Leduc et Rivière, les rapporteurs et examinateurs qui composent le jury, pour avoir bien voulu lire et évaluer mon travail. Un grand merci également à mon directeur de thèse Pierre Nassoy, pour toutes les idées, les discussions et le soutien apporté au cours de cette thèse. Ta disponibilité et ta franchise souvent déconcertante mais toujours utile m'ont beaucoup apporté, tant sur le plan humain que dans le travail. Je remercie également l'Université de Bordeaux et l'Agence Nationale pour la Recherche qui ont financé ces recherches.

Ce travail ne serait pas ce qu'il est sans l'équipe BiOf et les autres personnels du LP2N. Merci donc à :

Kevin Alessandri et Maxime Feyeux pour ma première année et la formation à la fabrication de puces. Camille Malrieux, pour m'avoir formé à la culture cellulaire en plus d'être devenue une super amie. Jean-Baptiste Trebbia, pour m'avoir convaincu de gagner du temps avec MATLAB. Laurent Cognet, pour ta bienveillance. Pierre Bon, la seule personne que je connaisse qui pilote un microscope avec une manette de console. Gaëlle Recher pour avoir popularisé l'usage de la musique dans les salles de manip. Jordan Swietlicki (j'ai réussi !), pour l'impression 3D, et la musique.

Une mention très spéciale à mes collaborateurs de l'Institut Bergonié, et surtout à Valérie Le Morvan, avec qui nous avons fait des capsules toutes les semaines pendant plusieurs heures. Tu m'as beaucoup soutenu, et travailler en équipe avec toi m'a énormément apporté. Je remercie également Ariane Peyret pour notre petite collaboration en première année sur les polymersomes encapsulés.

Jeanne Linarès, toujours souriante et prête à donner conseil. Noémie Danné pour les fous rires du midi. Amaël Mombereau, pour la solidarité entre thésards, et pour m'avoir supporté 2 ans de plus après ton stage de M2. Éric Moret, pour ton super travail de stage sur l'analyseur. Merci aussi à Adèle Hillico et Benoît Gouhier, mes voisins de bureau. Je remercie aussi Paul Gersberg, parce que t'es quand même sacrément fou.

Je remercie aussi ma famille et mes amis, tout d'abord ma mère pour son soutien indéfectible. Marine Bourgeois, pour accepter de me supporter tous les jours depuis 2 ans. Quentin Hivert et Romain Canerot, parce que la musique avec vous a été une grande expérience, sans doute reproductible. Mona Grall et Céline Gassie, toujours présentes et aidantes. Yann Hurpy, pour les si bons moments passés à la coloc. Enfin, je dédie cette thèse à ma grand-mère et mon grand-père.

« Vous ratez 100% des choses que vous ne tentez pas. »

- *Wayne Gretzky*

Table des matières

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

1.1 Biologie à 2D versus biologie à 3D 14

1.2 Organoïdes et sphéroïdes 15

1.3 Méthodes de fabrication 17

1.3.1 Méthodes conventionnelles 18

1.3.2 Méthodes utilisant la microfabrication et la microfluidique 19

1.4 Imagerie des sphéroïdes et organoïdes 26

1.4.1 Histologie 26

1.4.2 Marquages fluorescents et sectionnement optique 26

1.4.3 Méthodes d'imagerie sans marquage 29

1.5 Technologies d'analyse à haut-débit 31

1.5.1 Cytométrie en flux 31

1.5.2 Optofluidique 33

1.6 Impression 3D 40

1.7 Adaptation de l'électronique – vers un instrument « open source » 41

1.8 Cahier des charges 42

CHAPITRE 2 - LIGNEES CELLULAIRES ET TECHNIQUE DES CAPSULES CELLULAIRES

2.1 Lignées cellulaires et culture 3D 46

2.1.1 Cellules hépatiques tumorales adhérentes 46

2.1.2 Lymphocytes tumoraux non-adhérents 46

2.1.3 Progéniteurs d'adipocytes 47

2.2 Fabrication des organoïdes par la technologie des capsules cellulaires 47

2.2.1 Solutions d'encapsulation : préparation et propriétés 48

2.2.2 Principe d'encapsulation et dispositif expérimental 48

2.2.3 Caractéristiques générales des capsules cellulaires et culture 3D 50

2.2.4 Fixation des agrégats cellulaires et dissolution des coques d'alginate 52

CHAPITRE 3 - RELATION ENTRE LE SIGNAL D'ATTENUATION D'UN FAISCEAU LASER TRAVERSE PAR UNE CAPSULE CELLULAIRE ET LES PROPRIETES PHYSIQUES ET BIOLOGIQUES DE L'AGREGAT MULTICELLULAIRE ENCAPSULE

3.1 Principe de mesure et simulations 56

3.1.1 Fonctionnement du module optique de l'analyseur optofluidique 56

3.1.2 Caractéristiques du faisceau laser gaussien 58

3.1.3 Simulations numériques de l'interaction laser-sphère 59

3.1.4 Abaques HWHM en fonction de R 63

3.2 Profil de transmission de capsules cellulaires enfouies dans un gel : validation du dispositif optique .. 64

3.2.1 Montage optique d'analyse de capsules uniques par translation motorisée 65

3.2.2 Interface utilisateur et acquisition des données expérimentales 66

3.3 Résultats 69

3.3.1 Étude de de l'influence du milieu environnant sur le signal de transmission 69

3.3.2 Validation de la mesure de rayon des sphéroïdes 70

3.3.3 Statistiques et sources d'erreur 75

3.3.4 Impact de l'ellipticité des agrégats 77

3.3.5 Variations du coefficient d'atténuation 79

3.4 Conclusion 81

CHAPITRE 4 - CONCEPTION ET CARACTERISATION DU MODULE MICROFLUIDIQUE POUR LE CONVOI DE CAPSULES CELLULAIRES PESANTES

4.1 Sédimentation 86

4.1.1 Montage expérimental 86

4.1.2 Résultats : mesure de la densité des capsules cellulaires 88

4.2 Design microfluidique : Fabrication de circuits microfluidiques à l'aide de moules réalisés en impression 3D - DLP 91

4.3 Spécificités de la manipulation fluidique de particules lourdes et grosses 93

4.3.1 Paramètres hydrodynamiques : ordres de grandeur et contribution de la gravité 94
4.3.2 Écoulement dans un canal à section rectangulaire 96
4.3.3 Écoulement dans un canal rectangulaire après centrage hydrodynamique 97
4.3.4 Écoulement dans un canal rectangulaire réduit après centrage hydrodynamique 99
4.3.5 Positionnement des sphéroïdes selon l'axe z lors d'un écoulement dans un canal rectangulaire 102

4.4 Conclusion 104

CHAPITRE 5 - ANALYSE OPTOFLUIDIQUE DES CAPSULES CELLULAIRES

5.1 Adaptation du système optique : mesure de la vitesse de chaque capsule 108
5.1.1 Principe de la mesure de vitesse 108
5.1.2 Dédoublement et mesure de la taille des deux faisceaux selon z 109

5.2 Modification de l'électronique d'acquisition et traitement des données 113
5.2.1 Faisceau déclencheur et faisceau de détection, électronique associée 113
5.2.2 Reconnaissance de pics et extraction automatisée des valeurs d'intérêt 114

5.3 Résultats 117
5.3.1 Croissance de sphéroïdes de lymphocytes B 118
5.3.2 Propriétés optiques des sphéroïdes de, lymphocytes B 119
5.3.3 Analyse d'une population de sphéroïdes de cellules HuH7, fixées et vivantes 120
5.3.4 Analyse d'une population d'organoïdes de cellules souches adipeuses et d'adipocytes (différenciés). 122

5.4 Conclusion 123

CHAPITRE 6 - CONCLUSIONS ET OUVERTURES

CHAPITRE 7 - BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE 8 - ANNEXES

8.1 Protocole de fixation des capsules cellulaires 146

8.2 Protocole d'hydrophobisation de puces microfluidiques d'encapsulation cellulaire 146

8.3 Protocole de décapsulation de capsules cellulaires 147

8.4 Article en préparation 148

8.5 Script de simulation 177
8.5.1 Fonction principale de déplacement de l'objet dans le faisceau 177
8.5.2 Modulation de l'intensité du faisceau par une particule..... 180
8.5.3 Calcul de l'absorption d'une particule sphérique ou elliptique..... 180

8.6 Script de reconnaissance de pics et comparaison aux abaques..... 180

Index des figures

Figure 1 : Schéma des différents gradients d'état et d'espèces chimiques intervenant dans un agrégat multicellulaire……14

Figure 2 : Méthodes de fabrication d'agrégats cellulaires avec et sans structure d'appui……17

Figure 3 : Principe de formation de coques d'alginate……..21

Figure 4 : Schéma conceptuel de l'encapsulation cellulaire à trois flux dans l'air……22

Figure 5 : Schéma de fonctionnement d'une variante du dispositif d'encapsulation avec électrodispersion……23

Figure 6 : Présentation d'un dispositif en PDMS de génération de capsules cellulaires……23

Figure 7 : Image histologique d'un organoïde de cellules souches cancéreuses d'intestin humain……26

Figure 8 : Principes de fonctionnement des microscopies confocale et à feuille de lumière……27

Figure 9 : Arbre de filiation des différents protocoles de transparisation de tissus épais……28

Figure 10 : Principe de fonctionnement de microscopies à phase quantitative et OCT……..29

Figure 11 : Galerie d'images d'organoïdes et de sphéroïdes obtenues par différentes technologies d'imagerie……..30

Figure 12 : Vue schématique de l'interaction de rayons lumineux et d'une cellule……31

Figure 13 : Schéma de fonctionnement d'un trieur de cellules……32

Figure 14 : Protocole de réalisation de circuits microfluidiques par photolithographie……....34

Figure 15 : Cytomètre sur puce de cellules encapsulées par microfluidique digitale. ……...35

Figure 16 : Utilisation de seuils de détection pour déterminer le nombre de cellules au sein d'une gouttelette……...36

Figure 17 : Schéma de fonctionnement d'un système optofluidique de diagnostic de la malaria par atténuation lumineuse de cellules uniques……..36

Figure 18 : Méthodes de tri reposant sur un système électrique ou acoustique……..37

Figure 19 : Méthodes de tri reposant sur un dispositif optique……38

Figure 20 : Méthode de tri reposant sur les forces inertielles appliquées aux échantillons lors de leur écoulement dans un canal microfluidique……38

Figure 21 : Applications optofluidiques autres que la manipulation d'échantillons par un fluide……39

Figure 22 : Vue schématique du processus d'impression 3D « Direct Light Projection »……..40

Figure 23 : Comparatif de plusieurs méthodes de fabrication de moules pour circuits microfluidiques. …41

Figure 24 : Dispositif de co-extrusion permettant la génération d'un jet coaxial……49

Figure 25 : Schéma du montage expérimental permettant l'encapsulation des cellules à l'intérieur d'une coque d'alginate de sodium……...50

Figure 26 : Capsules cellulaires contenant des cellules pré-adipocytaires 3T3F442A observées par microscopie en champ clair……...51

Figure 27 : Histogramme de rayons de sphère équivalents et de sphéricité des capsules……51

Figure 28 : Images en microscopie en champ clair de l'agrégation et croissance des amas de cellules encapsulées pour les différentes lignées cellulaires……52

Figure 29 : Schéma du principe de fonctionnement du module optique de l'analyseur optofluidique reposant sur l'atténuation lumineuse d'une sphère opaque traversée par un faisceau laser gaussien…….57

Figure 30 : Cas limites schématisant le passage d'une sphère au travers d'un faisceau gaussien. ……58

Figure 31 : Schéma théorique de la structure d'un faisceau gaussien focalisé et notations utilisées……58

Figure 32 : Simulation du passage d'une sphère de coefficient d'atténuation β variable et de rayon R fixe au travers d'un faisceau gaussien…….61

Figure 33 : Simulation du passage d'une sphère de coefficient d'atténuation β fixe et de rayon R variable au travers d'un faisceau gaussien…….62

Figure 34 : Représentation d'abaques simulées…….....63

Figure 35 : Photographie et dession de principe du dispositif d'enfouissement de capsules dans du matrigel……..65

Figure 36 : Montage optique permettant l'analyse par translation de capsules uniques identifiées…….. 66

Figure 37 : Capture d'écran du premier onglet du programme Capsula, permettant le contrôle du laser et l'acquisition d'images par le module caméra…….68

Figure 38 : Capture d'écran du volet « détection » du logiciel Capsula……..69

Figure 39 : Caractérisation de l'atténuation de l'intensité lumineuse du laser par différents milieux. …...70

Figure 40 : Passage de sphéroïdes au travers du faisceau gaussien. ……71

Figure 41 : Obtention de β par la loi de Beer-Lambert…….72

Figure 42 : Évolution de la HWHM en fonction du rayon Rim **obtenu par imagerie……72**

Figure 43 : Comparaison entre courbes expérimentales et simulations pour différentes valeurs de β et de R……..73

Figure 44 : Intensité transmise au travers d'une capsule vide et de sphéroïdes décapsulés en fonction de leur position dans le faisceau laser……...74

Figure 45 : Analyse d'images de sphéroïdes de cellules HuH6 par microscopie en champ clair……75

Figure 46 : Exemple de mesure. ……..76

Figure 47 : Cas particulier de mesure…….76

Figure 48 : Simulations de l'intensité transmise au travers d'un ellipsoïde……77

Figure 49 : Impact de la géométrie elliptique d'un sphéroïde……78

Figure 50 : Évolution du coefficient d'atténuation moyen pour des sphéroïdes avant et après confluence…79

Figure 51 : Imagerie en contraste de phase et en fluorescence de capsules de cellules souches adipeuses…80

Figure 52 : Intensité transmise au travers d'organoïdes de pré-adipocytes. ……..81

Figure 53 : Montage expérimental permettant la capture vidéo de la chute de capsules cellulaires dans un milieu aqueux…….87

Figure 54 : Montage d'instantanés de vidéos de sédimentation de capsules cellulaires…….87

Figure 55 : Évolution de la vitesse instantanée d'agrégats encapsulés, de rayons variables au cours de leur chute dans une cuve de spectrométrie. ……88

Figure 56 : Variation de la vitesse de sédimentation en fonction du rayon pour des agrégats encapsulés…89

Figure 57 : Variation de la vitesse de sédimentation en fonction du rayon pour des agrégats encapsulés et décapsulés……...91

Figure 58 : Fabrication de circuits microfluidiques à l'aide de l'impression 3D. ……92

Figure 59 : Dessin du module d'injection des capsules cellulaires dans un circuit microfluidique. …….93

Figure 60 : Écoulement dans un canal rectangulaire simple…….96

Figure 61 : Écoulement dans un canal rectangulaire avec centrage hydrodynamique. ……97

Figure 62 : Vitesse des capsules cellulaires pour un circuit de centrage hydrodynamique. ……..98

Figure 63 : Écoulement dans un canal rectangulaire avec centrage hydrodynamique et goulot……109

Figure 64 : Variation de de la demi-largeur et de l'intensité du signal au maximum d'absorption……101

Figure 65 : Variations de la vitesse d'écoulement de capsules cellulaires après goulot. ……..101

Figure 66 : Distribution de la position le long de la largeur de l'axe découlement des capsules en fonction du débit d'injection central…….102

Figure 67 : Évolution de l'altitude du centre de masse des capsules lors de leur écoulement dans un canal selon le débit d'injection central et la vitesse de flux, après goulot…….103

Figure 68 : Superposition de vues de côté du déplacement de capsules dans un canal……104

Figure 69 : Schéma du principe du système de double détection d'une capsule unique permettant d'obtenir sa vitesse……...109

Figure 70 : Montage optique permettant l'analyse par translation de capsules uniques identifiées. ……110

Figure 71 : Photographies du dispositif expérimental à double faisceau combinant module optique et module microfluidique…….111

Figure 72 : Présentation du double faisceau…….111

Figure 73 : Caractéristiques du double faisceau……..112

Figure 74 : Détection type d'une capsule unique centrée traversant le double faisceau……..114

Figure 75 : Détection brute non-normalisée d'un cluster de capsules alignées traversant le module optique à des instants très proches……..115

Figure 76 : Cas potentiels de détection de capsules rencontrés au cours d'une expérience…….116

Figure 77 : Distributions des grandeurs mesurées et des grandeurs déduites par le système d'abaques…117

Figure 78 : Rayon normalisé des sphéroïdes en fonction du temps pour deux lignées de lymphocytes B. 118

Figure 79 : Évolution du coefficient d'atténuation d'agrégats de lymphocytes B. ……120

Figure 80 : Comparaison des rayons et du coefficient d'atténuation de sphéroïdes vivants et fixés…….121

Figure 81 : Comparaison des rayons et du coefficient d'atténuation d'organoïdes de cellules souches adipeuses avant et après différenciation……....124

Chapitre 1

Introduction

1.1 Biologie à 2D versus biologie à 3D

Un volet fascinant des recherches menées en biologie est de comprendre la formation d'organes à partir d'un embryon, l'organogénèse. La plupart des études réalisées depuis les années 50 pour essayer de disséquer le comportement et le devenir des cellules ont été faites en boîte de Petri. En effet, la culture cellulaire classique, pratiquée depuis l'expérience célèbre de Georges Gey (1951), premier biologiste ayant réalisé un prélèvement de cellules cancéreuses (à partir de sa patiente Henrietta Lacks (Scherer 1953, Masters 2002)) et cultivé ces dernières de manière stable et répétée, génère des monocouches (à deux dimensions, 2D) de cellules, proliférant sur une surface plane, dans une boîte de plastique. Ce modèle de culture, bien que permettant de comprendre les mécanismes fondamentaux de prolifération, division et résistance des populations cellulaires, ne récapitule pas l'architecture tridimensionnelle (3D) des organes. Le développement de cultures multicellulaires 3D, rendu possible grâce à l'apparition de nombreuses techniques, des plus rudimentaires aux plus sophistiquées (voir section 1.3) est de plus en plus répandu dans les laboratoires de biologie car il permet d'atteindre une plus grande pertinence physiologique (Breslin and O'Driscoll 2016, Chignola *et al* 2000, Imamura *et al* 2015). En effet, un nombre important d'études a révélé des artéfacts liés à la culture 2D par rapport aux conditions in vivo, qui sont mieux récapitulées dans les cultures 3D (voir **Figure 1**). Par exemple, le groupe de Ken Yamada (Cukierman 2001), a montré une différence de morphologie des adhésions focales des cellules avec leur environnement et la localisation des molécules constitutives (intégrines, paxiline).

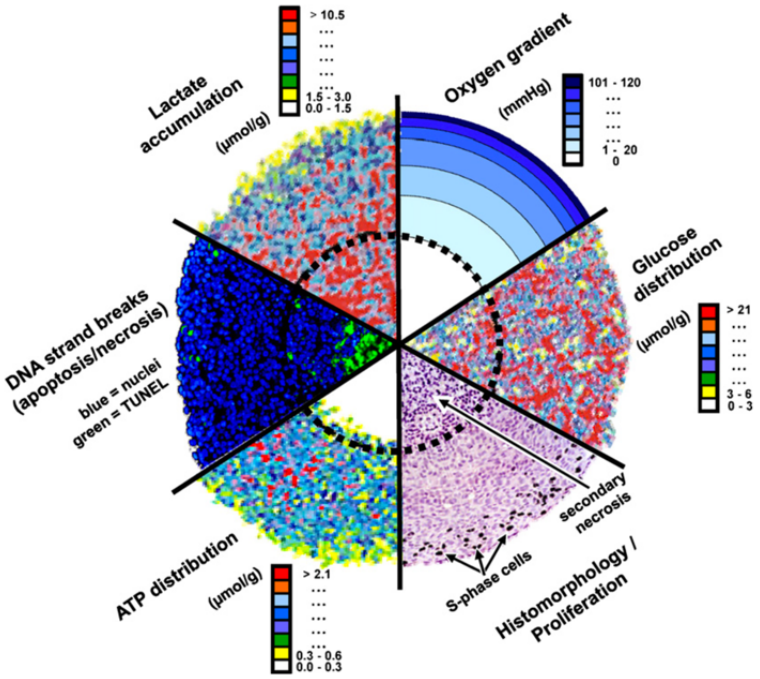


Figure 1 : Schéma des différents gradients d'état et d'espèces chimiques intervenant dans un agrégat multicellulaire. Extrait de Hirschhaeuser *et al* 2010.

Dans la même ligne, la morphologie « aplatie » d'une cellule adhérant à une surface 2D modifie l'expression génétique, sa perméabilité, et sa capacité de transport interne des molécules (Mroue and Bissell 2012). Au niveau de la prolifération, le taux de doublement à 2D est souvent plus élevé que les taux de division à 3D (Souza *et al* 2018, Eke *et al* 2016), eux-mêmes plus proches de ceux obtenus *in vivo* (Chignola *et al* 2000). Il est généralement accepté que cette différence est due au fait qu'à 2D, les cellules reçoivent toutes la même quantité de nutriments et d'oxygène, de par la topologie de la monocouche, et que les cellules mortes se détachant du substrat n'affectent pas la diffusion des nutriments à leurs voisines vivantes.

A contrario, les cellules cultivées en 3D ont un comportement dépendant de leur localisation spatiale car soumises à des gradients de nutriments, d'oxygène et de facteurs de croissance (Hirschhaeuser *et al* 2010, Sutherland 1988, voir **Figure 1**) : les cellules peuvent être en phase de prolifération, quiescentes, apoptotiques, hypoxiques ou nécrosées (Sutherland 1988).

Le contrôle de ces différentes phases est un point clé des traitements actuels en cancérologie.

1.2 Organoïdes et sphéroïdes

Il est tout d'abord important de définir correctement les objets que nous étudions, c'est-à-dire des agrégats multicellulaires de taille sub-millimétrique. Sous l'appellation « agrégat multicellulaire » sont regroupés les termes « organoïde » et « sphéroïde », qui sont parfois utilisés l'un pour l'autre abusivement.

Pour les organoïdes, c'est Mina Bissell qui, au cours des années 70-80, a joué le rôle de pionnière dans ce qu'elle avait humblement nommé « cultures cellulaires 3D ». Dans ses travaux, elle s'est beaucoup intéressée à la formation d'agrégats de cellules épithéliales de sein, qui s'auto-organisent et se différencient spontanément pour former des structures sécrétant des protéines du lait (Lo *et al* 2012, Aggeler *et al* 1988). Mais c'est Hans Clevers (Kretzschmar and Clevers 2016) qui a définitivement popularisé le terme d'organoïdes, qu'il définit comme des structures 3D cultivées *in vitro* issues de cellules souches pluripotentes (PSC) ou dérivées de tissus adipeux (ASC – adipose stem cells).

Les cellules souches ont la capacité de se différencier en cellules spécialisées d'un tissu spécifique, et d'une manière déterminée par leur environnement et les signaux protéiques qu'elles reçoivent (Czyz and Wobus 2001, Dawson *et al* 2008, Sanchez *et al* 2016). Elles sont classifiées en plusieurs types, selon le niveau de différenciation qu'elles peuvent réaliser(Kalra and Tomar n.d.). Par exemple, les cellules totipotentes peuvent se spécialiser en tout type cellulaire, les pluripotentes ont le même potentiel, exception faite des cellules des annexes embryonnaires, qui sont des tissus transitoires se formant au cours du développement d'un fœtus, et assurant des fonctions vitales de nutrition et de respiration. Les cellules souches multipotentes ne se différencient qu'en un panel limité de cellules, souvent de fonctions ou de localisation proches dans l'organisme, car elles sont déjà « engagées » dans un programme

tissulaire. Par exemple, les cellules souches multipotentes hématopoïétiques de la moelle sont à l'origine de toutes les cellules du sang. Enfin, les cellules souches unipotentes ne sont capables de se différencier qu'en un seul type de cellule. Au cours de ce travail de thèse, nous avons formé des organoïdes à partir de cellules souches unipotentes progénitrices d'adipocytes murins, lignée que nous détaillons à la section 2.1.3 .

Un organoïde, obtenu par différenciation d'un agrégat multicellulaire de cellules souches, pourra présenter une architecture identifiable et potentiellement des fonctionnalités s'approchant de celles d'un organe. Dans une revue récente, Mina Bissell étend la définition d'un organoïde aux agrégats de cellules issues de tissus épithéliaux ou dérivés d'embryons, ainsi qu'aux tissus prélevés chez le patient (Shamir and Ewald 2014, Simian and Bissell 2017). En effet, même au sein d'un tissu mature prélevé se trouvent des cellules souches avec un potentiel de différentiation, malgré la présence de cellules matures déjà spécialisées.

Les sphéroïdes, quant à eux, sont également des agrégats multicellulaires, mais sont issus de lignées de cellules différenciées et immortalisées. Ils ont été décrits pour la première fois au cours des années 70-80 (Sutherland *et al* 1970) par Robert Sutherland, qui pose les bases de leurs caractéristiques physiques (Sutherland *et al* 1970, Sutherland 1988), notamment leur structure interne (i.e. la disposition du cœur nécrotique et des couches quiescentes et proliférantes). Les sphéroïdes sont un bon modèle d'étude de lignées cellulaires spécifiques dans un environnement 3D. La plupart des cultures 3D étaient des sphéroïdes, car les lignées nécessitent moins de précautions de culture cellulaire que les cellules souches ou primaires, plus fragiles. Au cours de ce travail de thèse, nous avons aussi formé des sphéroïdes de cellules cancéreuses hépatiques humaines et de cellules cancéreuses de lymphomes humains (voir sections 2.1.1 et 2.1.2 .).

Il est aussi devenu de plus en plus courant de voir utilisé le terme de tumoroïde (Girard *et al* 2013, Vamvakidou *et al* 2007). En toute rigueur, il désigne des organoïdes de tumeurs issues de patients, mais il est parfois utilisé abusivement pour désigner des sphéroïdes composés de lignées immortalisées.

Pour faire face au défi sanitaire lié au cancer, de nombreux travaux de recherche pharmacologique et médicale proposent des chimiothérapies, qui nécessitent au préalable des essais précliniques sur des cellules *in vitro* (animales, puis humaines). Ces essais sont classiquement réalisés sur des cellules cultivées en 2D. Par la suite, on sélectionne les molécules et principes actifs les plus efficaces pour limiter ou stopper la progression des tumeurs et on effectue des tests animaux avant de passer aux essais cliniques sur des panels de patients. Toutefois, les résultats obtenus pour les essais en 2D et les essais animaux montrent rarement une bonne corrélation. En cause suggérée de manière unanime, l'organisation des cellules *in-vivo*, à 3D, qui ne correspond pas à celle réalisée artificiellement en culture cellulaire 2D. Depuis quelques années, une grande partie des efforts de la communauté scientifique en

oncologie vise à mimer la conformation 3D *in vivo* des cellules tumorales pour disposer de meilleurs modèles vis-à-vis des chimio- et radiothérapies.

1.3 Méthodes de fabrication

Plusieurs méthodes plus ou moins sophistiquées ont été développées pour former des agrégats multicellulaires. La Figure 2 donne un tableau comparatif des grandes familles de méthodes actuellement utilisées (Nath and Devi 2016).

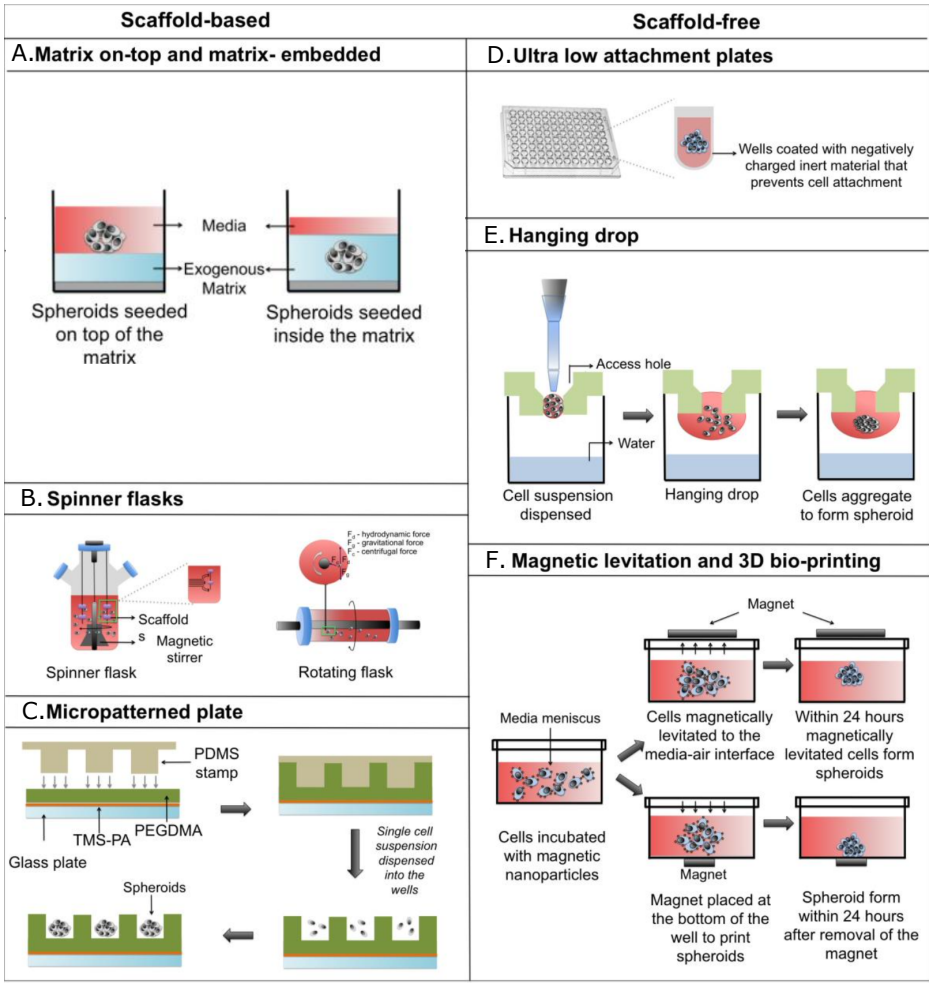


Figure 2 : Méthodes de fabrication d'agrégats cellulaires avec et sans structure d'appui. **A.** Dépôt de suspension cellulaire au-dessus d'une couche de gel/matrice. La force de gravité ensemence progressivement les cellules. **B.** Système de flasques de cultures en rotation favorisant l'agrégation spontanée des cellules. **C.** Plaque imprimée par un tampon de polymère permettant de placer la suspension cellulaire et un gel structuré dans des micropuits. **D.** Puits à faible potentiel d'adhérence pour les cellules, forçant leur agrégation. **E.** Méthode de la goutte pendante, plaçant les cellules au sein d'une gouttelette de milieu maintenue par capillarité. **F.** Utilisation de particules magnétiques afin de maintenir les cellules en lévitation et forcer leur agrégation. Adapté de Nath and Devi 2016.

On distingue les méthodes reposant sur l'utilisation ou non d'une structure d'appui, scaffold. Mais, dans la description détaillée ci-dessous, nous avons pris le parti de les classer sur la base de la distinction entre les méthodes classiques et celles, souvent plus récentes, reposant sur de la microfluidique ou de la microfabrication.

1.3.1 Méthodes conventionnelles

Croissance dans un gel de matrice

Un procédé classique de fabrication d'agrégats multicellulaires est l'ensemencement de cellules au sein de gels de polymères qui servent de support à la croissance cellulaire (Figure 2-A.). Ces gels peuvent être de diverse nature (artificielle ou biologique), et d'un maillage plus ou moins resserré (fixé par la concentration du gel). Surtout, ils servent à mimer l'environnement cellulaire *in vivo*. L'emploi de Matrigel, extrait de matrice extra-cellulaire (ECM), est très répandu. Ainsi, le groupe de Hans Clevers a réalisé des portions d'intestin (« mini-guts », Sato *et al* 2009), qui présentent les caractéristiques typiques de cet organe, à commencer par sa capacité de « renouvellement », et sa structure en « cryptes et villi ». Pour cela, une suspension de cellules souches Lgr5 dans du matrigel en cours de gélification a été réalisée. Même à partir d'une cellule unique, et à l'aide de protéines recombinantes et de facteurs de croissance, des organoïdes se structurent sous la forme d'un épithélium polarisé, se refermant sur un lumen. Ces derniers présentent une stabilité génétique et phénotypique comparable aux observations réalisées *in vivo.* En utilisant le même principe de fabrication, le groupe de Mina Bissell (Vidi *et al* 2012, Mroue and Bissell 2012, Lee *et al* 2007) a préparé des organoïdes de glande mammaire fonctionnels, reproduisant le comportement *in vivo* observé au cours de la lactation.

L'utilisation d'hydrogels comme matrice d'agrégation est principalement réservée à la formation d'organoïdes. En effet, les cellules souches qui les composent sont sujettes à l'*anoikis*, une forme de mort cellulaire programmée pour prévenir d'éventuels dommages du matériel génétique, et la propagation de mutations néfastes. Ce phénomène apparaît spontanément lors de l'absence de surface d'attachement pour les cellules souches. Les sphéroïdes, composés de lignées cellulaires immortalisées, peuvent être formés par des méthodes sans scaffold.

Méthode de la goutte pendante

En 1906, Roy Harrisson, souhaitant étudier le développement des fibres nerveuses, place un fragment de cordon nerveux d'embryon dans une goutte de lymphe déposée sur une lame de microscope. Par capillarité, lorsque l'on retourne l'ensemble ainsi formé, la goutte reste attachée, pendant et contenant le fragment de tissu. Cette méthode, connue sous le nom de

« goutte pendante » a été améliorée et automatisée au fil du temps, pour devenir une méthode de référence pour la formation de sphéroïdes (Tung *et al* 2011, Figure 2-E.).

Un des principaux avantages de cette méthode est sa capacité de contrôle de la quantité de cellules placée dans chaque goutte pendante. Néanmoins, le nombre d'agrégats formés est d'une unité par puits, ce qui limite la production d'échantillons, typiquement au nombre de puits d'une plaque (96 par exemple).

Puits à faible adhérence

Une autre méthode de formation d'agrégats cellulaires consiste à déposer, au fond de puits en « U » ou en « V » (traités de façon à limiter au maximum l'adhérence cellulaire à leur surface) une suspension de cellules. Par gravité, la sédimentation des cellules formera spontanément, à condition que les cellules expriment des molécules d'adhésion inter-cellulaire, des agrégats cellulaires quasi-sphériques, qui pourront, après plusieurs jours de culture, être utilisés en fonction des besoins de l'expérimentateur (i.e. imagerie, greffe, extraction du matériel génétique pour analyse). Comme pour la méthode de la goutte pendante, ceci nécessite l'utilisation de routines automatisées pour atteindre un taux de production limité par le nombre de puits.

Systèmes rotatoires

Il est également possible de placer la suspension cellulaire dans un système de culture en rotation (Rotary Cell Culture System, RCCS) qui permet de maintenir en suspension les cellules, en maximisant leur probabilité de contact et d'adhésion intercellulaire, ce qui mène à la formation d'agrégats. Cette méthode, bien qu'ancienne (Mitteregger *et al* 1999), a été utilisée plus récemment pour des expériences en microgravité (Mattei *et al* 2018) qui ont montré que l'architecture du réseau neuronal formé au cours de la croissance d'organoïdes neuronaux était différente de celle obtenue pour des organoïdes préparés dans des conditions de gravité standard.

1.3.2 Méthodes utilisant la microfabrication et la microfluidique

Plaques microtexturées

L'avancée technologique que représente la microfabrication a permis la réalisation de plaques impressionnées par des substrats d'adhérence variable, permettant de contraindre les cellules à croître dans des espaces géométriquement prédéfinis (Figure 2-C.). Par exemple, Mori *et al* 2008, ont réalisé plusieurs centaines de micropuits d'un diamètre de 300 µm et de 200 µm de profondeur dans une plaque de PMMA (poly(methylmethacrylate)), au fond

desquels une couche de 100 µm de diamètre de collagène est déposée, facilitant l'agrégation des cellules qui y sont ensuite ensemencées. La forme des puits a été aussi adaptée pour former des « cylindroïdes » (agrégats cylindriques), de cellules hépatiques de rat (HepG2).

Bio-impression et lévitation magnétique

La précision et la rapidité des imprimantes 3D ont connu une évolution spectaculaire ces dernières années, et il est désormais possible de trouver des instruments adaptés à la fabrication de structures texturées de cellules par dépôt programmé sur une surface. Les cellules sont au préalable mises en suspension dans un gel visqueux, formant une encre biologique (« bio-ink ») d'impression, qui sera ensuite déposée par une buse mobile. Des réalisations remarquables ont été rapportées, par exemple par le groupe de Jennifer Lewis dans la vascularisation de tissus (Kolesky *et al* 2014, Wu *et al* 2011).

Il est également possible de mélanger la suspension cellulaire à des microparticules magnétiques, qui permettent ensuite, à l'aide d'un aimant, de former des agrégats en lévitation, ou de forcer les cellules à s'agréger par application localisée d'un champ magnétique (Figure 2-F, Ino *et al* 2007, Souza *et al* 2010). Par exemple Souza *et al* ont montré que des cellules de glioblastomes humains cultivées en lévitation forment spontanément des sphéroïdes après 24h de culture et présentent de grandes similarités avec des tissus vivants dans leur expression protéique (Souza *et al* 2010).

Cas particulier : les technologies de capsules cellulaires

La totalité des protocoles de formation de sphéroïdes ou d'organoïdes détaillés ci-dessus est confrontée à la limite des capacités d'agrégation entre cellules, pour former spontanément des pseudo-sphères cellulaires. Aussi, pour le cas particulier des cellules non-adhérentes, notamment des cellules lymphatiques sur lesquelles nous reviendrons tout au cours de ce manuscrit, les méthodes précédentes ne sont pas applicables pour étudier l'impact du microenvironnement sur leur développement. L'idée pourrait être de les confiner dans un espace clos, maintenant entre elles une proximité ou une fréquence de contacts physiques qui augmenterait au fur et à mesure que les cellules prolifèrent. Il faut néanmoins que cet espace soit perméable aux nutriments et facteurs de croissance contenus dans le milieu de culture environnant. C'est sur la base de cette idée qu'a été développée la technologie des capsules cellulaires.

Notre équipe a développé un protocole d'encapsulation de cellules sur l'idée de méthodes de fabrication de perles liquides (Bremond *et al* 2010) à l'aide de buses microfluidiques (Alessandri *et al* 2013). Cette méthode est inspirée de la production des perles de saveurs réalisées en cuisine moléculaire. Un des matériaux les mieux adaptés à la fabrication de la coque des capsules est l'alginate, un polymère naturel extrait d'algues brunes, qui se gélifie au contact

de cations divalents, comme les ions calcium. Lorsqu'une gouttelette d'alginate chute dans un bain de calcium, on observe une réticulation spontanée du polymère, qui forme alors une coque sphérique (voir **Figure 3**-A.). Une des complications rencontrées est l'explosion ou la déformation de la coque lors de l'impact sur la surface du bain. Pour éviter ce problème, on dépose une faible quantité de tensioactif (quelques ppm) dans le bain, ce qui modifie les propriétés visco-élastiques de sa surface et permet à la goutte de pénétrer plus profondément, ce qui laisse le temps aux ions calcium de diffuser au travers la coque d'alginate et de la réticuler (Bremond *et al* 2010). De plus, en ajoutant du Sodium Dodécil Sulfate (SDS) à l'alginate, on augmente la rigidité de l'interface bain/coque, ce qui diminue l'effet des forces de cisaillement à l'impact.

Cet effet a été démontré à une échelle macroscopique (taille de perle ~ mm, Bremond *et al* 2010). Pour réaliser des capsules d'alginate submillimétriques contenant des cellules, on peut utiliser le même dispositif d'utiliser un dispositif de co-extrusion (buse microfluidique) mais il est nécessaire d'augmenter la vitesse d'écoulement des fluides, afin d'obtenir un jet d'un diamètre comparable à l'orifice de sortie de buse, et non pas un goutte-à-goutte. Ce jet qui est constitué de trois flux laminaires imbriqués les uns dans les autres se fragmente ensuite spontanément en microgouttelettes de diamètre similaire par instabilité de Plateau-Rayleigh. On aura donc un flux central de la suspension cellulaire en milieu de culture, un flux intermédiaire enveloppant ce premier flux constitué par une solution tampon (par exemple du sorbitol), et enfin un flux extérieur d'alginate (voir Figure 4).

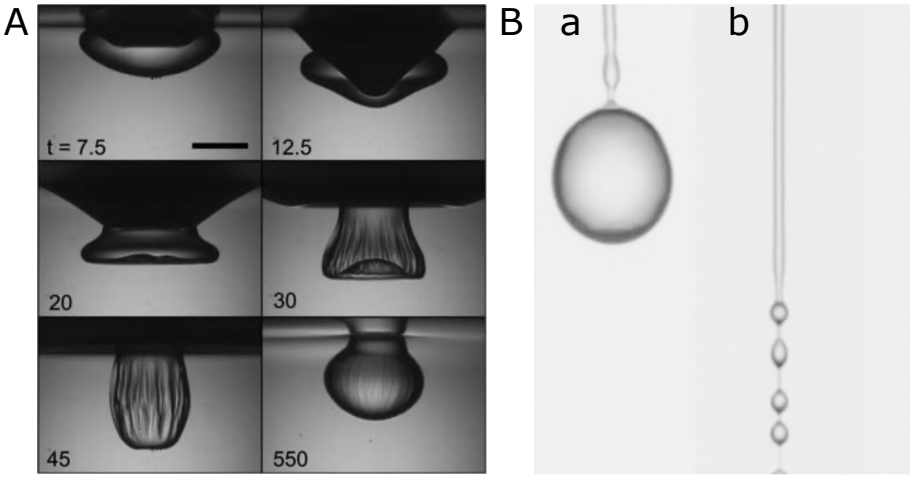


Figure 3 : Principe de formation de coques d'alginate. **A.** Images de la chute d'une gouttelette d'eau à couche externe d'alginate dans un bain de calcium couvert d'une fine couche de tensioactif. Temps en millisecondes après impact initial. Barre d'échelle : 2 mm. Extrait de Bremond *et al* 2010. **B.** Images extraites d'une vidéo de l'écoulement d'un jet composite en sortie de buse. **a.** Goutte-à-goutte (débit de 55 ml.h^{-1}). **b.** Fragmentation du jet par instabilité de Plateau-Rayleigh (débit de 100 ml.h^{-1}). Extrait de Alessandri *et al* 2013.

Les premiers prototypes de buses, réalisés en 2013, consistaient en plusieurs capillaires cylindriques ($\emptyset \approx 200\ \mu m$) en borosilicate, imbriqués et collés, ce qui nécessitait un grand

savoir-faire expérimental (Alessandri *et al* 2013, Alessandri 2013). En utilisant ensuite l'impression 3D nous avons pu dessiner les buses à l'aide d'un outil de CAO (Conception Assistée par Ordinateur, SolidWorks) afin de les fabriquer en résine plastique (Alessandri *et al* 2016). S'agissant d'un dispositif de co-extrusion, le diamètre de sortie de cette buse fixe le diamètre moyen des capsules produites, et l'impression 3D permet d'atteindre des dimensions de l'ordre de 100 µm, ce qui correspond à la gamme de taille souhaitée.

Profitant de l'expertise présente dans le groupe d'accueil, nous avons donc exclusivement choisi la technologie des capsules cellulaires pour générer les organoïdes/sphéroïdes que nous avons étudiés au cours de ce travail de thèse. Certains développements techniques ont été apportés au système initial. Nous avons notamment ajouté un champ électrique en sortie de buse, qui disperse les capsules en un cône de chute, prévenant leur coalescence dans l'air, ce qui a permis d'augmenter la monodispersité des capsules. Le fonctionnement détaillé et le protocole d'utilisation de notre technologie de capsules cellulaires seront détaillés à la section 2.2 .

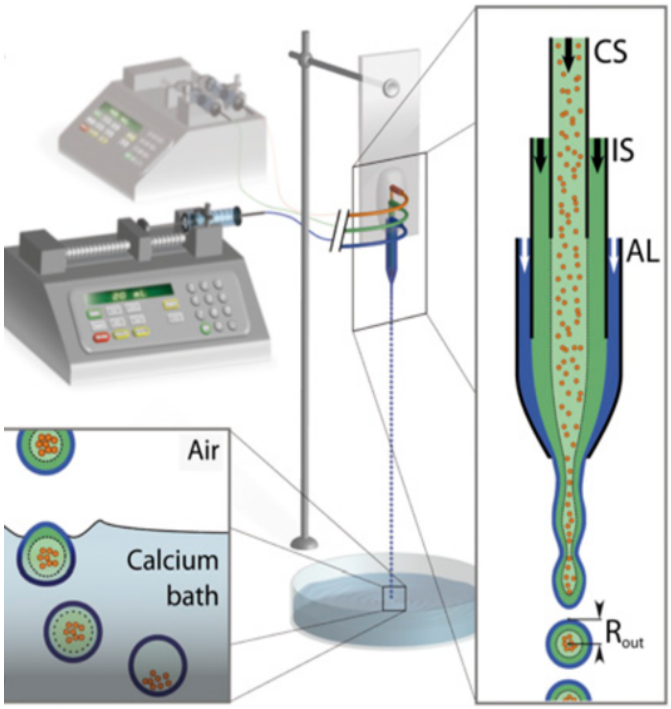


Figure 4 : Schéma conceptuel de l'encapsulation cellulaire à trois flux dans l'air.

CS : Suspension cellulaire.

IS : Solution intermédiaire.

AL : Solution d'alginate.

Extrait de Alessandri *et al* 2013.

D'autres variantes de la technologie des capsules cellulaires ont été développées, notamment dans l'équipe de Mingling Ma au MIT (Ma *et al* 2013), qui fut la première à ajouter un champ électrique directement sur la buse, afin de provoquer artificiellement l'instabilité de Plateau-Rayleigh juste au-dessous de l'orifice de sortie, ce qui permet de réduire l'espace entre le bain et la buse (typiquement, 1.8 cm). Ceci, à l'instar du cône de dispersion de notre technique, permet de prévenir la coalescence des capsules qui peut avoir lieu dans une éjection en train de gouttes.

Les résultats obtenus ont montré une survie et une prolifération des cellules normales. Ce groupe a réalisé avec succès la congélation et décongélation de capsules cellulaires après encapsulation. En effet, les méthodes de congélation classiques d'organoïdes impliquent l'utilisation d'un agent pénétrant cryoprotecteur (*i.e.* Dimethyl Sulfoxide – DMSO) qui évite la formation de glace intracellulaire, première cause de mort pendant la congélation et la décongélation. L'ajout de cet agent lors de la congélation des capsules a montré une meilleure protection des cellules (80% de cellules viables après décongélation), contrairement à la congélation d'organoïdes décapsulés (20% de cellules viables, Lu *et al* 2017). Cette efficacité de congélation permet de travailler progressivement sur des échantillons issus de la même expérience, et d'exploiter la caractéristique de haut débit de la technologie (>10000 capsules.min^{-1}).

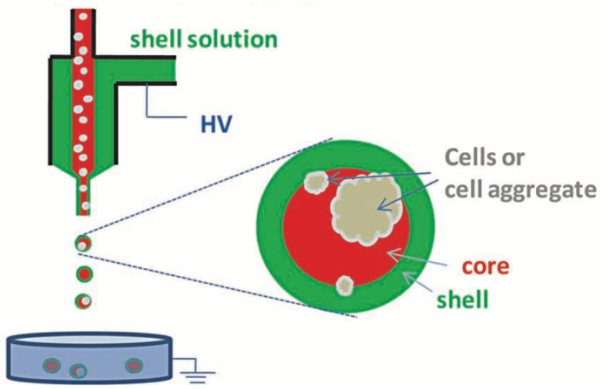


Figure 5 : Schéma de fonctionnement d'une variante du dispositif d'encapsulation avec électrodispersion, proposé par l'équipe de Mingling Ma. Extrait de Lu *et al* 2015.

Au lieu d'une buse tri-dimensionnelle, le groupe de Xiaoming He a utilisé un circuit de microfluidique classique en polydimethilsiloxane (PDMS) (Agarwal *et al* 2013), qui reproduit la coimbrication des flux dans le plan horizontal. Il s'agit d'une adaptation de la microfluidique digitale (voir Figure 6), qui utilise un flux d'huile minérale complémentée avec du chlorure de calcium pour réticuler la coque d'alginate, mais aussi pour convoyer et empêcher la coalescence des capsules.

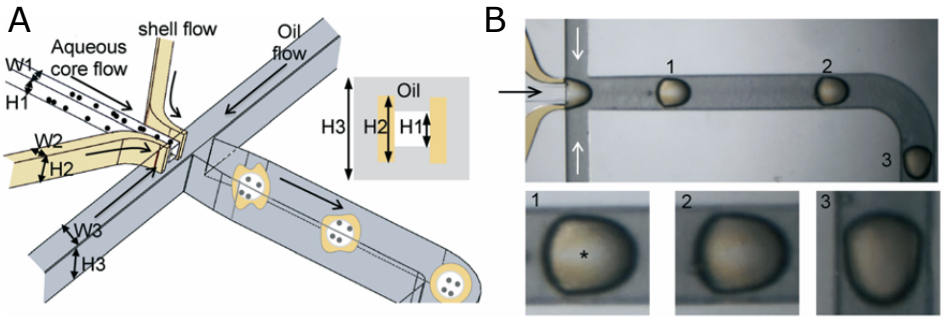


Figure 6 : Présentation d'un dispositif en PDMS de génération de capsules cellulaires. **A.** Schéma du design microfluidique : alginate en jaune (shell flow), huile minérale chargée en calcium en gris (oil flow). Wi, Hi : largeur

et hauteur de canal, respectivement. **B.** Photographies montrant l'enveloppement progressif du fluide central par le fluide de coquille, marqué à l'aide de dextran jaune. Extrait de Agarwal *et al* 2013.

Cette méthode s'affranchit donc d'un bain de calcium et d'un contact avec l'air, ce qui permet de préserver facilement la stérilité des échantillons, et aussi d'uniformiser la taille des gouttelettes. La Figure 6 montre l'arrangement spécifique des micro-canaux qui génère l'écoulement du triple flux imbriqué. En effet, les canaux d'injection au point de convergence ne possèdent pas tous la même hauteur, ce qui permet d'obtenir, dans le canal menant à la sortie du circuit, des gouttelettes contenant les cellules à encapsuler enveloppées de tous les côtés par la coque d'alginate. Les échantillons sont alors séparés de l'huile par centrifugation, puis placés dans un milieu de culture adapté.

Par cette technique, on obtient une grande monodispersité et sphéricité des capsules, favorable pour des expériences de criblage à haut-débit. Tout comme le groupe de Mingling Ma, Xiaoming He et son équipe sont parvenus à congeler et réutiliser leurs capsules cellulaires (Zhao *et al* 2017). Mais, l'étape de séparation des capsules de l'huile minérale est cruciale et peut impacter la viabilité cellulaire. Nous n'avons pas eu recours à la congélation des échantillons, mais cela est maintenant réalisé dans l'équipe d'accueil.

L'avantage des méthodes d'encapsulation dans l'air par rapport aux encapsulations en huile est le fait de pouvoir augmenter les débits des différents flux (30 ml/h dans l'air, typiquement) au-delà de ce qui est supportable pour un circuit microfluidique réalisé en PDMS classique (220 µl/h), ce qui permet la production d'un plus grand nombre d'échantillons dans un délai court. De plus l'utilisation d'huile ajoute une étape d'extraction au protocole.

Toutes les méthodes de fabrication d'agrégats multicellulaires présentées précédemment possèdent des avantages et des inconvénients qui justifient leur emploi selon l'expérience à réaliser. Ces caractéristiques sont résumées dans le

Tableau 1.

Technique	Spécificités	Faiblesses
Enfouissement en hydrogel	Haut taux de production : ~10/mm^2 (soit 10000 par boîte de Petri)[a] Agrégats auto-assemblés après croissance à partir d'une cellule (éventuellement)	Non manipulable Individualisation des organoïdes non contrôlée
Goutte pendante	Taille d'agrégats uniforme (contrôlée par densité cellulaire initiale)	Faible taux de production (96 par plaque) Peu automatisable

[a] Estimé à partir d'images caractéristiques extraites de Saengwimol *et al* 2018 et Alinezhad *et al* 2016.

Puits à faible adhérence	Taille d'agrégats uniforme (contrôlée par les dimensions du puits) : pour une plaque 96 puits standard, volume compris entre 8.10^7 et 10.10^7 µm^3.[b]	Faible taux de production (96 par plaque)
Formation en suspension (RCCS)	Faibles forces de cisaillement (pas ou peu néfastes pour les cellules)(Mitteregger *et al* 1999) Taux de production contrôlable par les dimensions du réacteur et la densité cellulaire	Non manipulable Individualisation des agrégats non-contrôlée Taille peu uniforme(Mattei *et al* 2018)
Surface planes texturées	Taille d'agrégats contrôlée par les dimensions des puits (typiquement entre 130 et 160 µm de diamètre)[c]	Taux de production moyen (compris entre 500 et 1000 spécimens par plaque)
Bio-impression	Contrôle sur la géométrie défini par l'utilisateur	Coût (5k-200k€) Prise en main complexe
Encapsulation en air	Très haut taux de production (5000 spécimens.s^{-1})[d] Bonne sphéricité (0.8-1) pour 45% de la population, mais 0.4-0.8 pour 55%. Voir Figure S1(Alessandri *et al* 2013).	Système expérimental complexe à utiliser et à développer Distribution de rayon équivalent centrée à 150 µm, σ = 100 µm.
Encapsulation en huile	Haut taux de production (2000 spécimens.min^{-1}) Capsules très sphériques (0.9-1) et monodisperses(Agarwal *et al* 2013)	Système expérimental complexe à utiliser et à développer Potentielle toxicité de l'huile Difficulté à séparer les échantillons de l'huile

Tableau 1 : Synthèse des forces et faiblesses pour chaque technique de formation d'agrégats multicellulaires par adhésion de cellules. Fond vert : méthodes conventionnelles. Fond bleu : méthodes par microfabrication ou microfluidique.

[b] Voir Vinci *et al* 2012.
[c] Voir Mori *et al* 2008.
[d] Voir Alessandri *et al* 2013.

1.4 Imagerie des sphéroïdes et organoïdes

Une fois les sphéroïdes ou organoïdes préparés, on souhaite observer l'organisation interne des cellules. Plusieurs familles de microscopie sont disponibles pour les imager. Une difficulté est souvent la pénétration de la lumière dans les tissus biologiques. Une stratégie consiste à faire des coupes et d'imager les cellules en surface de chaque tranche avant reconstruction. Une autre stratégie consiste à développer des méthodes dédiées pour réaliser du sectionnement optique.

1.4.1 Histologie

L'histologie est une méthode classique utilisée pour imager les tissus. Cela consiste à marquer avec des colorants (hématoxyline pour les noyaux et éosine pour le cytoplasme) des tranches fines issues de tissus fixés et enveloppés d'une couche de paraffine et de les imager en microscopie optique (voir Figure 7). Avec cette technique impliquant la fixation des tissus, aucune étude dynamique (live) n'est possible et la découpe entraîne parfois des altérations de la structure 3D.

Figure 7 : Image histologique d'un organoïde de cellules souches cancéreuses d'intestin humain. Marquage à l'hématoxyline (noyaux cellulaires) et l'éosine (cytoplasme). Barre d'échelle : 50 µm. Fujii *et al* 2018.

1.4.2 Marquages fluorescents et sectionnement optique

La microscopie de fluorescence est couramment employée pour imager des cellules. Elle repose sur l'utilisation d'anticorps fluorescents quand il s'agit de tissus fixés, ou sur la transfection par des plasmides codants pour des protéines fluorescentes quand on veut visualiser des cellules vivantes ou des compartiments sub-cellulaires en conditions non-fixées. Illuminés à une longueur d'onde d'excitation, ces sondes fluorescentes réémettent de la lumière à une longueur d'onde supérieure (plus basse énergie). Outre les molécules organiques attachées à des protéines ou directement réparties dans l'échantillon lorsqu'elles ont une certaine spécificité (par exemple des membranes plasmiques ou du noyau), les quantum dots et les nanotubes de carbone (Tan *et al* 2011), souvent plus volumineux peuvent aussi être utilisés en

raison de leur excellent photo-résistance, et malgré leur caractère plus invasif, voire cytotoxique (Hardman 2006, Holzinger *et al* 2014).

Pour imager les cellules marquées en fluorescence en profondeur, on utilise des techniques de sectionnement optique. Tous les plans imagés, une fois empilés, permettent de reconstruire une image 3D de l'échantillon, ce qui demande de grandes ressources informatiques.

Une des méthodes de microscopie fluorescente par sectionnement optique les plus anciennes (Minsky 1955, 1988) et les plus courantes est la microscopie confocale (Figure 8-A.). Cette technique repose sur le filtrage spatial du signal parasite provenant d'autres parties de l'échantillon ou du faisceau d'illumination à l'aide d'un diaphragme placé en amont du détecteur, ce qui permet d'imager de façon résolue à des profondeurs maximales d'environ 50-100 µm, en balayant point par point un faisceau laser dans le plan focal et le long de l'axe optique. L'intensité lumineuse collectée étant plus faible que pour un microscope classique, on utilise un photomultiplicateur comme détecteur pour obtenir un signal exploitable.

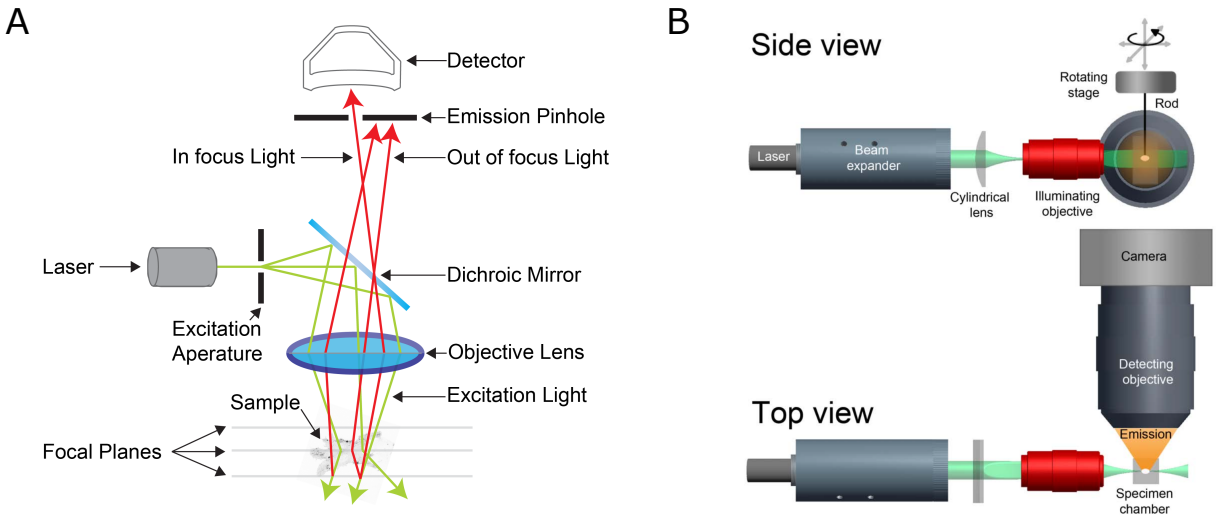


Figure 8 : Principes de fonctionnement des microscopies confocale et à feuille de lumière. **A.** Diagramme d'un microscope à tête confocale. La source d'excitation laser est focalisée sur un point de l'échantillon, puis la lumière réémise par les fluorophores qu'il contient est débarrassée des signaux parasites au moyen d'un diaphragme. **B.** Diagramme d'un microscope à feuille de lumière (LSFM). Une lentille cylindrique génère une nappe lumineuse qui vient exciter les molécules fluorescentes de l'échantillon par le côté, pour plusieurs plans focaux. L'émission de fluorescence est ensuite collectée sur la caméra sans scan. Extrait de Santi 2011.

Pour améliorer la profondeur maximale d'imagerie, on peut avoir recours à des microscopes confocaux multi-photons, qui, grâce à la longueur d'onde proche infrarouge de leur source d'excitation, permettent aux molécules fluorescentes d'absorber plusieurs photons d'excitation simultanément, et ainsi d'accéder à des images mieux résolues. De plus, une illumination infrarouge cause moins de dommages à l'échantillon dans le cas de cellules vivantes.

La microscopie à feuille de lumière (Light Sheet based Fluorescence Microscopy, LSFM) procède à l'illumination latérale de l'échantillon par une nappe de lumière, la fluorescence générée par cette excitation étant ensuite collectée orthogonalement (Figure 8-B.). L'avantage de la LSFM est de pouvoir recueillir la totalité du signal de fluorescence d'un plan illuminé en une seule illumination d'excitation, ce qui limite la photo-toxicité de la source d'illumination sur l'échantillon. Les profondeurs maximales qu'on peut atteindre par LSFM sont comprises entre 100 et 200 µm, dans le cas d'échantillons assez transparents, mais peuvent être réduites pour des objets denses et compacts comme des cellules , et à plus forte raison les cellules nécrotiques au cœur des sphéroïdes. Ces techniques de microscopie permettent d'imager des échantillons d'une épaisseur de l'ordre de 100 µm, mais se heurtent à plusieurs problèmes : i) les sondes fluorescentes, notamment les anticorps, ne pénètrent pas toujours en profondeur l'agrégat, à cause de leur taille ii) la lumière émise par ces sondes est atténuée par l'épaisseur de matière à traverser pour parvenir au système de détection. On note ici que l'atténuation de lumière par l'échantillon est un phénomène non négligeable valable pour tous les types de tissus biologiques, mais qui pourrait être exploité comme un procédé de mesure à part entière, et non pas comme un obstacle à surmonter. C'est ce que nous avons fait dans le cadre de mon travail de thèse. Néanmoins, de manière à s'affranchir de ce problème, les microscopistes ont développé des procédés chimiques dits de « transparisation », qui réduisent les capacités de réfraction et d'absorption des cellules (Silvestri *et al* 2016). Concrètement, la constitution en lipides et protéines des cellules s'apparente à une multiplicité d'objets réfractants, et les différences d'indice entre chaque élément est la cause de la déviation des rayons lumineux traversant des tissus épais. Afin de réduire cette différence, deux possibilités s'offrent à l'expérimentateur : i) remplacer l'eau contenue dans les cellules par des solutions à plus fort indice, et/ou ii) modifier l'indice associé aux cellules en enlevant par exemple quelques composants (comme les lipides, Hama *et al* 2011) ou en modifiant les propriétés optiques de ces derniers (changement d'états des protéines, Chung *et al* 2013). À ce jour, on décompte plus d'une vingtaine de protocoles différents ayant tous des usages spécifiques (voir Figure 9 et Richardson and Lichtman 2015).).

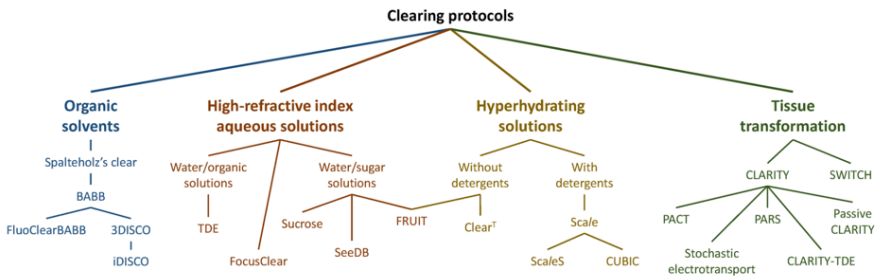


Figure 9 : Arbre de filiation des différents protocoles de transparisation de tissus épais. Librement adapté de Silvestri et al 2016.

1.4.3 Méthodes d'imagerie sans marquage

Il existe aussi des méthodes de microscopie sans marquage, *a priori* moins invasives et phototoxiques puisqu'elles n'utilisent pas de sondes fluorescentes extrinsèques ou intrinsèques. Deux d'entre elles sont l'imagerie de phase et l'OCT (Optical Coherence Tomography). Les microscopes à contraste de phase utilisent les décalages de phase des rayons lumineux générés lors de la traversée d'un échantillon et les convertissent en fluctuations d'intensité dans le plan image (voir **Figure 10**-A et Bon *et al* 2009). Pour l'OCT, il s'agit d'exploiter le phénomène d'interférences entre deux rayons lumineux de phase différente, ce qui permet d'imager à des profondeurs allant jusqu'à 1 mm (voir **Figure 10**-B). Cette technique a notamment permis d'observer des agrégats multicellulaires tumoraux de glioblastomes, et d'identifier les zones nécrosées à l'intérieur des échantillons (Huang *et al* 2017, **Figure 11**-E.). Néanmoins, la résolution de l'OCT est moindre que pour des microscopes classiques (environ 1 µm).

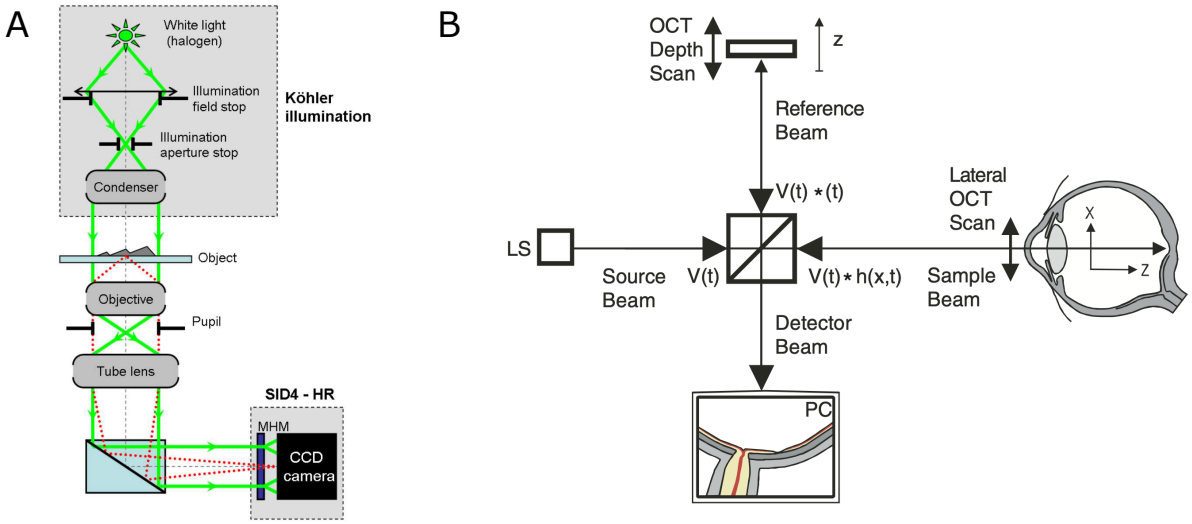


Figure 10 : Principe de fonctionnement de microscopies à phase quantitative et OCT. **A.** Microscope à phase quantitative. Le gradient de phase généré par l'interaction de la source lumineuse avec l'échantillon est collecté par une caméra CCD. Extrait de Bon *et al* 2009. **B.** Système OCT. La variation de position selon l'axe z du miroir de référence permet un scan en profondeur de l'échantillon. La variation de position selon les axes x et y de l'échantillon permet un scan latéral. Extrait de Fercher *et al* 2003.

L'OCT permet également la mesure du coefficient d'atténuation des tissus imagés. En effet, le signal mesuré peut être interprété comme une fraction de la lumière atténuée par l'échantillon, et sa forme théorique contient le coefficient d'atténuation dans son expression (Chang and Bowden 2019). Une autre méthode d'estimation du coefficient d'atténuation par OCT est de comparer l'intensité mesurée pixel à pixel, le long de l'axe de profondeur de l'échantillon (Yang *et al* 2019). Par exemple, le groupe de Peng Li à l'Université de Zhejiang (Chine) a mis en évidence des variations du coefficient d'atténuation au sein de cerveaux de

rats, observés *in vivo* pendant 3 semaines. Les valeurs obtenues varient entre 4 et 22 cm^{-1} selon les conditions expérimentales et les zones du tissu observées (Yang *et al* 2019).

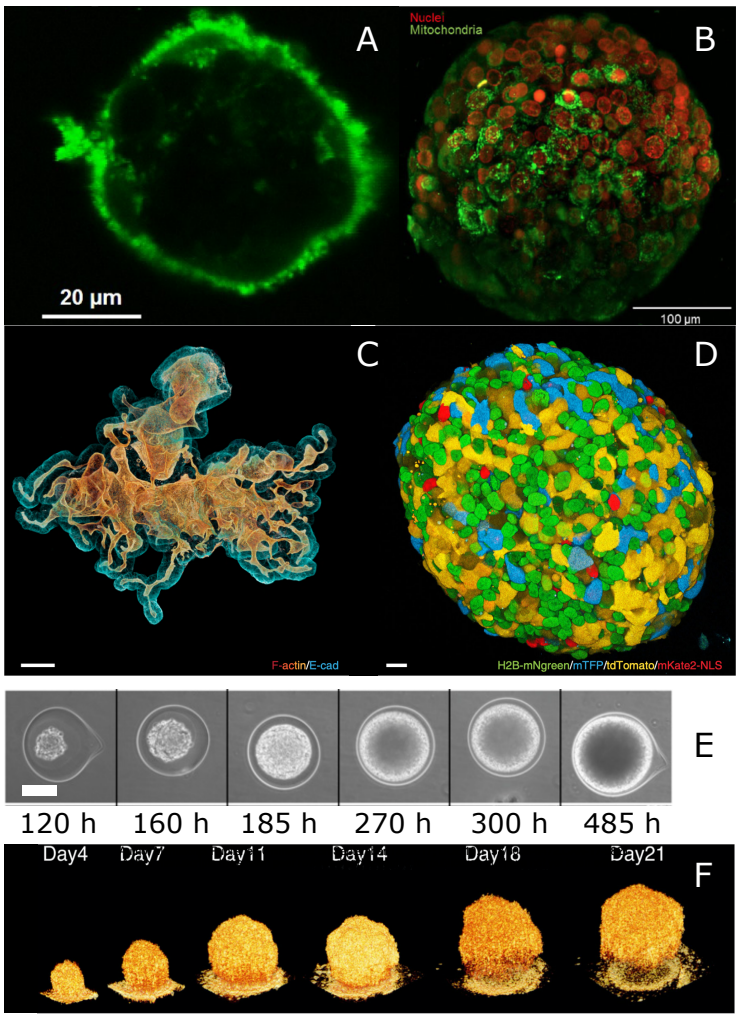


Figure 11 : Galerie d'images d'organoïdes et de sphéroïdes obtenues par différentes technologies d'imagerie. **A.** Microscopie confocale classique de sphéroïdes tumoraux de cellules HeLa, marquées par CPM (marqueur péri-nucléaire). Profondeur : 20 µm. Extrait de Mohapatra *et al* 2016. **B.** Reconstruction 3D d'un sphéroïde tumoral de cellules de glande mammaire obtenue par microscopie à feuille de lumière. Extrait de Pampaloni *et al* 2013. **C.** Organoïde tumoral de sein, reconstruit par microscopie confocale classique après transparisation fructose-glycérol. Barre d'échelle : 40 µm. Extrait de Dekkers *et al* 2019. **D.** Organoïde tumoral de sein en structure « confetti », reconstruit par microscopie confocale classique après transparisation fructose-glycérol. Barre d'échelle : 10 µm. Extrait de Dekkers *et al* 2019. **E.** Images par microscopie à contraste de phase de la croissance de sphéroïdes de cellules CT26 encapsulés, à intervalles de temps réguliers après encapsulation. Barre d'échelle : 50 µm. Extrait de Alessandri *et al* 2013. **F.** Suivi de croissance de sphéroïdes tumoraux de glioblastomes par tomographie par cohérence optique. Extrait de Huang *et al* 2017.

.

Évidemment, la microscopie en champ clair (Bright Field, BF) peut aussi être classée dans les types de microscopie sans marquage. Elle permet de réaliser des images simples et rapides des sphéroïdes, mais ne fournit pas d'information en profondeur dans l'agrégat. L'imagerie BF est maintenant plutôt utilisée pour obtenir une vue grand champ d'une population d'agrégats.

Nous l'utiliserons ainsi, combinée à une analyse d'images rudimentaire pour mesurer le diamètre moyen des agrégats. Dans la suite de ce travail, cet instrument sera l'unique dispositif de microscopie que nous utiliserons, afin de comparer nos résultats expérimentaux. Le reste des expériences sera effectué à l'aide de techniques optiques sans image.

1.5 Technologies d'analyse à haut-débit

Toutes les techniques d'imagerie répertoriées ci-dessus sont particulièrement bien adaptées pour étudier des objets (cellules, agrégats multicellulaires) individuels ou en petit nombre, et demandant d'autant plus de temps d'acquisition que la résolution spatiale désirée est élevée. A l'inverse, si l'on accepte d'analyser sans « voir », c'est-à-dire sans faire d'image, on imagine bien qu'on puisse effectuer des analyses à haut débit, ce qui est nécessaire par exemple dans l'industrie pharmaceutique pour des tests de criblage d'espèces actives, ou pour les laboratoires de recherche fondamentale afin d'avoir une meilleure statistique de mesures. Des méthodes d'analyse basées sur l'interaction lumière-matière, exploitant le signal de lumière diffusée, transmise ou absorbée par des cellules uniques (Banoth *et al* 2014) ou des agrégats multicellulaires (Freyer and Sutherland 1980, Mourant *et al* 2002) ont déjà été développées. D'une manière générale, on place les dispositifs rassemblant des caractéristiques haut-débit à l'aide de systèmes optiques et une analyse sans image par des moyens optique dans un nouveau domaine scientifique : l'optofluidique.

1.5.1 Cytométrie en flux

La lumière, lors de son interaction avec une cellule par exemple, est diffusée, transmise ou absorbée. Les cytomètres en flux communément employés par les biologistes pour mesurer et/ou trier des populations cellulaires utilisent les données de diffusion de la lumière et les combinent à des mesures de fluorescence (voir Figure 12).

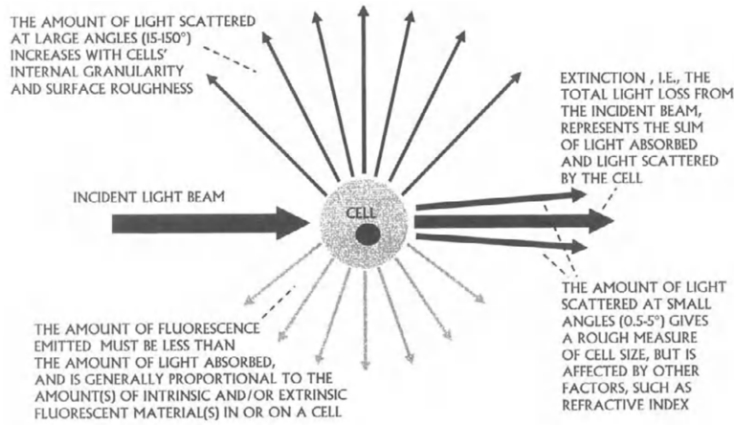


Figure 12 : Vue schématique de l'interaction de rayons lumineux et d'une cellule. Extrait de Shapiro 1940, 2003.

L'analyse de l'intensité des rayons lumineux diffusés dans une certaine direction autour de l'échantillon permet alors d'estimer plusieurs paramètres. Sa taille peut être obtenue en analysant l'intensité de lumière diffusée entre typiquement 0.5° et 5° (Forward Scattered Light), car aux petits angles la diffusion est principalement générée par l'interface milieu/cellule donc

par sa forme globale. Cette analyse, transposée aux sphéroïdes, a fait l'objet d'un travail de thèse récent au sein du Laboratoire Interdisciplinaire de Physique de l'Université Grenoble Alpes (Brunel 2018). Ces travaux exploitent la diffusion de la lumière par des agrégats multicellulaires pour en extraire la distance moyenne intercellulaire et la vitesse moyenne des cellules.

La complexité ou granularité d'une cellule est obtenue en analysant l'intensité lumineuse diffusée aux grands angles (entre 15° et 150°, Side Scattered Light), car les rayons lumineux ont une probabilité de déviation croissante selon la quantité d'éléments de taille proche de leur longueur d'onde qu'ils rencontrent. Un objet « rugueux » diffusera beaucoup la lumière aux grands angles. Aux mesures de taille et de complexité on ajoute l'analyse de l'intensité de fluorescence des cellules préalablement marquées, qui permet de quantifier l'expression d'une molécule d'intérêt au sein de la population.

Ces trois mesures permettent de différencier en temps réel les cellules entre elles, et sont souvent utilisées comme critère discriminant pour trier les objets, via l'ajout un système de séparation en aval du cytomètre, et dont les principes de fonctionnement seront détaillés à la section 1.5.2 . La combinaison d'un cytomètre et d'un système de tri est généralement dénommée « cell sorter » ou FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) (voir Figure 13).

Une réalisation d'un FACS pour sphéroïdes multicellulaires a été proposée par Freyer (Freyer *et al* 1987). En adaptant un système classique aux dimensions des sphéroïdes (augmentation du diamètre de buse, modification de la fréquence de formation de gouttelettes), une analyse d'objets de diamètre compris entre 41 et 96 µm par diffusion et autofluorescence a été réalisée, en utilisant un laser de longueur d'onde 488 nm. À notre connaissance, ce travail est le seul montrant la faisabilité d'un tri de sphéroïdes en utilisant un cytomètre classique.

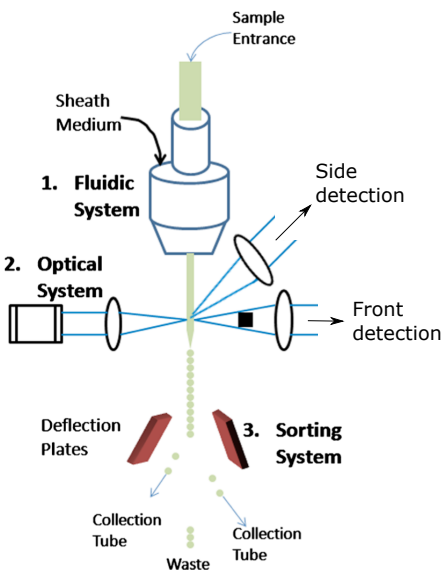


Figure 13 : Schéma de fonctionnement d'un cell sorter. **1.** La suspension cellulaire est injectée au moyen d'un système fluidique qui aligne les cellules et les écoule une à une dans un canal transparent. Un système piézo-électrique provoque la formation de gouttelettes dans le flux, contenant chacune un échantillon. **2.** Un système optique illumine chaque gouttelette pendant son passage, et recueille la lumière transmise et réfractée sous un certain angle, ainsi que l'intensité de fluorescence des cellules le cas échéant. De plus, une charge est conférée aux gouttelettes d'intérêt. **3.** Basé sur les mesures réalisées en temps réel à l'aide de la partie optique, un système de tri par champ électrique (deflection plates) collecte ou jette les gouttelettes chargées selon des critères définis par l'utilisateur Extrait de Cho *et al* 2010.

De nos jours, le prix des cytomètres en flux (50-500 k€) implique que leur utilisation soit commune à plusieurs groupes de recherche, au sein de plateformes de services dédiées. Cette particularité empêche leur modification à des fins spécifiques, notamment le tri de sphéroïdes. Les références les moins chères qui pourraient être acquises par une équipe sont souvent de petits appareils compacts difficilement adaptables.

1.5.2 Optofluidique

Alors qu'un cytomètre en flux est un appareil « boîte noire » coûteux, il est également possible, pour des applications plus spécifiques, de tirer profit de la « soft lithography », peu coûteuse, pour réaliser des cytomètres sur puce. Ces derniers, alliant circuits microfluidiques et dispositifs optiques souvent miniaturisés, sont un bon exemple de système optofluidique. Pour les prototyper facilement, dans le but d'applications non-industrielles, l'emploi de la microfluidique classique en polydiméthylsiloxane (PDMS) est préconisé. L'intérêt du PDMS dans la réalisation de ces puces est sa grande transparence pour des longueurs d'onde allant de 240 à 1100 nm, avec un coefficient d'atténuation inférieur à 10^{-10} cm^{-1}. La quasi absence de biréfringence et l'indice de réfraction (1,4) de ce matériau permettent donc de l'utiliser comme support optique sans traitement additionnel (Whitesides and Tang 2006).

Microfabrication

La microfluidique a connu un essor conséquent lors de la découverte de matériaux possédant une forte résistance mécanique à la pression des flux dans les canaux, une relative flexibilité, et des capacités d'hydrophobisation facilitant les écoulements. C'est le cas du PDMS, qui permet le prototypage sous la forme de moulages de nombreuses configurations de circuit (Figure 14).

D'un protocole d'utilisation simple et quasi-culinaire, ce matériau est un polymère qui, mélangé à un agent curateur, puis chauffé, se rigidifie pour prendre la forme du moule dans lequel il a été au préalable placé.

La fabrication des moules repose initialement sur la photolithographie, une technique très fonctionnelle basée sur la projection (par une source UV) d'un motif sur une couche de résine photosensible (Figure 14).

Comme la résolution spatiale du moule dans lequel un circuit microfluidique est produit définit la fidélité des détails qui composent les canaux, la photolitographie est de nos jours concurrencée par des technologies liées à l'impression 3D (voir section 1.6). Elle n'en reste pas moins toujours très populaire, et son coût et sa complexité d'utilisation ont grandement diminué.

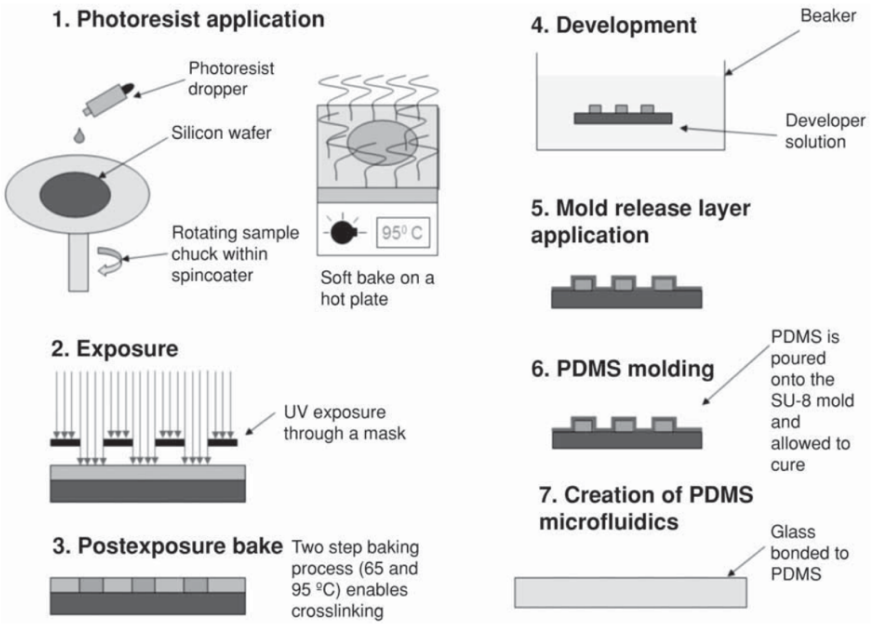


Figure 14 : Protocole de réalisation de circuits microfluidiques par photolithographie, sur résine SU-8. **1.** Application de résine SU-8 sur une plaque de silicone tournante, afin d'obtenir une épaisseur de résine constante en tout point de la surface. **2.** Illumination par UV de la résine au travers d'un masque définissant la structure des canaux, interagissant avec les zones à ne pas retirer. **3.** Étape de recuit du système, permettant à la résine non exposée aux UV de se rigidifier. **4.** Retrait des parties non-illuminées par développement chimique. **5.** Application d'une couche de matière hydrophobe facilitant le démoulage des circuits. **6.** Moulage du poly(dimethilsiloxane). **7.** Démoulage et finalisation du circuit. Extrait de Zaouk *et al* 2005.

Interrogation optique

Les avancées dans la miniaturisation des fibres optiques ont permis de les insérer directement dans les circuits de microfluidique, latéralement aux canaux, afin de s'en servir de guide pour les faisceaux incidents. De plus, elles peuvent être utilisées pour collecter les rayons lumineux ayant interagi avec les échantillons, et les transmettre directement au détecteur (Kuswandi *et al* 2007). Néanmoins, l'alignement des fibres est crucial, et nécessite de calculer leur position exacte dans le circuit pour obtenir un faisceau d'interrogation adéquat. On ajoutera également que le système expérimental est alors très sensible aux vibrations et chocs externes, qui peuvent modifier l'alignement interne des fibres dans le circuit.

Le PDMS pouvant être moulé dans de nombreuses configurations géométriques, il est par exemple possible de réaliser une micro lentille courbée sur la face interne du canal, qui permettra la focalisation des rayons lumineux dans la zone d'intérêt (Seo and Lee 2004, Camou *et al* 2003). Mais la résolution spatiale d'une telle lentille est dépendante de la qualité du moule de production, et ne pourra sans doute jamais atteindre les performances optiques d'une lentille classique en verre.

Toutes ces adaptations optiques « on-chip », bien qu'adéquates dans des cas spécifiques, présentent des particularités qu'il n'est pas aisé de maîtriser aux premières étapes du prototypage d'un instrument. C'est pourquoi nous avons opté pour une approche plus classique dans la focalisation de nos sources lumineuses, via des lentilles de borosilicate standardisées, placées de part et d'autre de notre circuit microfluidique.

Cytomètre en flux sur chip

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous intéressons particulièrement aux cytomètres sur puce. De nombreux groupes de recherche ont conçu de tels instruments, adaptés à leurs propres thématiques. De plus, la microfluidique traditionnelle dispose déjà de nombreux systèmes élaborés ne demandant qu'à être couplés à un module optique. Par exemple, Clausell-Tormos *et al* 2008 ont réalisé une plateforme microfluidique d'encapsulation de cellules marquées dans des micro-émulsions eau-huile et l'ont couplée à un système optique d'analyse des gouttelettes permet de caractériser l'intensité de fluorescence des cellules.

La Figure 15 détaille le processus d'encapsulation et d'espacement des gouttelettes (A), et il est important de noter que les gouttelettes peuvent se déformer pour passer un goulot, ce qui est beaucoup moins le cas pour les capsules formées d'une coque d'alginate, pour lesquelles des dimensions de canal égales à leur diamètre provoque un bouchage du circuit microfluidique. Nous reviendrons sur cet aspect au Chapitre 4.

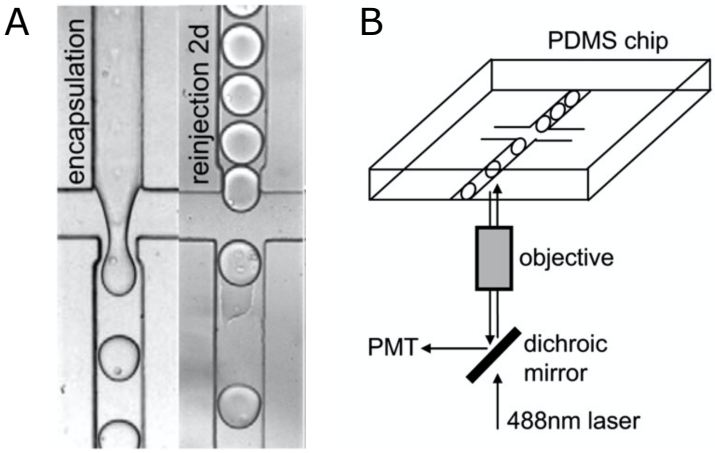


Figure 15 : Cytomètre sur puce de cellules encapsulées par microfluidique digitale. **A. :** Système d'encapsulation d'une phase aqueuse contenant les cellules, focalisée de part et d'autre par une phase d'huile. **Droite :** réinjection des gouttelettes après deux jours d'incubation dans un système d'espacement, permettant leur détection optique l'une après l'autre. Largeur de canal : 100 µm. **B. :** Schéma du dispositif de détection optique. Extrait de Clausell-Tormos *et al* 2008.

Parmi les travaux concernant des échantillons aux dimensions proches de celles des capsules cellulaires, le groupe de Jean-Christophe Baret a récemment proposé un cytomètre sur puce adapté au comptage de cellules encapsulées dans des gouttelettes aqueuses d'environ 100 µm de diamètre (Lu *et al* 2017).

Cet instrument est capable de détecter l'intensité de fluorescence associée au pourtour de la gouttelette (Figure 16, signal rouge) et l'intensité de fluorescence des cellules qu'elle contient (Figure 16, signal vert). Les vitesses de comptage sont d'environ 100 000 cellules en 3 minutes, ce qui donne accès à une très bonne statistique.

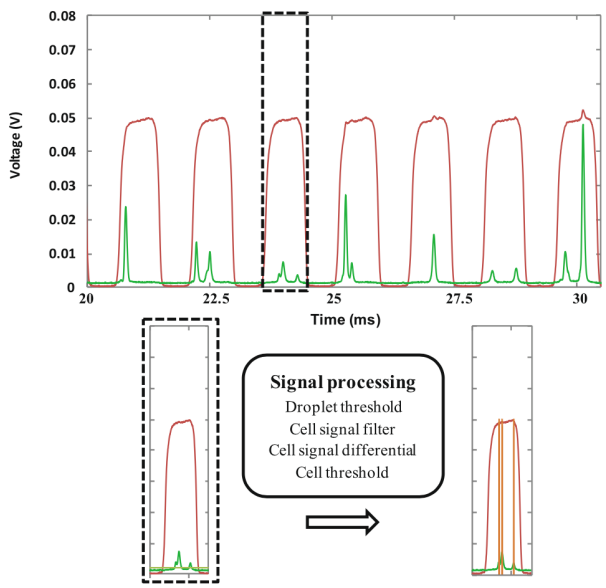


Figure 16 : Utilisation de seuils de détection pour déterminer le nombre de cellules au sein d'une gouttelette. Le signal rouge correspond à l'intensité de fluorescence de la gouttelette, le signal vert aux cellules. Carré en points-tillés : signal exemple correspondant à une gouttelette. Extrait de Lu *et al* 2017.

On notera que jusqu'ici, les exemples cités s'appuient sur l'intensité de fluorescence. Le groupe de Sai Siva Gorthi à l'Institut des Sciences de Bangalore a présenté, quant à lui, un système utilisant un simple faisceau laser gaussien permettant de mesurer l'intensité lumineuse transmise au travers d'une cellule unique, qui permet de distinguer des cellules infectées ou non par le virus de la malaria (Banoth *et al* 2014). Les cellules sont convoyées par un fluide s'écoulant dans un canal transparent, traversé de part en part par le faisceau laser (Banoth *et al* 2016, voir **Figure 17**).

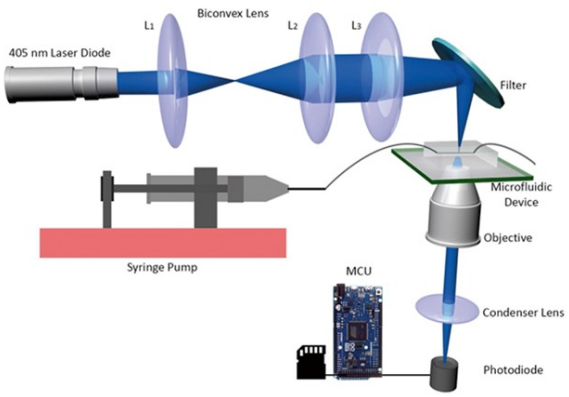


Figure 17 : Schéma de fonctionnement d'un système optofluidique de diagnostic de la malaria par atténuation lumineuse de cellules uniques. Extrait de Banoth *et al* 2016.

En lien avec l'aspect « cost-effective » des instruments « on chip », une carte électronique open-source Arduino est utilisée, et le code de traitement des données est public. Cette philosophie de recherche « partageuse et participative » sera également une de nos préoccupations et sera détaillée à la section 1.7 .

Les cytomètres sur puce ont souvent été adaptés en trieurs de cellules. Pour trier en temps réel les échantillons, plusieurs travaux utilisent des électrodes directement insérées dans le circuit microfluidique pour générer un champ électrique qui infléchira la direction prise par les échantillons lors de leur écoulement (Agresti *et al* 2010, Figure 18-A.).

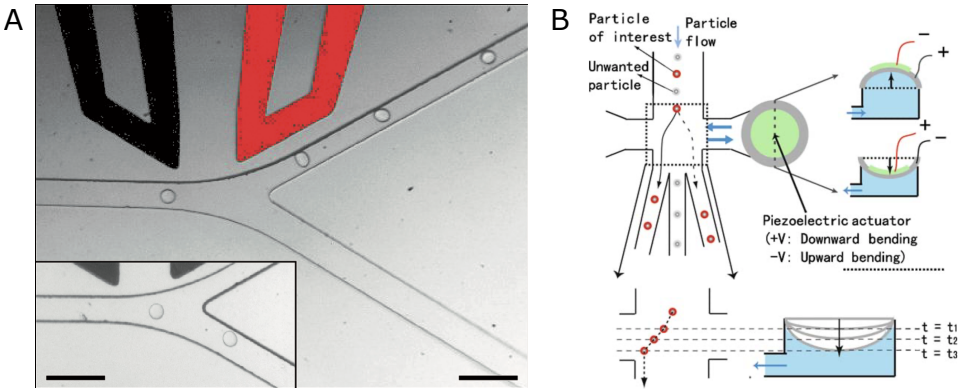


Figure 18 : Méthodes de tri reposant sur un système électrique ou acoustique. **A.** Électrodes générant un champ électrique influant la direction prise par une gouttelette. Extrait de Baret *et al* 2009. **B.** Actuateur piézo-électrique déformant une valve de PDMS influant directement sur le flux laminaire convoyant les échantillons. Extrait de Chen *et al* 2009.

L'intérêt des systèmes d'électrodes est leur grande réactivité, car les champs électriques sont synchronisés avec les signaux de détection. Il existe également des systèmes piézo-électriques ou acoustiques, qui, couplés à la relative flexibilité du circuit microfluidique, pourront, selon la tension qui leur sera appliquée, infléchir la direction d'écoulement de tel ou tel échantillon (Chen *et al* 2009, Ren *et al* 2015, Figure 18-B.). L'intérêt de ces systèmes est de pouvoir finement contrôler la direction imposée à la particule, même si le débit de tri semple plus réduit que pour d'autre techniques.

Un autre moyen de manipuler les objets en écoulement est de perturber le flux du liquide les transportant, notamment avec la création d'une bulle de cavitation à un emplacement adéquat, qui viendra, par différence de pression, modifier la trajectoire du flux laminaire (Wu *et al* 2012, Figure 19-A.).

La formation rapide de cette bulle nécessite l'utilisation d'un laser pulsé couteux, et la méthode a une excellente précision temporelle (formation de bulle et tri en 3 µs). On utilise aussi des pièges ou pinces optiques pour directement déplacer l'échantillon dans un circuit microfluidique (Wang *et al* 2011, Figure 19-B.), mais ceci est limité à la manipulation de petites particules, de la dimension d'une cellule.

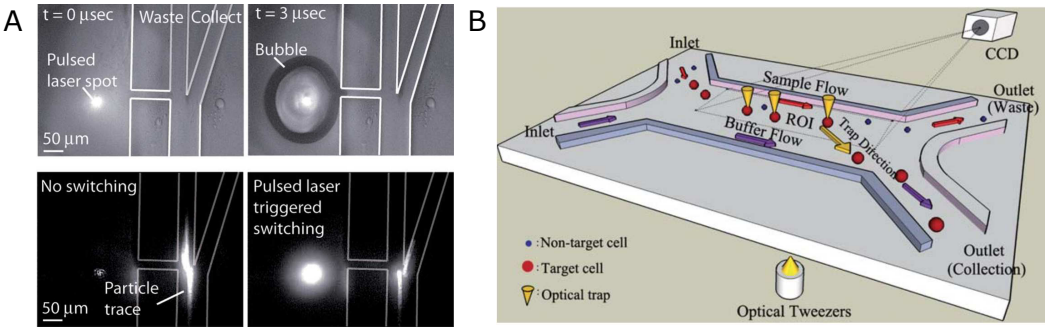


Figure 19 : Méthodes de tri reposant sur un dispositif optique. **A.** Génération d'une bulle de cavitation par un laser pulsé, produisant une différence de pression infléchissant la trajectoire des particules. Extrait de Wu *et al* 2012**. B.** Utilisation d'un piège optique pour déplacer les échantillons. Extrait de Wang *et al* 2011.

À des échelles de taille plus grande (> 20 µm) et pour des débits d'analyse un peu plus faibles, il est courant d'utiliser des valves mécaniques ou directement intégrées au circuit (s'appuyant sur la flexibilité du PDMS, Okumus *et al* 2018), ce qui peut même être utilisé pour étudier les propriétés mécaniques des cellules en les compressant dans le circuit (Hosmane *et al* 2011). Pour s'affranchir encore plus d'ajouts technologiques pour réaliser un tri des objets, des groupes ont aussi directement adapté les configurations géométriques des circuits microfluidiques pour utiliser l'inertie des échantillons afin de les discriminer selon leur masse et les envoyer dans des zones de collection différentes (Geislinger and Franke 2014). C'est le cas de l'équipe de Dino Di Carlo (Université de Californie Los Angeles, USA), qui propose un système utilisant la force de poussée (inertial lift force) des murs du canal d'écoulement sur les particules, pour les placer ou non dans des zones de flux d'un débit plus important (**Figure 20**, Gossett *et al* 2012).

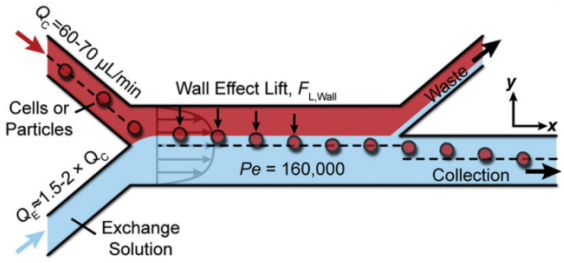


Figure 20 : Méthode de tri reposant sur les forces inertielles appliquées aux échantillons lors de leur écoulement dans un canal microfluidique de géométrie particulière. Extrait de Gossett *et al* 2012.

L'intérêt de cette méthode est que, la force de poussée étant proportionnelle au diamètre des particules, on pourra discriminer ces dernières selon leur taille. Bien que très efficaces et libres de tout délai de tri imposé par un moyen électronique ou mécanique, ces techniques ne sont souvent adaptées qu'à une application particulière (*i.e.* la séparation des plaquettes et des globules rouges), et la géométrie des circuits et les débits utilisés doivent être optimisés pour chaque type d'échantillon. Nous reviendrons sur les paramètres physiques des écoulements et les forces en présence au Chapitre 4.

Autres dispositifs optofluidiques

Les dispositifs optofluidiques peuvent être développés dans des buts expérimentaux différents, comme par exemple pour manipuler des faisceaux lumineux. Quelques applications importantes sont résumées à la **Figure 21**. L'optofluidique permet d'utiliser les propriétés des interfaces liquide/liquide et solide/liquide, afin de réaliser des systèmes qui orientent et modifient les rayons lumineux. Par exemple, le groupe de George Whitesides à l'Université d'Harvard a construit un guide optique reposant sur un circuit microfluidique combinant des flux laminaires d'indices de réfraction différents (Wolfe *et al* 2004, Figure 21-B.), qui, en jouant sur les débits d'injection des flux, oriente la lumière selon un angle donné.

Une autre approche est d'utiliser l'interface PDMS/liquide comme outil de pompage pour fabriquer un laser (Li *et al* 2006, Figure 21-A.). Un motif spécifique est moulé au fond du canal dans lequel s'écoule une solution dont la teinte conditionne la longueur d'onde du laser. Enfin, les pinces et pièges optiques sont également présents dans les systèmes optofluidiques pour par exemple étirer ou orienter (Bellini *et al* 2010) les échantillons dans le flux pour une meilleure analyse, ou piéger une microsphère qui servira de lentille pour un faisceau d'interrogation (Brody and Quake 1999, Domachuk *et al* 2005).

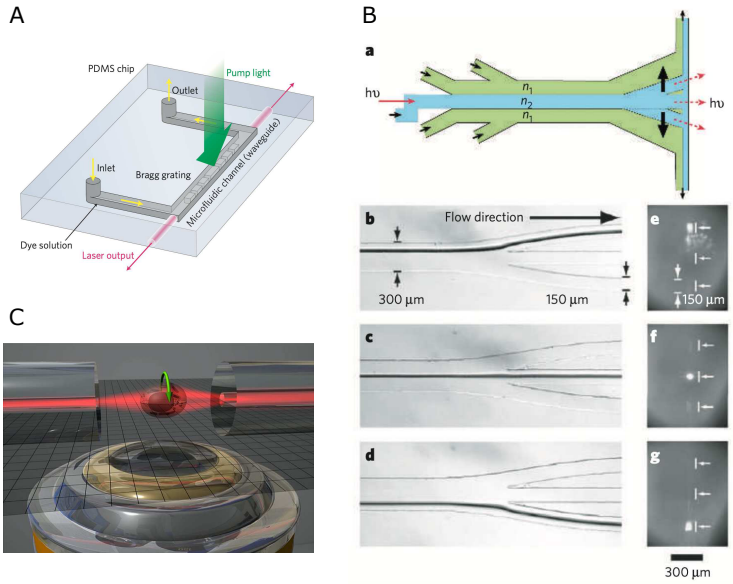


Figure 21 : Applications optofluidiques autres que la manipulation d'échantillons par un fluide. **A.** Système de laser DFB (Distributed Bragg Feedback laser). Une source lumineuse "pompe" est dirigée sur un canal à fond texturé, rempli d'une solution colorée, ce qui génère un rayon laser de longueur d'onde équivalente orthogonalement. Extrait de Li *et al* 2006. **B.** Guide optique à interaction liquide-liquide. **a**. Trois flux d'indice de réfraction différents n_1 et n_2 sont injectés dans un dispositif microfluidique permettant, en jouant sur les débits, de modifier la largeur de chacun des flux, afin de diriger la lumière dans l'une ou l'autre des sorties du circuit. **b-c-d.** Vues de dessus du système. **e-f-g.** Vues de face du système. Extrait de Wolfe *et al* 2004. **C.** Principe de fonctionnement d'un piège laser pour la manipulation d'objets uniques, permettant le maintien et la rotation d'un objet dans le champ d'un système optique conventionnel off-chip .

1.6 Impression 3D

Dans le cadre de notre thèse, comme les canaux nécessaires à la manipulation des capsules cellulaires ne demandent pas une résolution spatiale fine (leur taille ne sera jamais inférieure à 200 µm), nous nous sommes tournés pour leur réalisation vers une méthode moins performante que la photolithographie, mais également moins couteuse et moins chronophage (~2h) : l'impression 3D des moules à l'aide d'une imprimante à projection de lumière directe (DLP, Direct Light Projection) et d'une résine plastique thermo-résistante. Cette technologie permet d'atteindre des résolutions d'impression de 5x5x25 µm pour un voxel. Son principe repose sur une polymérisation en couches de résine liquide, au moyen de projection d'images de coupes successives du modèle 3D à imprimer. La résine liquide photo-polymérise lors de son exposition aux rayons UV et forme donc une couche solidifiée de plastique correspondant à l'image projetée. Un bras mécanique déplace ensuite la partie solidifiée verticalement, pour que la couche suivante polymérise à nouveau selon une autre image, et que l'empilement de toutes les couches reproduise *in fine* un modèle 3D dessiné à l'aide d'un logiciel de dessin industriel (par exemple SolidWORKS). Le processus d'impression est décrit en détail à la **Figure 22**.

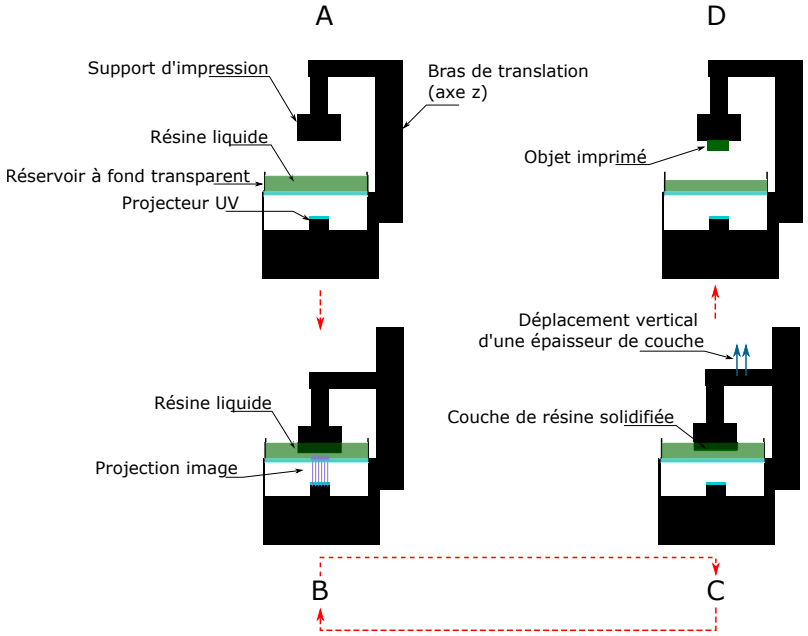


Figure 22 : Vue schématique du processus d'impression 3D « Direct Light Projection » (DLP). **A.** Ajout de résine liquide dans le réservoir à fond transparent. Import des images correspondant à chaque couche du modèle 3D à imprimer. **B.** Projection de l'image sur la surface du support d'impression, provoquant la polymérisation de la résine liquide en une couche solide. **C.** Déplacement vertical du bras sur une distance correspondant à une épaisseur de couche, afin que la prochaine image s'imprime sur la couche solidifiée à l'étape précédente (**B.**). S'il reste des couches à imprimer, on retourne à **B**. **D.** Décollage et nettoyage à l'isopropanol de l'objet imprimé.

En comparant avec les autres protocoles de fabrication de moules à savoir la photolithographie (**Figure 23**-A), le fraisage mécanique (**Figure 23**-C), on constate visuellement qu'utiliser cette technique (**Figure 23**-B) ne nous pénalisera pas sur la résolution des détails de nos circuits.

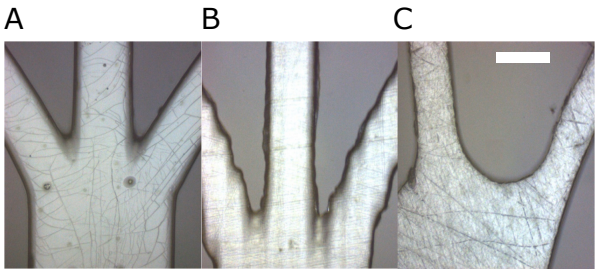


Figure 23 : Comparatif de plusieurs méthodes de fabrication de moules pour circuits microfluidiques. **A.** Moule en résine SU-8. **B.** Moule obtenu par impression 3D en résine HTM140 V2 (EnvisionTec). **C.** Moule obtenu par détourage mécanique (fraisage) d'une plaque de silicium. Extrait de Robinson *et al* 2016. Barre d'échelle : 50 µm

1.7 Adaptation de l'électronique – vers un instrument « open source »

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'instrumentation nécessaire au bon fonctionnement des technologies présentées (qu'il s'agisse de méthodes d'imagerie ou de cytométrie) est assez onéreuse et complexe à développer, nécessitant des savoir-faire de programmation, d'analyse de données et même de création d'interfaces utilisateur. À ce jour, de multiples solutions basées sur des programmes dits « propriétaires » ont été réalisées, comme par exemple le contrôle de platines de microscopes via le logiciel LabVIEW, ou l'acquisition de signaux analogiques et leur conversion en données numériques par les cartes électroniques NiDAQmx de Texas Instruments. Néanmoins, chaque solution demandant une expertise spécifique, la grande partie des systèmes sont configurés en amont dans l'industrie et ne présentent à l'utilisateur qu'une interface dite « boîte noire », ne permettant pas de comprendre par soi-même le fonctionnement profond de l'instrument, ou bien d'assurer la maintenance ou la réparation du système de son propre chef. Aussi, il apparaît pertinent de développer des solutions « ouvertes » permettant aux utilisateurs, munis de quelques compétences de programmation et de logique, de pouvoir maintenir, modifier et améliorer selon leurs besoins des systèmes préconfigurés déjà existants. De nombreux projets empruntent déjà cette voie, avec un grand succès, dans le domaine de la conception logicielle microfluidique (DeChiara *et al* 2017), de l'électronique d'instrumentation (da Costa *et al* 2014), ou de la fabrication de circuits microfluidiques (Soe *et al* 2013, Kong *et al* 2017), pour ne citer que ces derniers. S'ajoutant à cette dimension de partage et d'améliorations qui peuvent être globales à une communauté scientifique (on citera pour exemple le succès du logiciel libre *ImageJ* chez les microscopistes), on notera le coût zéro des logiciels impliqués, développés par une communauté de passionnés, proposant toujours de nouvelles idées et moyens, ainsi que l'ajout d'une capacité de modularité aux différents systèmes : de nombreux travaux ont récemment porté sur des instruments modulaires

adaptables via l'ajout ou le retrait de blocs fonctionnels (Hsieh *et al* 2014). Ainsi, le langage *Python* est, depuis une vingtaine d'années, l'outil le plus utilisé par la communauté scientifique mondiale pour i) traiter des données ii) réaliser des outils d'instrumentation iii) visualiser des données, et ce dans des domaines très variés. L'avènement des programmes et langages « open source » sur le marché de l'instrumentation ayant été un tournant de ces dix dernières années, nous nous proposons d'implémenter une telle infrastructure sur le prototype d'analyseur optofluidique de capsules cellulaires que nous souhaitons réaliser. Aussi, nous réaliserons l'interfaçage électronique de nos détecteurs à l'aide d'une carte électronique Arduino (https ://www.arduino.cc/), collecterons et centraliserons les données sur un micro-ordinateur RaspberryPi (https ://www.raspberrypi.org/) qui pilotera également l'ensemble du système via une interface utilisateur intégralement codée en langage *Python*. Au-delà de l'aspect financier, proposer un instrument entièrement « open-source » dans ce domaine pourrait permettre un échange sur les technologies d'acquisition et fournir une base solide de développement au sein de la communauté des organoïdes.

1.8 Cahier des charges

Au vu de l'état de l'art présenté dans les sections précédentes, il apparaît intéressant d'utiliser la technologie des capsules cellulaires maîtrisée par notre équipe pour exploiter son grand potentiel statistique. Il est donc proposé de réaliser le prototype d'un instrument d'analyse de capsules cellulaires à haut débit, sans imagerie ni marquage fluorescent, qui utiliserait les propriétés d'atténuation de la lumière par les échantillons pour déterminer leur taille et leur coefficient d'atténuation, propriété optique donnant des informations sur le « contenu » cellulaire. Ces deux grandeurs de mesure nous permettront de définir des courbes de croissance des agrégats ainsi qu'un suivi des variations potentielles de leur état cellulaire.

Au chapitre suivant, nous détaillerons les lignées cellulaires utilisées et leurs méthodes de culture. Nous présenterons également plus en détails notre technologie de fabrication de capsules cellulaires.

Un troisième chapitre sera consacré à la théorie associée à l'interaction lumière-matière retenue, ainsi que les simulations qui en découlent. Nous détaillerons également la calibration du module optique en construction.

Le quatrième chapitre présentera la conception du module microfluidique, ainsi que l'étude du comportement des capsules cellulaires lors de leur manipulation dans ce circuit.

Enfin, le cinquième chapitre décrira le prototype optofluidique final, qui sera alors utilisé pour analyser des échantillons de plusieurs lignées cellulaires.

Nous conclurons ensuite en abordant les améliorations à apporter au système, ainsi que les expériences restant à effectuer.

Chapitre 2

Lignées cellulaires et technique des capsules cellulaires

2.1 Lignées cellulaires et culture 3D

Pour tester les performances de notre analyseur optique, nous avons choisi des échantillons (organoïdes et sphéroïdes) tests. Dans un premier temps, nous avons étudié l'évolution de taille et de morphologie des agrégats cellulaires. Nous avons donc choisi des cellules hépatiques tumorales adhérentes et des cellules lymphocytaires tumorales non-adhérentes. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux modifications de l'état interne des agrégats cellulaires, et nous avons alors utilisé des cellules souches pré-adipocytaires ayant la capacité de se transformer en adipocytes.

2.1.1 Cellules hépatiques tumorales adhérentes

Nous avons sélectionné deux lignées de carcinomes hépatiques comme modèles de tumeurs solides, à savoir les lignées HuH6 et HuH7 (hépatocytes humains). Elles ont été cultivées en milieu DMEM 1 g/l de glucose, complémenté avec 10% de SVF et 5% de Peni-Streptomycine (PS), et maintenues à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO_2. La concentration cellulaire a été maintenue entre 5.10^5 et 1.10^6 cellules/ml, au moyen de passages en trypsine bihebdomadaires. Le milieu de culture précédemment décrit a été remplacé toutes les 48 heures. Ces cellules ont été fournies par l'équipe du Docteur Frédéric Saltel, dans le cadre d'une collaboration avec l'Unité Inserm U1053 (Université de Bordeaux), avec l'aide technique de Nathalie Allain-Courtois. Ces cellules s'agrègent spontanément après encapsulation pour former un petit sphéroïde sphérique flottant dans la capsule.

2.1.2 Lymphocytes tumoraux non-adhérents

Nous avons également sélectionné deux lignées de lymphocytes B comme modèles de tumeurs liquides. Les deux lignées cellulaires utilisées sont extraites de lymphomes diffus à grands lymphocytes B, mais sont d'origines et de fonctions différentes. La lignée HLY-1 est dérivée de cellules de lymphocytes B dites « activées » (ABC, Activated B-cells), qui nécessitent la présence de lymphocytes T afin de fournir une réponse immunitaire. La lignée SU-DHL-4 est dérivée de cellules du centre germinal folliculaire, où les lymphocytes B ont pour principale fonction la prolifération en vue d'une différentiation potentielle en cellules de plasma ou en cellules mémorielles de la réponse immunitaire.

Ces deux lignées ont été cultivées en milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), complémenté par 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal), et maintenues à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO_2. La concentration cellulaire a été maintenue entre 5.10^5 et 1.10^6 cellules/ml, au moyen de passages en trypsine hebdomadaires. Le milieu de culture précédemment décrit a été remplacé toutes les 48 heures. Pendant les 24 heures précédant l'encapsulation des cellules, le milieu de culture RPMI est remplacé par du milieu

DMEM 4.5g/l de glucose, (Dulbecco's modified Eagle Medium) complémenté avec 10% de SVF et 5% de Peni-Streptomycine (PS). Cette opération est réalisée car le milieu RPMI qui contient des ions phosphate dissout les capsules d'alginate. De manière à habituer les cellules au changement de leur milieu favori pour le DMEM, on procède à cette manipulation au minimum un cycle cellulaire avant l'encapsulation. Ces cellules ont été fournies par l'équipe de Laurence Bresson-Bépoldin, dans le cadre d'une collaboration avec l'Unité Inserm U1218 (Université de Bordeaux – Institut Bergonié), et l'Unité Inserm U1236 du Professeur Karin Tarte (Université Rennes 1 – CHU de Rennes), avec l'aide technique du Docteur Valérie Le Morvan. Les deux lignées de lymphocytes sont peu adhérentes, et ne s'agrègent pas avec une cohésion élevée. En culture 2D, elles ont tendance à former des grappes peu cohésives.

2.1.3 Progéniteurs d'adipocytes

Enfin, nous avons étudié un modèle d'organoïdes de pré-adipocytes. Ces derniers ont la particularité de former des chapelets de gouttelettes lipidiques lors de l'ajout d'un cocktail d'hormones dans leur milieu de culture, comportement caractéristique de leur différentiation en adipocytes (Palacios-Ortega *et al* 2016). Ces gouttelettes possèdent un coefficient d'atténuation supérieur à celui d'une cellule classique (Beauvoit *et al* 1995), majoritairement composée d'eau et d'organelles. Notre hypothèse de travail est que la simple mesure du coefficient d'atténuation β au cours du temps est un moyen de détecter et suivre la différentiation des cellules souches adipocytaires en adipocytes matures. Nous avons utilisé la lignée 3T3-F442-A pour laquelle la différentiation est simplement déclenchée par l'ajout d'insuline au milieu de culture. Ces cellules ont été cultivées en milieu DMEM 4.5 g/l de glucose, complémenté avec 10% de SVF et 5% de Peni-Streptomycine (PS), et maintenues à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO_2. La concentration cellulaire a été maintenue entre 5.10^5 et 1.10^6 cellules/ml, au moyen de passages en trypsine bihebdomadaires. Le milieu de culture précédemment décrit a été remplacé toutes les 48 heures. Ces cellules ont été fournies par l'équipe Mécanobiologie moléculaire et intégrative du Docteur Éric Honoré, de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire de Nice, avec l'aide technique de Malika Arhatte.

2.2 Fabrication des organoïdes par la technologie des capsules cellulaires

Les échantillons à analyser sont produits par la technologie des capsules cellulaires. Cette technique d'encapsulation a été mise au point dans le groupe Bio-Imagerie et Optofluidique, du LP2N. Il s'agit d'une méthode microfluidique de co-extrusion reposant sur la formation d'un jet composite de fluides coaxiaux et sa fragmentation spontanée par instabilité de Plateau-Rayleigh avant réticulation d'une coque gélifiée (polysaccharide naturel, l'alginate de sodium) dans un bain de calcium. Cette méthode est la seule employée pour former les

échantillons utilisés dans nos expériences, au Chapitre 3 pour valider notre module optique et au Chapitre 5 pour les expériences ayant permis d'obtenir une preuve de faisabilité de notre analyseur optofluidique ont été effectuées sur cellules vivantes.

2.2.1 Solutions d'encapsulation : préparation et propriétés

On prépare tout d'abord des solutions aqueuses stériles d'alginate de sodium (concentration 2% m/v), de sorbitol (concentration 300 mM), et de calcium (100 mM). L'alginate de sodium est constitué de deux monomères : l'acide mannuronique (M) et l'acide guluronique (G). L'alginate utilisé a un poids moléculaire compris entre 150 et 300 kDa (grande polydispersité). La proportion relative M/G détermine la rigidité du gel formé au contact de cations multivalents. Le calcium étant communément présent dans le milieu de culture cellulaire, il est préféré pour former un gel d'alginate solide, élastique et poreux (Sikorski *et al* 2007). Cette porosité évolue avec la concentration de la solution d'alginate (typiquement entre 0.5 et 5% m/v), mais également en fonction de la concentration en ions calcium (entre 0.1 et 0.5 M) (Turco *et al* 2011, Alessandri 2013). Pour les conditions extrêmes de ces deux paramètres, le diamètre des pores des gels d'alginate varie environ entre 5 et 20 nm, permettant la diffusion libre de protéines, nutriments ou molécules artificielles (Tanaka *et al* 1984). Ces gels étant majoritairement composés d'eau, ils sont transparents à la lumière visible, propriété permettant l'observation en microscopie classique de leur structure. L'alginate que nous avons utilisé est le Pronatal LF 200 (FMC BioPolymers), qui comporte une fraction G/M élevées (>1.5). Sa rigidité (Module d'Young) dans les conditions utilisées et décrites dans les prochains paragraphes a été mesurée précédemment (Alessandri *et al* 2013) et est de l'ordre de 70 kPa.

2.2.2 Principe d'encapsulation et dispositif expérimental

On utilise un dispositif de co-extrusion imprimé en 3D (EnvisionTEC Micro Plus HD), qui permettra la formation d'un jet composite constitué de : i) une suspension cellulaire dans sa partie centrale ii) une solution aqueuse de sorbitol dans sa partie intermédiaire afin de prévenir la diffusion des ions calcium issus des cellules, la réticulation interne de l'alginate et le bouchage du canal, ainsi que des chocs osmotiques iii) une solution d'alginate de sodium à 2% m/v dans sa partie externe. La coupe transversale et la vue isométrique de ce système de co-extrusion microfluidique sont montrées à la **Figure 24**-B.

Cette puce microfluidique (**Figure 24**-A) permet de générer un jet laminaire coaxial à condition de la compléter par un capillaire en borosilicate préparé par élongation d'un capillaire creux (CMScientific – CV6084) à l'aide d'un étireur de pipette (Sutter P-3000) et dont l'extrémité est poncée à un diamètre typique compris entre 100 et 150 µm (papier à grain 3, 6, et 9 µm, 3M), qui déterminera le diamètre du jet et donc la taille moyenne des capsules ainsi générées (de

l'ordre de deux fois la taille du jet). Cette pointe est hydrophobisée par silanisation gazeuse (1H,1H,1H,2H-perfluorooctyltrimethoxysilane) (voir Annexes, section 8.2), afin d'éviter le mouillage par le jet et la perturbation du flux coaxial, puis est ensuite insérée et collée (Loctite M31-CL) dans l'encoche du corps de puce imprimé.

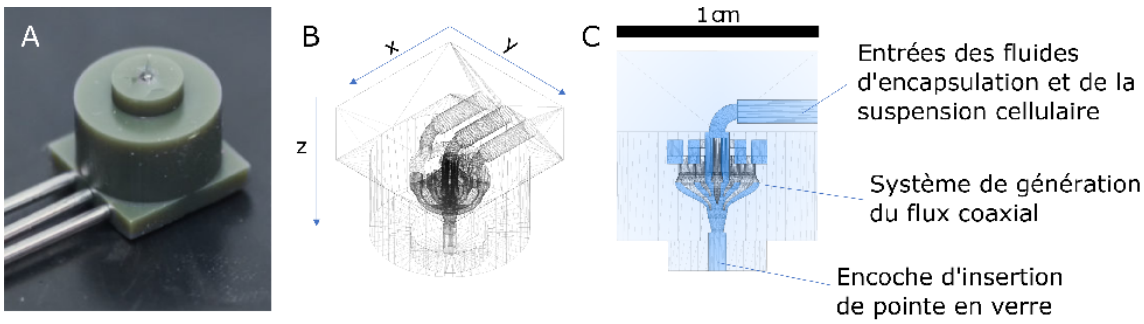


Figure 24 : Dispositif de co-extrusion permettant la génération d'un jet coaxial. **A.** Photographie de la puce d'encapsulation imprimée en résine plastique. **B.** Vue isométrique de la structure interne du dispositif. Les trois entrées situées sur le côté de l'objet correspondent chacune à une partie du jet généré en sortie. **C.** Coupe verticale du dispositif. Les parties en bleu foncé présentent le parties creuses, zones de passages des différents flux. Une encoche en sortie de de puce est également présente, afin de pouvoir y loger un capillaire en verre étiré en pointe et hydrophobisé.

La Figure 25 présente le système expérimental permettant de réaliser la technique d'encapsulation cellulaire. Tout d'abord, à l'aide de pousse-seringues contrôlés par ordinateur (neMESYS, OEM 310), on injecte les différentes solutions préalablement stérilisées par autoclave (sorbitol) et filtration (alginate, filtre 0.2 µm, Corning, CLS431227). Dans la plupart des expériences rapportées dans ce manuscrit, les débits d'injection sont de 30 ml/h pour l'alginate, et 20 ml/h pour le sorbitol et la suspension cellulaire, ce qui permet d'obtenir des parois d'alginate d'environ 20 µm d'épaisseur, alors que le diamètre de la capsule est fixé par le diamètre du capillaire de sortie ($\emptyset_{caps} \sim 2 \times \emptyset_{capillaire}$) (Alessandri *et al* 2013). Le tube d'injection de l'alginate est légèrement modifié à l'aide de connecteurs triples (IDEXP-635-01) afin que la solution soit en contact avec une électrode en platine chargée positivement (+2kV) avant son injection dans le dispositif de co-extrusion. Ce dernier génère alors un jet coaxial d'un diamètre de 100 µm environ, contenant en son centre la suspension cellulaire, enveloppée par le sorbitol et l'alginate chargé (Figure 25-B.). Ce jet se fragmente spontanément par instabilité de Plateau-Rayleigh (Alessandri *et al* 2013) en microgouttelettes présentant une coque d'alginate visqueux remplie d'un cœur liquide contenant la suspension cellulaire. Ces microgouttelettes d'une taille de 200 µm environ vont alors passer au travers d'un anneau en cuivre d'un diamètre de 4 cm, chargé négativement (masse de l'électrode de platine à 2kV), se retrouvant alors dispersées par le champ électrique évitant la coalescence des gouttelettes au cours de leur chute. A la suite de cette électro dispersion, les gouttelettes ainsi formées tombent d'une cinquantaine de centimètres dans un bain d'ions calcium (100 mM, Calcium

Hexahydrate), réticulant leur coque d'alginate, formant des capsules cellulaires au cœur liquide à un taux de production estimé à 5000 capsules par seconde.

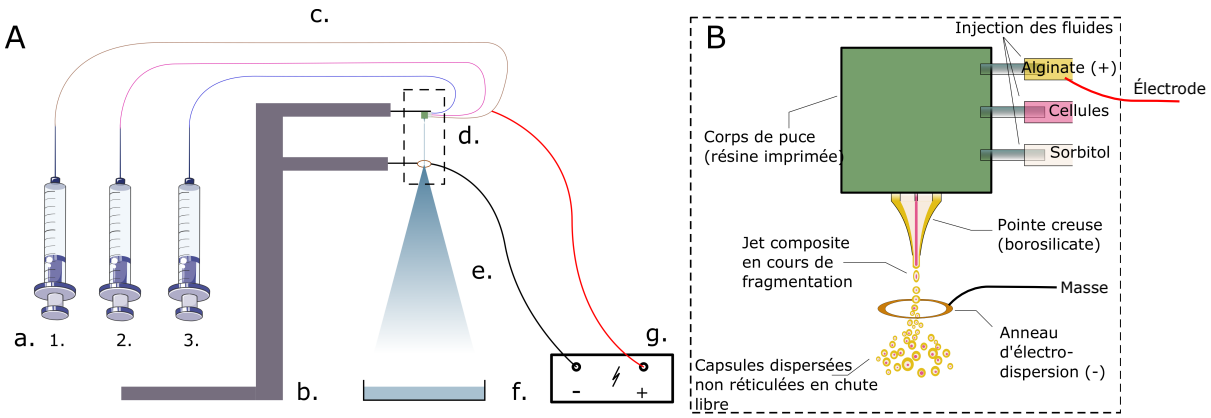


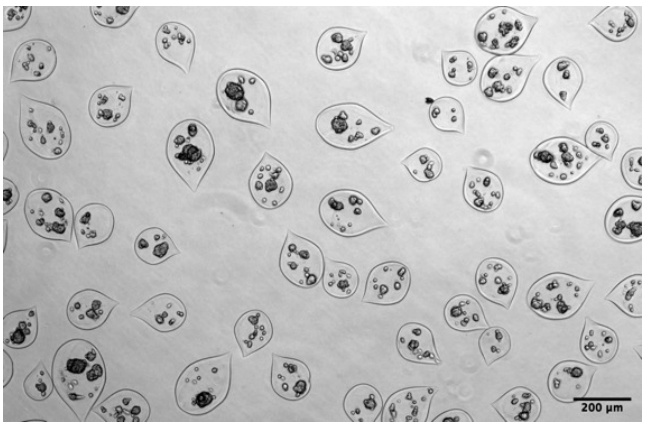
Figure 25 : Schéma du montage expérimental permettant l'encapsulation des cellules à l'intérieur d'une coque d'alginate de sodium. **A. a.** Seringues d'injection pilotées par un pousse seringue contrôlé par ordinateur. Les seringues 1, 2 et 3 injectent respectivement l'alginate de sodium liquide, la suspension cellulaire en milieu de culture et le sorbitol servant de solution tampon. **b.** Portoir d'une hauteur de 50 cm, maintenant la puce d'encapsulation à son sommet et, 5 cm plus bas, l'anneau en cuivre d'électro-dispersion. **c.** Tubes en téflon permettant l'injection des solutions dans le corps de la puce d'encapsulation. Le tube permettant d'injecter l'alginate est modifié pour permettre la charge positive de cette solution par une électrode en platine. **d.** Zone de formation du jet composite à partir de la pointe de la puce, puis fragmentation et dispersion de ce jet au travers de l'anneau en cuivre chargé négativement (version détaillée en **B**.). **e.** Cône de dispersion des capsules encore non-réticulées, en chute libre. **f**. Bain de calcium. **G.** Alimentation électrique délivrant une tension continue de 2 kV, chargeant positivement l'alginate de sodium et négativement l'anneau de cuivre, permettant l'apparition du phénomène d'électro-dispersion. **B.** Vue schématique du processus d'encapsulation en sortie de puce microfluidique. Les solutions d'alginate et de sorbitol sont injectées dans le corps de la puce, qui forme un jet composite coaxial. Ce jet se fragmente, puis passe au travers d'un anneau en cuivre chargé, provoquant la dispersion des gouttelettes.

2.2.3 Caractéristiques générales des capsules cellulaires et culture 3D

A l'aide de la technologie des capsules cellulaires nous avons formé des micro-compartiments sphériques, poreux aux nutriments, protéines et drogues, stériles, permettant le développement d'agrégats cellulaires pour chaque lignée présentée précédemment. Ces capsules sont tout d'abord visualisées par microscopie optique de manière à les caractériser avant leur utilisation dans notre plateforme optofluidique. Les capsules sont transférées du bain de calcium vers le milieu de culture utilisé pour la culture à 2D en boîte de Pétri, et conservées en atmosphère stérile (37°C, 5% CO_2). La **Figure 26** Montre une collection de capsules cellulaires à faible grossissement. On remarque que toutes les capsules présentent une légère anisotropie, qui se traduit par l'apparition d'une petite queue, due à la fragmentation du jet et à

la direction d'entrée dans le bain : le « nez » des capsules réticule en premier, et la queue en dernier.

Figure 26 : Capsules cellulaires contenant des cellules pré-adipocytaires 3T3F442A observées par microscopie en champ clair (Nikon 3DS, Ni-S elements, Obj. Nikon 4x) quelques minutes après encapsulation.



Nous caractérisons la taille des capsules par leur rayon équivalent ($R_{eq} = \sqrt{\frac{A}{\pi}}$ où A est l'aire de la capsules, déterminée par *ImageJ*) et leur sphéricité, définie comme le rapport du petit axe a par le grand axe b de la capsule assimiliée à une ellipse. L'histogramme montre $R_{eq} = 59.9 \pm 7.2\ \mu m$ et une sphéricité centrée autour de $S = 0.85 \pm 0.05$ pour la totalité des capsules.

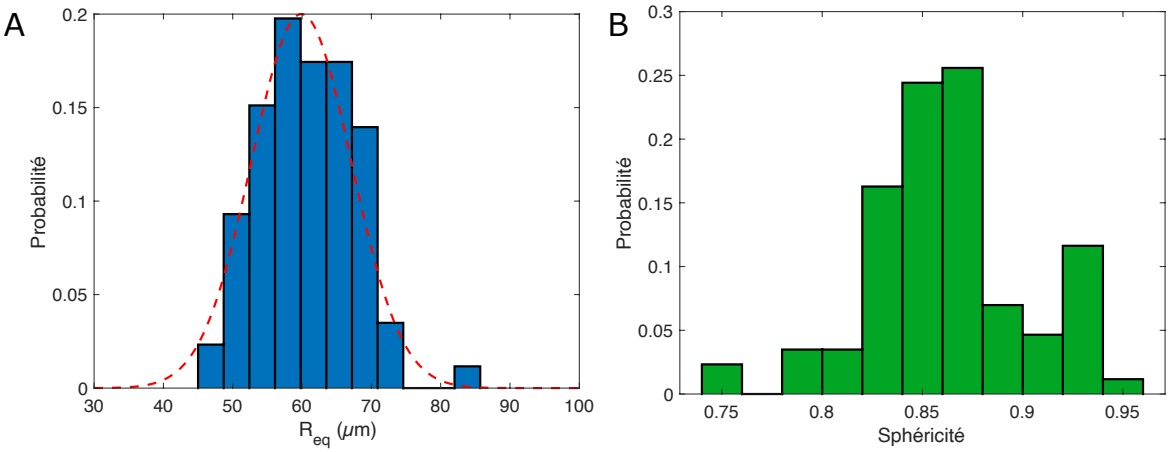


Figure 27 : Histogramme de rayons de sphère équivalents (**A**, $R_{eq} = 60 \pm 7.2\ \mu m$) et de sphéricité (rapport petit axe/grand axe, **B,** $S = 0.85 \pm 0.05$) pour N = 90 capsules.

Empiriquement et au fil de nombreux essais, nous avons constaté que les valeurs de sphéricité et le rayon moyen des capsules dépendaient non seulement des dimensions de la pointe en verre située à l'extrémité de la puce, mais aussi de l'hydrophobisation de cette

dernière, ainsi que, de façon plus générale, de la qualité de fabrication des différentes parties de ce dispositif (impression 3D, ponçage de pointe plan, assemblage…).

Après avoir encapsulé des cellules, on va pouvoir observer leur prolifération au sein des capsules sur plusieurs jours par microscopie en champ clair (Nikon 3DS, NI-S elements, Obj. Nikon 10x), comme montré sur la **Figure 28**.

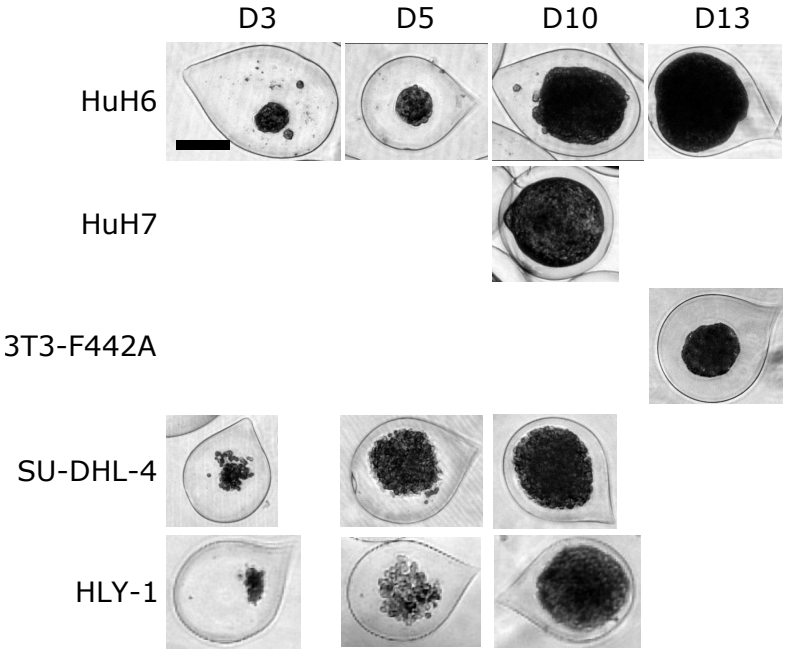


Figure 28 : Images en microscopie en champ clair de l'agrégation et croissance des amas de cellules encapsulées pour les différentes lignées cellulaires, sur une durée maximale de 13 jours. Chaque image représente une capsule différente mais de taille proche, permettant de constater qualitativement l'évolution de taille des agrégats et la différence « d'aspect » que l'on quantifiera par le coefficient d'atténuation. Barre d'échelle: 100 µm.

On remarque le regroupement des cellules en amas après trois jours de culture en capsule, puis l'expansion de cet amas par augmentation du diamètre de l'agrégat cellulaire. Au-delà d'une phase de croissance dont la durée est cellule-spécifique et dépend de la densité cellulaire initiale, les cellules atteignent la coque d'alginate et remplissent complètement la capsule : c'est l'étape de confluence. La prolifération cellulaire peut alors déformer la capsule élastique qui, en retour, comprime l'agrégat. Nous appellerons cet état la post-confluence. La capsule initialement utilisée comme un micro-compartiment peut être alors vue comme une sonde des forces mécaniques générées par la prolifération. Ce phénomène fait actuellement l'objet d'une étude spécifique au sein de l'équipe de BioImagerie et Optofluidique, dans le cadre d'un autre travail de thèse.

2.2.4 Fixation des agrégats cellulaires et dissolution des coques d'alginate

Nous avons adapté le protocole classique de fixation des cellules pour maintenir l'intégrité de la capsule d'alginate. En pratique, on place les échantillons dans une solution aqueuse de Paraformaldéhyde (PFA) à 4% v/v, pendant 24h, à 4°C, afin de laisser le temps à

l'agent fixateur de diffuser jusqu'au centre des agrégats. Ensuite, on rince les échantillons à l'aide de milieux de culture frais complémenté à 1% v/v de PFA, puis on peut les conserver à 4°C jusqu'à 6 mois environ. On peut aussi dissoudre l'enveloppe d'alginate formée à l'encapsulation. Cela peut être utile si l'on souhaite remettre en culture 2D des cellules issues d'une culture 3D en capsules, et étudier leur taux de prolifération par exemple. Cette dissolution est réalisée en utilisant du tampon phosphate salin, selon un protocole décrit en Annexe, section 8.3 .

Chapitre 3

Relation entre le signal d'atténuation d'un faisceau laser traversé par une capsule cellulaire et les propriétés physiques et biologiques de l'agrégat multicellulaire encapsulé

Dans l'introduction, nous avons motivé notre choix de suivre des agrégats multicellulaires encapsulés (sphéroïdes/organoïdes) sans imagerie et sans marquage. Dans un premier temps, nous allons rappeler les bases de l'interaction lumière-matière, et définir le formalisme théorique dans la configuration spécifique de notre étude. Puis, nous présenterons et validerons un montage optique permettant d'analyser des organoïdes/sphéroïdes uniques.

3.1 Principe de mesure et simulations

3.1.1 Fonctionnement du module optique de l'analyseur optofluidique

Notre approche consiste à analyser les capsules cellulaires par une mesure de transmission de lumière. Nous souhaitons obtenir des informations sur la croissance et le contenu des agrégats cellulaires à l'intérieur des capsules. Notre objectif est de mesurer deux paramètres intrinsèques des capsules cellulaires : leur rayon R (µm), et leur coefficient d'atténuation β (cm^{-1}). Ce coefficient représente le pouvoir d'extinction du matériau traversé. Il s'agit de la combinaison des phénomènes de diffusion des rayons lumineux et de leur absorption par le matériau traversé. La mesure de R permettra de suivre la croissance des agrégats en les sondant au cours du temps. La mesure de β apportera une information sur la « transparence » des échantillons, donc de manière indirecte sur le contenu cellulaire. Par exemple, des cellules mortes (suite à un manque de nutriments ou à un traitement chimique) et des cellules vivantes atténuent a priori la lumière de façon différente. On peut aussi s'attendre à une différence de transmission de la lumière selon la lignée cellulaire encapsulée : des cellules hépatiques très compactées pourraient a priori interagir différemment avec la lumière que des lymphocytes peu adhérents formant des agrégats diffus. Le modèle le plus simple que nous pouvons considérer est le passage d'une sphère de rayon R et de coefficient d'atténuation β constants dans un faisceau laser gaussien. La Figure 29 montre un dessin du déplacement latéral d'une sphère au travers du faisceau, à une vitesse constante, et l'évolution qualitative attendue de l'intensité lumineuse transmise. Lorsque la sphère est en dehors du faisceau, la totalité de l'intensité lumineuse est transmise. Au cours de la translation, l'intensité transmise décroit progressivement pour atteindre une valeur minimale, qui est obtenue lorsque l'échantillon est aligné au point de focalisation du faisceau laser. Cette valeur est directement reliée au coefficient d'atténuation de la sphère et à l'épaisseur de matière traversée, c'est-à-dire du diamètre de l'objet. En effet, si on se restreint à la position particulière où la sphère est exactement au centre du faisceau ($x = 0$), la valeur de l'intensité lumineuse transmise est donnée par la loi de Beer-Lambert :

(1) $$I_t(x=0) = I_0 e^{-\beta 2R}$$

avec I_t l'intensité transmise, I_0 l'intensité incidente du faisceau en $x = 0$. La transmission étant définie par : $T(0) = \frac{I_t(0)}{I_0}$, il vient :

(2) $$\beta = -\frac{1}{2R}\ln T$$

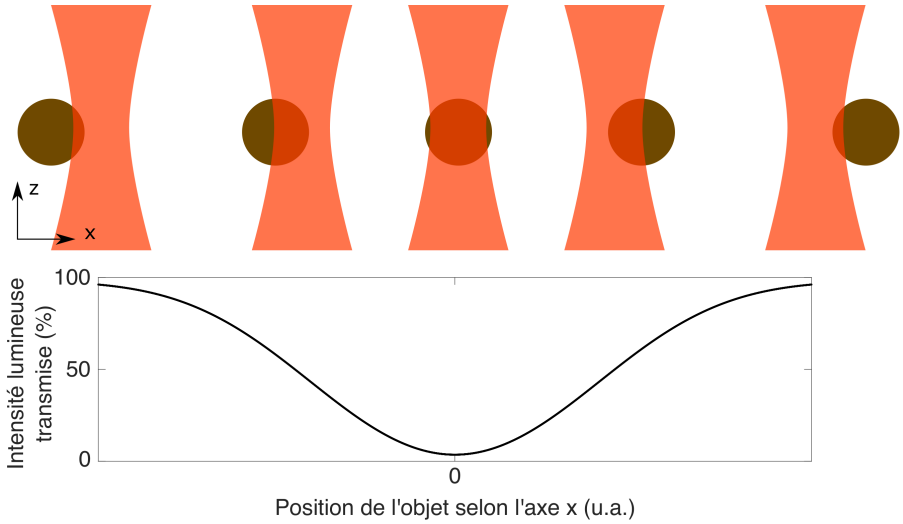


Figure 29 : Schéma du principe de fonctionnement du module optique de l'analyseur optofluidique reposant sur l'atténuation lumineuse d'une sphère opaque traversée par un faisceau laser gaussien. L'objet sphérique de rayon R et d'opacité **β** est translaté selon l'axe x normal à l'axe de propagation de la lumière, générant une diminution progressive de l'intensité lumineuse transmise, caractéristique des dimensions et des propriétés d'atténuation de l'objet. Ici, nous avons représenté le cas particulier pour lequel le diamètre de la sphère est proche de celui du faisceau est présenté.

Mais cela n'est valable qu'au centre x=0, ou le serait si l'échantillon avait une épaisseur constante en interaction avec le faisceau. Dans notre géométrie sphérique, l'épaisseur de l'échantillon à analyser n'est pas constante. Intuitivement, la demi-largeur « à mi-profondeur » du pic d'atténuation ($HWHM$, Half Width at Half Minimum) devrait être reliée aux dimensions de l'objet, si le faisceau est de dimension inférieure à R. En réalité, on peut identifier deux cas de figure « extrêmes » : i) une sphère de rayon très inférieur à celui du faisceau gaussien (Figure 30-A), et ii) une sphère de rayon très supérieur à celui du faisceau gaussien (Figure 30-B). Lorsque l'objet est de taille très inférieure au diamètre du faisceau, le profil $I_t(x)$ est représentatif de la taille du faisceau et non celle de l'objet d'étude. Lorsque l'objet est d'un diamètre largement supérieur aux dimensions du faisceau, le profil $I_t(x)$ sera corrélé à la taille de l'objet. Il faut donc plutôt se mettre dans cette deuxième situation et choisir d'utiliser un faisceau plus petit que les dimensions de l'objet pour espérer remonter à R. Il n'est pas non plus utile d'utiliser un faisceau trop petit car on veut analyser les sphéroïdes dans un mode « coarse grain », au-delà de l'échelle cellulaire, en considérant le micro-tissu comme un milieu continu.

Typiquement un faisceau de largeur de l'ordre de 10 à 20 µm (légèrement supérieur à la taille d'une cellule à 3D, et environ 10 fois plus petit que la capsule cellulaire) sera choisi, comme explicité dans les sections suivantes.

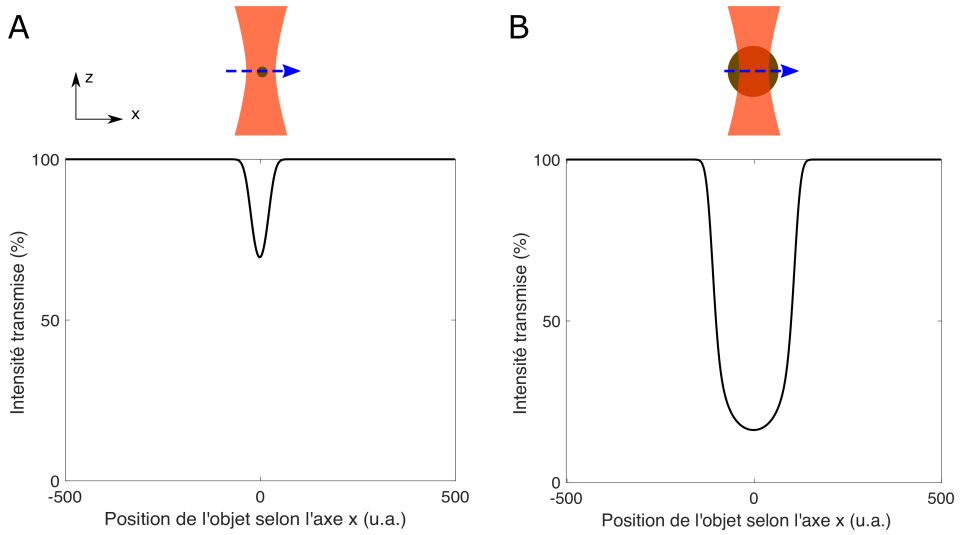


Figure 30 : Cas limites schématisant le passage d'une sphère au travers d'un faisceau gaussien. A. Objet très petit par rapport aux dimensions du faisceau ($R \ll \omega_0$). B. Objet très grand par rapport aux dimensions du faisceau ($R \gg \omega_0$).

3.1.2 Caractéristiques du faisceau laser gaussien

Pour faciliter l'analyse des mesures et le traitement théorique, nous avons décidé d'utiliser un faisceau gaussien présentant une distance de Rayleigh grande par rapport au diamètre de la sphère. Cela permet de considérer que la zone d'interaction est une intersection entre un cylindre de lumière et la sphère cellulaire.

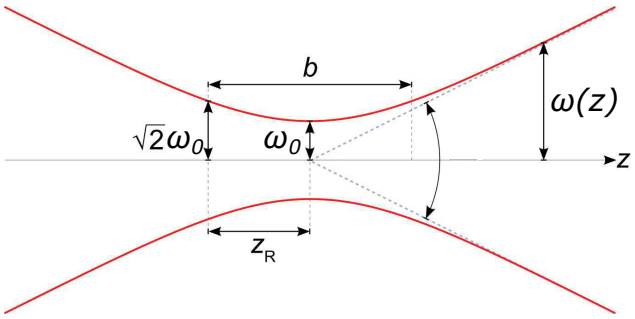


Figure 31 : Schéma théorique de la structure d'un faisceau gaussien focalisé par une lentille convergente au point focal permettant de préciser les notations utilisées. La distance $\omega(z)$ est communément appelée largeur de faisceau, et ω_0 est sa valeur minimale. La distance z_R est la portée de Rayleigh ou profondeur de champ.

En effet, comme représenté sur la Figure 31, la largeur de faisceau $\omega(z)$ est fonction de la portée de Rayleigh z_R, de la distance au point focal z, et de la largeur de faisceau au point focal ω_0, selon :

(3) $$\omega(z) = \omega_0\sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2}$$

Dans notre cas, on souhaite $z_R \gg R$ de manière à ce que $\omega(z)$ soit constant et $\omega(R) \approx \omega_0$. Or, on sait que :

(4) $$\omega_0 = \sqrt{\frac{z_R\lambda}{\pi}}\, ou\ z_R = \frac{\pi{\omega_0}^2}{\lambda}$$

Comme on le verra par la suite, notre faisceau est caractérisé par $2\omega_0 = 25\ \mu m$. Si on prend $\omega_0 = 12.5\ \mu m$, on obtient $z_R = 773\ \mu m$ pour $\lambda = 635\ nm$, d'après (4). À une distance égale au rayon des plus gros agrégats cellulaires (150 µm), on aura alors $\omega(R)$~12.7 µm, soit une variation de 1.6% de largeur de faisceau, ce qui est acceptable par rapport aux dimensions des objets analysés.

En ce qui concerne le choix de la longueur d'onde, celui-ci a été guidé par les considérations suivantes : d'une part, la diffusion diminue lorsque la longueur d'onde augmente. D'autre part, alors que, de manière générale, l'absorption est réduite dans l'infrarouge, on souhaite garder une certaine sensibilité dans nos mesures. Nous avons donc décidé de rester dans la gamme visible, tout en réduisant la contribution de la diffusion. Pour cette raison, nous avons utilisé un faisceau laser rouge de λ=635 nm.

Enfin, on a choisi un faisceau de section circulaire et de puissance irradiée P = 1.2 mW. On verra (empiriquement) que cette puissance est suffisante pour une bonne sensibilité et pas trop élevée pour endommager l'échantillon biologique.

3.1.3 Simulations numériques de l'interaction laser-sphère

Une sphère de rayon R centrée en (0,0,0) est définie par l'équation suivante :

(5) $$z = \sqrt{R^2 - x^2 - y^2}\ \text{en coordonnées cartésiennes}$$

L'expression de l'intensité d'un faisceau gaussien en un point de coordonnées (x, y) est donnée par :

(6) $$I_0(x, y) = I_0 e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{{\omega_0}^2}}$$

où I_0 est l'intensité mesurée au centre du faisceau $(x = 0, y = 0)$.

On souhaite calculer l'intensité transmise au travers d'une sphère en déplacement dans le faisceau. D'après la loi de Beer-Lambert, pour une intensité I_t à une profondeur z, la variation

d'intensité dI_t sur une tranche d'intégration dz est $dI_t = -2\beta I dz$, soit par intégration $I_t(x,y,z) = I_0(x,y)e^{-2\beta z}$. En utilisant (5) et (6), on obtient, à l'intérieur de la sphère (*i.e.* pour $\frac{x^2+y^2}{R^2} \ll 1$) :

(7) $$I_t(x,y) = I_0 e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{\omega_0{}^2}} e^{-2\beta R\sqrt{1-\frac{(x^2+y^2)}{R^2}}}$$

Pour simplifier l'écriture, nous noterons dorénavant $I_0(x=0, y=0)$ comme I_0. Pour obtenir l'intensité mesurée sur le détecteur, on intègre en x et y :

(8) $$I_t = \iint_s I_t(x,y)dxdy = I_0 \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{\omega_0{}^2}} e^{-2\beta\sqrt{1-\frac{(x^2+y^2)}{R^2}}} dxdy$$

Ici, on a considéré que la sphère de rayon R est parfaitement centrée en (x,y), mais lors de sa translation au travers du faisceau, cette dernière changera de coordonnées selon x. De plus, on verra (chapitre 2) qu'il est difficile qu'elle soit parfaitement centrée en y. Pour conserver une certaine généralité, on a défini les coordonnées (x_0, y_0) représentant la position de l'objet. On obtient ainsi l'expression générale finale d'intensité lumineuse transmise au travers d'une sphère de rayon R et de position (x_0, y_0), pour un faisceau gaussien centré en (x,y) :

(9) $$I_t(x_0,y_0) = \int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty} I_0 e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{\omega_0{}^2}} e^{-2\beta R\sqrt{1-\frac{(x-x_0)^2-(y-y_0)^2}{R^2}}} dxdy$$

La translation de la sphère dans le faisceau gaussien selon l'axe x sera donc simulée par une évolution de la coordonnée x_0.L'acquisition des données donnera $I_t(t)$ en fonction du temps t pour des sphéroïdes se déplaçant à la vitesse v. Il y a donc ici une équivalence directe entre x_0 et t, à condition que v soit bien constante (ce qui sera une des difficultés rencontrées au Chapitre 4) ou que la valeur instantanée de v soit mesurée directement (ce qui sera notre stratégie au Chapitre 5).

L'intégrale (9) sera calculée pour chacune de ces coordonnées, grâce à un script MATLAB (principe et code en annexe). Ce code comporte trois boucles de calcul imbriquées, permettant d'obtenir la $HWHM$ et le minimum d'atténuation, pour chaque couple de valeurs (R, β). Pour tous les calculs de ce manuscrit, la taille du faisceau sera maintenue constante, $2\omega_0 = 25\ \mu m$. On va maintenant réaliser une simulation sur une gamme de rayons d'objets de 25 à 150 µm, et de coefficient d'atténuation de 50 à 400 cm^{-1}. Cette gamme de β a été choisie sur la base de valeurs typiques rapportées dans la littérature. La difficulté est que les techniques de mesure sont souvent différentes (utilisation de méthodes directes ou indirectes) et que les échantillons (souvent des tissus ou tranches d'organes) sont variés (tissus fixés, congelés, ou fraichement extraits, déshydratés…) (Cheong *et al* 1990). La plupart des mesures de coefficient d'atténuation récentes ont été réalisés par OCT (voir section 1.4.3). Selon le type de tissu analysé, les valeurs trouvées varient de 0.1 à plus de 250 cm^{-1}. Par exemple, selon la localisation

dans le tissu, l'équipe de Johannes de Boer à l'Université d'Amsterdam a rapporté des coefficients d'atténuation de rétine humaine (Vermeer *et al* 2014) allant de 0.1 à ~100 cm^{-1}. Un autre travail réalisé par le groupe de Renu Virmani (Université du Maryland, Xu *et al* 2008) sur la plaque d'athérosclérose montre que pour des échantillons riches en lipides, β peut atteindre des valeurs proches de 300 cm^{-1}. Les mesures de β sur des sphéroïdes ou des mono-cultures 3D sont rares. A notre connaissance, les seules valeurs rapportées viennent des travaux de Chao Zhou (Washington, Huang *et al* 2017) sur des sphéroïdes tumoraux HCT116 (carcinome colorectal), par OCT, qui mesurent des β compris entre 3.6 et 6 cm^{-1}. La littérature témoigne de la largeur de la gamme de coefficients d'atténuation que nous pourrions retrouver, et justifie donc nos conditions de simulation. A l'exception de ces dernières valeurs, très faibles, la plupart des données pour β sont dans la gamme 50-400 cm^{-1} que nous avons choisie. Comme nous le verrons, des valeurs de $\beta \sim 1$ cm^{-1} ne rendraient absolument pas compte de nos mesures. Nous ne comprenons pas comment de telles valeurs en grand désaccord avec les nôtres (et celle des autres rapports dans la littérature) ont été déduites.

Profil de transmission en fonction de β, à R constant

La Figure 32 montre l'évolution de l'intensité lumineuse transmise en fonction du coefficient d'atténuation β, en gardant le rayon de la sphère constant (ici $R = 75$ µm). Comme attendu, on constate une diminution exponentielle du minimum de transmission I_{min} lorsque β augmente. Mais, de manière plus surprenante, on observe également un élargissement de la courbe d'absorption. Alors qu'une vision intuitive qualitative du phénomène nous conduit à penser que $HWHM$ correspond au rayon de la sphère, un calcul précis montre que, sur la gamme de β considérés, $HWHM$ est toujours inférieur à R et augmente lorsque β augmente. Aussi, en ne connaissant pas à priori β, on ne peut pas déduire directement de la $HWHM$ le rayon R du sphéroïde.

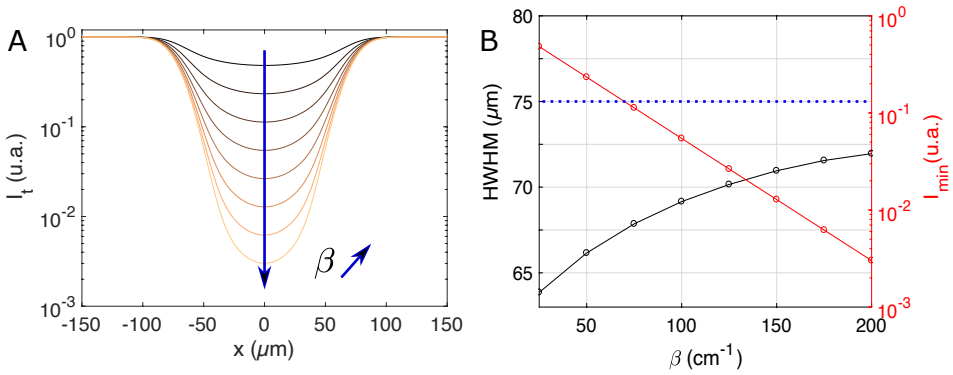


Figure 32 : Simulation du passage d'une sphère de rayon 75 µm et de coefficient d'atténuation β variant entre 50 et 400 cm^{-1} par pas de 50 cm^{-1} au travers d'un faisceau gaussien de largeur $2\omega_0 = 25$ µm. **A.** Intensité lumineuse transmise (I_t) en fonction de la position de la sphère dans le faisceau (translation selon l'axe x), pour différentes

valeurs de β. La position $x = 0$ correspond au centre du faisceau. **B.** Demi-largeur à mi-profondeur (HWHM, courbe noire, axe de gauche) et minimum d'intensité transmis (I_{min}, courbe rouge, axe de droite), en fonction de β. Pointillés : repère de rayon de sphère (75 µm).

Profil de transmission en fonction de R à β constant

Ici, on varie le rayon de la sphère entre 30 et 150 µm, gamme qui représente l'étendue typique des dimensions que peuvent prendre les sphéroïdes au cours de leur croissance. On a fixé β =200 cm^{-1}. La Figure 33 montre l'évolution de I_t en fonction de R.

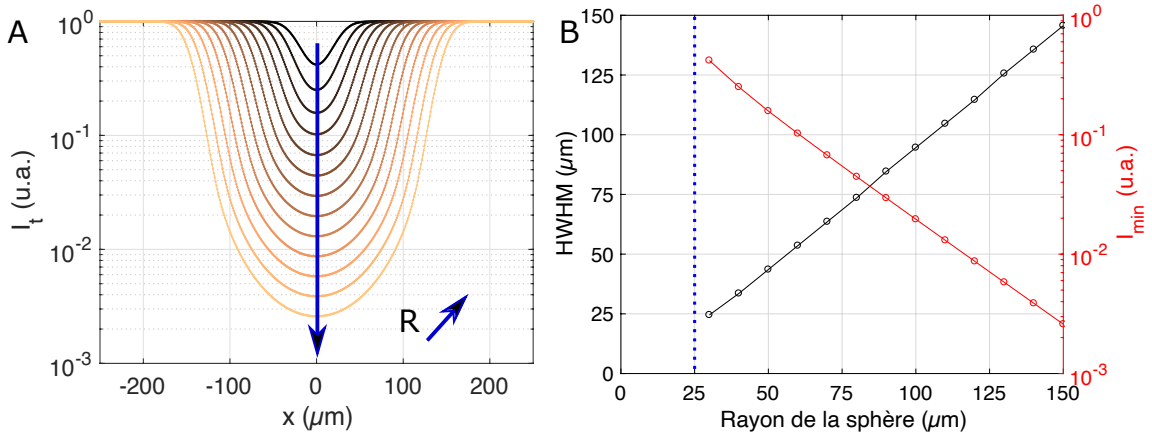


Figure 33 : Simulation du passage d'une sphère de coefficient d'atténuation β égal à 200 cm^{-1} et de rayon R variant de 30 à 150 µm par pas de 10 µm, au travers d'un faisceau gaussien de largeur $2\omega_0 = 25$ µm. **A.** Intensité lumineuse transmise (I_t) en fonction de la position de la sphère dans le faisceau (translation selon l'axe x), pour différentes valeurs de R. La position $x = 0$ correspond au centre du faisceau. **B.** Demi-largeur à mi-profondeur (HWHM, courbe noire, axe de gauche) et minimum d'intensité transmis (I_{min}, courbe rouge, axe de droite), en fonction de R. Ligne pointillée : limite basse de calcul de simulation – on a choisi R toujours supérieur à la largeur du faisceau gaussien.

On observe que la demi-largeur à mi-profondeur ($HWHM$) augmente proportionnellement avec le rayon R du sphéroïde Mais $HWHM \neq R$, comme déjà mentionné au paragraphe précédent. Un ajustement linéaire donne : $HWHM\ (\mu m) = 1.02 \times R(\mu m) - 7$. On vérifie aussi que I_{min} diminue exponentiellement avec R. On peut donc conclure, en tenant compte également des calculs de la section 3.1.3 , que I_{min} et $HWHM$ sont tous deux dépendants à la fois de R et de β.

3.1.4 Abaques $HWHM$ en fonction de R

La Figure **34**-A montre l'évolution de la demi-largeur à mi profondeur en fonction de R pour différentes valeurs de β. On y remarque que plus β augmente, plus le rapport entre R et $HWHM$ est proche de 1. Toutefois, cet écart n'est pas constant : il évolue avec R .

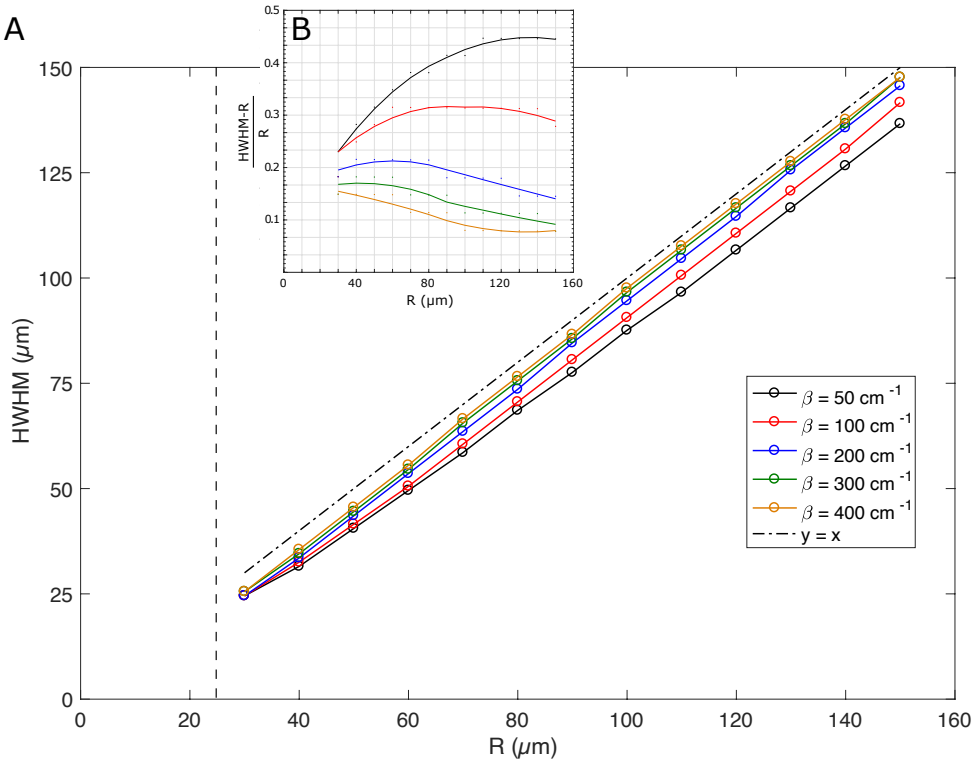


Figure 34 : Représentation graphique d'abaques simulées. A. Abaque reliant largeur à mi profondeur du pic de détection du passage d'une sphère dans un faisceau gaussien, et rayon de ladite sphère, pour 5 coefficients d'atténuation compris entre 50 et 400 cm-1. B. Évolution relative des écarts entre rayon de sphère R et HWHM calculée, pour des R compris entre 30 et 150 µm, et β couvrant une gamme de 50 à 400 cm-1. Les lignes continues sont des guides pour l'œil.

De manière surprenante, i) il n'y a pas de variation monotone de l'écart en fonction de R, et ii) l'écart a tendance à augmenter pour les faibles valeurs de beta tandis qu'il diminue pour les valeurs plus élevées. Quoi qu'il en soit, sur toute la gamme de β explorée, l'erreur entre $HWHM$ et R est au mieux de 8% (pour $\beta = 400\ cm^{-1}$) et une sphère de taille $R = 150\ \mu m$), mais cet écart peut atteindre 45% (pour $\beta = 50\ cm^{-1}$ et $R = 130\ \mu m$). On montre donc que la $HWHM$ du profil de transmission est dépendante du rayon de l'objet, mais aussi et de façon non négligeable de son coefficient d'atténuation.

De même, I_{min} dépend du produit $\beta \times R$. Aussi, nous avons décidé de nous diriger vers un système d'abaques de référence, permettant de faire ressortir des correspondances entre les

valeurs simulées et les paramètres de rayon et d'atténuation entrés dans le code MATLAB de simulation : $(R, \beta) \leftrightarrow (HWHM, I_{min})$.

On génère deux tables de références, une pour la $HWHM$ et une pour le minimum d'intensité détecté, comme suit :

β \ R	R_1	R_2	…	R_1	R_2	…
β_1	$HWHM(R_1, \beta_1)$	$HWHM(R_2, \beta_1)$	…	$I_{min}(R_1, \beta_1)$	$I_{min}(R_2, \beta_1)$	…
β_2	$HWHM(R_1, \beta_2)$	$HWHM(R_2, \beta_2)$	…	$I_{min}(R_1, \beta_2)$	$I_{min}(R_2, \beta_2)$	…
…	…	…	…	…	…	…

Tableau 2 : Principe d'abaques de référence générées par simulation.

Ces tables sont ensuite utilisées pour comparer expériences et simulation, et retrouver à l'aide d'un script MATLAB les couples (R, β) correspondants aux mesures $(I_{min}, HWHM)$. La précision entre la correspondance des couples entre les deux tables de référence est liée au pas de la simulation sur la gamme de rayons et de coefficients d'atténuation. La détermination sera d'autant plus précise que le nombre de rayons et de coefficients testés sera important. Aussi, les tables de référence finales disponibles en annexe ont été générées avec un pas de 1 µm pour R, et de 1 cm^{-1} pour β, résolutions qui sont adaptées à la qualification des échantillons analysés, sans toutefois nécessiter un temps de recherche de couple très long ou une machine puissante pour exploiter lesdites tables.

3.2 Profil de transmission de capsules cellulaires enfouies dans un gel : validation du dispositif optique

Notre analyseur optofluidique comprendra, à terme, un module fluidique et un module optique. Ici, nous souhaitons valider le dispositif optique et l'analyse proposée ci-dessus pour l'analyse de la taille et du coefficient d'atténuation. Nous avons donc immobilisé les capsules dans un capillaire de section carrée de dimensions $1 \times 1 \times 50$ mm. Cela nous permet de : i) les imager en microscopie classique pour obtenir leurs dimensions réelles en vue d'une comparaison avec notre analyse optique et de ii) les déplacer à une vitesse constante dans le faisceau laser. Pratiquement, on a mélangé une suspension de capsules cellulaires fixées avec un volume équivalent de Matrigel, mélange de protéines de la matrice extra-cellulaire (50 µl, 356234 Corning) liquide à 0°C, puis injecté ce mélange dans le capillaire à l'aide d'une micro-pipette. Les capsules alors en suspension dans le capillaire vont sédimenter sur le fond en quelques dizaines de secondes. Après quelques minutes à température ambiante, le Matrigel a formé un gel transparent qui maintient les capsules immobiles sur le fond du capillaire, même lors du déplacement de ce dernier. Ainsi on obtient un « porte-capsules » transparent et assez

fin pour pouvoir être amené et déplacé dans le faisceau (**Figure 35**). La manipulation du capillaire se fait au moyen d'un moteur pas à pas à indentation de 0,05 µm/pas (M-227, Physik Instrumente) qui est piloté par le logiciel PI MikroMove, couplé à un micro-manipulateur (Physik Instrumente), sur lequel est monté un logement pour le capillaire (CPS02B, Thorlabs, et adaptation imprimée en 3D).

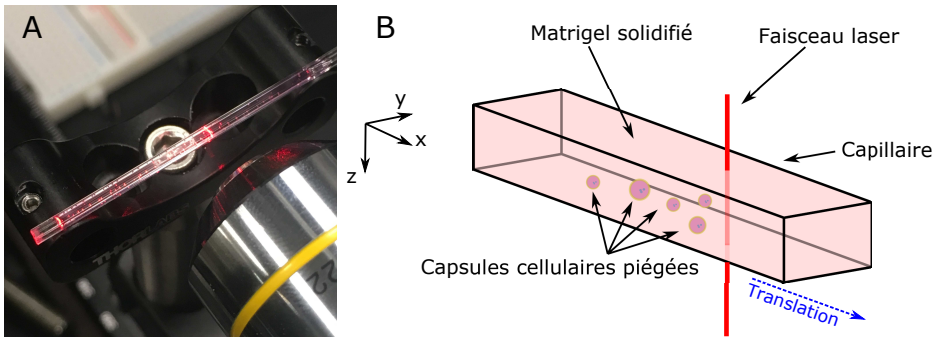


Figure 35 : Photographie et dession de principe du dispositif d'enfouissement de capsules dans du matrigel. **A.** Photographie du capillaire chargé de sphéroïdes. **B.** Vue schématique de l'immobilisation des capsules sur le fond d'un capillaire en verre à section carrée dans un hydrogel (Matrigel).

3.2.1 Montage optique d'analyse de capsules uniques par translation motorisée

Nous avons réalisé un montage optique permettant d'accéder à une largeur de faisceau de 25 µm sur une distance de 1.4 mm (Figure 36). On utilise un module laser compact de puissance 1.2 mW, à faisceau circulaire collimaté, de diamètre 2.9 mm, et de longueur d'onde 635 nm (CPS635R, Thorlabs). Ce faisceau est mis en forme par un système de lentilles (LB19-45A, LB1092-A, Thorlabs) réduisant le diamètre du faisceau à environ 200 µm. L'alignement selon l'axe optique est effectué avec deux miroirs (BB1-E02, Thorlabs). Le second miroir d'alignement dirige le faisceau le long de l'axe z , permettant de le focaliser verticalement le faisceau sur le capillaire « piège de matrigel » à l'aide d'un objectif de microscope (10x, RMS10X, Thorlabs). Le capillaire, orienté selon l'axe (x) et donc normal à la direction du faisceau, est monté sur un portoir mu par le moteur pas à pas piloté par ordinateur. Le faisceau lumineux ayant interagi avec l'échantillon est ensuite collecté par une lentille biconvexe de focale 75 mm (LB1901-A, Thorlabs) puis redirigé par un troisième miroir le long de l'axe (y), afin d'être divisé en deux faisceaux à l'aide d'une lame à polarisation tournante placée avant un séparateur de faisceau cubique polarisé (CCM1-PBS251, Thorlabs), et permettant de varier l'intensité du signal dans l'une ou l'autre des branches de séparation, selon l'utilisation du système. En effet, une des deux parties du faisceau séparé est focalisée sur un détecteur (PDA10A, Thorlabs) contenant une photodiode au silicium générant une tension comprise entre 0 et 5 V en sortie, proportionnellement à l'intensité lumineuse reçue sur une surface active

circulaire d'un diamètre de 1 mm. La gamme de longueurs d'onde détectée par cet élément se situe entre 200 et 1100 nm, avec un pic de sensibilité à 730 nm.

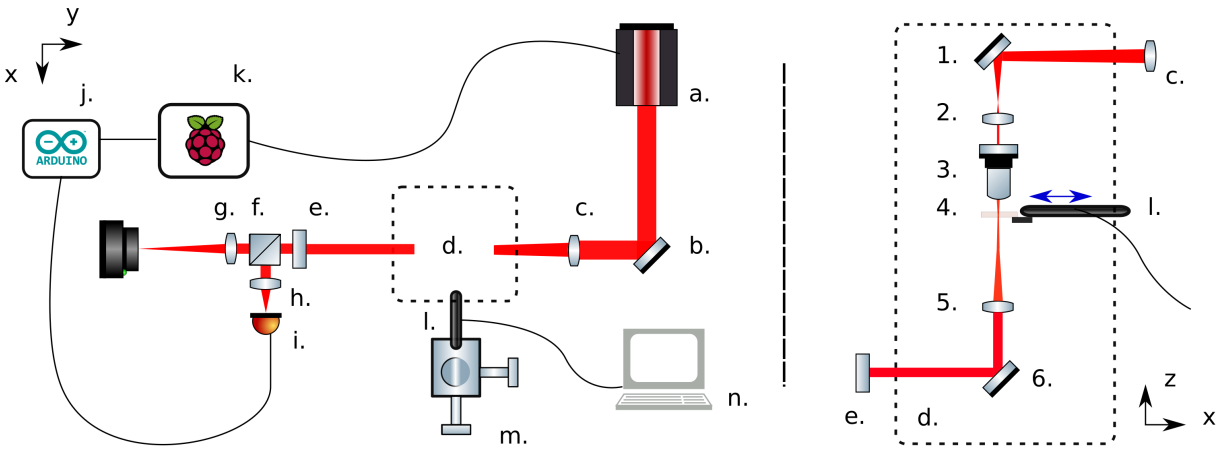


Figure 36 : Montage optique permettant l'analyse par translation de capsules uniques identifiées. **a.** Source laser collimatée circulaire, 1.2 mW, 635 nm, diamètre 2.9 mm. **b**. Miroir d'alignement. **C**. Lentille bi-convexe, f = 200 mm. **d.** Zone verticale : **1.** Second miroir d'alignement. **2**. Lentille bi-convexe, f = 15 mm, **3.** Objectif 10X Olympus plan achromat, ouverture numérique 0.25. **4.** Capillaire carré piégeant les capsules cellulaires et portoir. **5.** Lentille bi-convexede collection, f = 75 mm. **6.** Miroir redirigeant. **e**. Lame à polarisation variable. **F**. Lame séparatrice polarisée. **g.** Lentille bi-convexe, f = 150 mm. **h.** Lentille bi-convexe, f = 30 mm. **i.** Photodiode. **j.** carte électronique d'acquisition Arduino UNO. **k.** Micro-ordinateur RaspberryPI. **L.** Moteur pas à pas, translation selon l'axe x. **m.** Micromanipulateur 3 axes (x,y,z). **n.** Ordinateur de contrôle du moteur pas à pas.

Le signal temporel généré par ce détecteur est transmis directement à une carte électronique Arduino (Arduino UNO), pilotée par un micro-ordinateur RaspberryPi (Rpi v3 B+, Adafruit). L'autre partie du signal divisé par le module de séparation est focalisée sur une caméra RaspberryPi module 2, disposant d'un capteur couleur 8 Mégapixels, pour une taille de pixel carré de 1.12 × 1.12 µm. Ce module caméra, initialement vendu pour des applications de vidéo-surveillance a été modifié pour notre utilisation, en retirant une lentille plastique intégrée permettant une image grand champ, afin d'accéder directement au capteur CMOS sans optique intermédiaire. L'image retransmise est ensuite transférée au micro-ordinateur RaspberryPi. La lame de séparation polarisée tournante permet donc d'envoyer plus ou moins de signal sur l'un ou l'autre de ces deux éléments, pour choisir le mode de fonctionnement : observation et alignement optique (module caméra) ou détection temporelle (photodiode).

3.2.2 Interface utilisateur et acquisition des données expérimentales

Le micro-ordinateur RaspberryPi a permis le développement d'une interface de contrôle du système et d'acquisition de mesures par le détecteur, ainsi que d'images et de vidéos par le biais de la caméra. Ce programme dénommé « Capsula » a été codé en langage *Python 3.7* et présente une interface utilisateur graphique créée à l'aide de l'outil *Qt Designer*, dans un

environnement *Windows 10*. Le reste du code de programme, comprenant l'acquisition des données, le traitement des images de la caméra, la communication entre les différents composants électroniques, l'enregistrement et le référencement des fichiers de données, a été écrit dans un environnement *UNIX* (*Debian Jessie, Raspbian*) afin d'assurer la meilleure compatibilité possible avec le micro-ordinateur Raspberry. L'entièreté du code informatique de ce programme d'analyse repose sur des ressources et bibliothèques *Python* libres de droit, rendant son amélioration, copie et modification réalisables à l'envi. Il en va de même pour le script d'acquisition Arduino utilisé dans le micro-contrôleur UNO.

Cette partie électronique du système a donc pour missions de : i) acquérir les données temporelles mesurées par le détecteur PDA10, selon une fréquence d'échantillonnage définie par l'utilisateur, ii) contrôler l'alimentation de la source laser, iii) recueillir l'image en provenance du module caméra et analyser ces dernières. Pour rendre ces possibilités intuitives pour l'utilisateur, l'interface du logiciel a été divisée en plusieurs onglets.

Un premier volet permet de contrôler le laser, mais également le temps d'exposition de la caméra, ainsi que d'afficher l'image de cette dernière en temps réel, enregistrer des photos et des vidéos, et tracer le profil d'intensité des images enregistrées, afin de contrôler et mesurer la largeur à mi-hauteur de ce profil, grandeur permettant de remonter à la largeur du faisceau. On a également implémenté une option de contrôle d'un second laser de longueur d'onde 532 nm, qui n'a pas été encore exploitée. Cette partie de l'interface est visible sur la Figure 37.

Le deuxième volet de ce programme permet de contrôler des moteurs pas à pas ou des pompes d'injection péristaltiques. L'électronique de contrôle associée a été réalisée, mais n'a pas été utilisée pour des raisons de compatibilité entre le moteur PI et les bibliothèques python employées. Aussi, avec un autre type de moteur, on pourrait se passer d'un second ordinateur, et contrôler l'entièreté du système via le RaspberryPi.

Le troisième volet est consacré à la détection et la représentation en temps réel des résultats (Figure 38). Il permet aussi de contrôler les paramètres de détection des objets. En effet, selon la vitesse de translation des échantillons dans le faisceau, on va souhaiter adapter la fréquence d'acquisition de la tension renvoyée par le détecteur. De plus, il est également intéressant de pouvoir normaliser les données brutes au maximum d'intensité lumineuse détecté, c'est-à-dire en analysant le faisceau sans échantillon. On a la possibilité, via le bouton « make reference » de stocker cette valeur de « blanc », qui est calculée sur une détection automatique de dix secondes, en prenant la moyenne des valeurs détectées dans cet intervalle de temps. Cet onglet permet également de sélectionner le mode d'affichage des résultats (segmenté ou continu).

Automatiquement et selon les options activées dans le panneau « options », le système enregistrera les données normalisées, brutes, les caractéristiques du faisceau, ainsi que la vidéo du passage de l'objet dans le faisceau au moment de la détection. Ces fichiers seront alors stockés dans un dossier daté de l'heure et du jour de détection, afin de faciliter une exploitation ultérieure. Enfin, il est possible d'accéder à l'interface de détection et au répertoire de stockage

depuis un ordinateur distant, le système étant relié à un serveur permettant l'archivage et la sauvegarde des acquisitions réalisées.

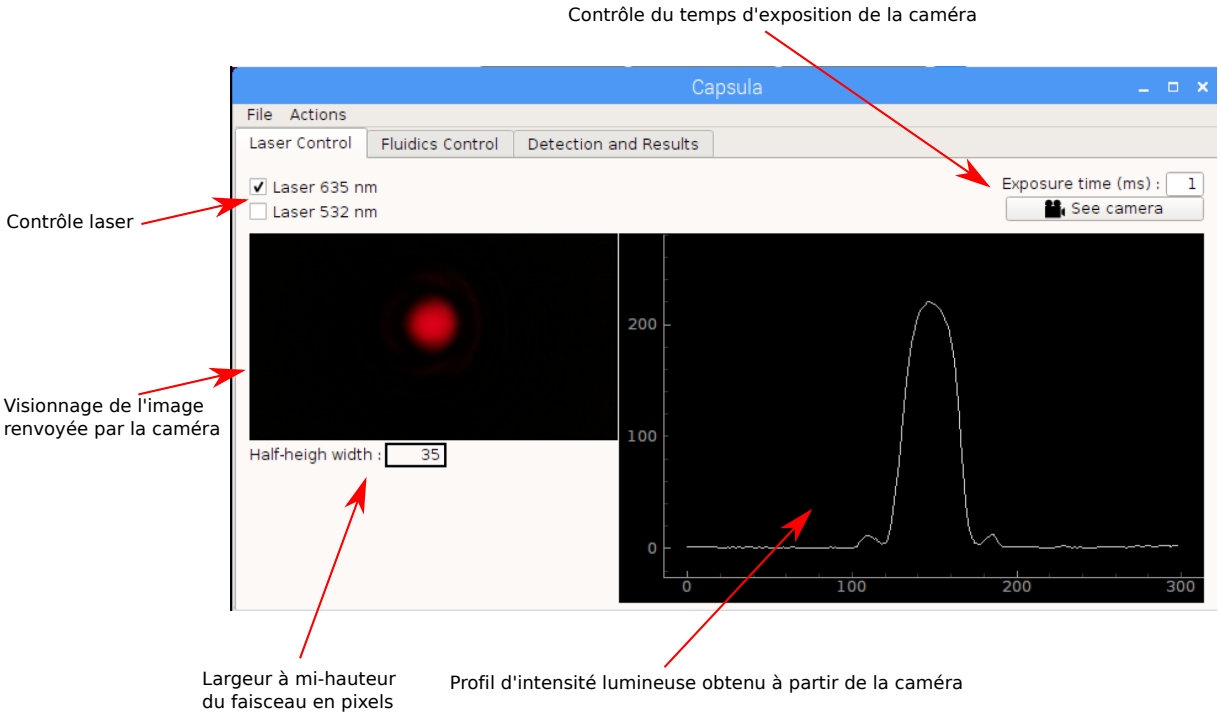


Figure 37 : Capture d'écran du premier onglet du programme Capsula, permettant le contrôle du laser et l'acquisition d'images par le module caméra.

Afin d'acquérir les données en temps réel et de les inscrire dans un fichier texte qui sera ensuite stocké sur un support physique, on a utilisé une carte électronique open source (Arduino UNO), de faible coût, permettant de recevoir la tension générée par le détecteur PDA10 en fonction de l'intensité lumineuse reçue, puis de convertir ce signal analogique en signal numérique encodé sur 8 bits, qui sera transféré via port série au RaspberryPi, à la vitesse de 115200 Bauds (Caractère/s). Cette vitesse de transmission maximale définie par la carte électronique utilisée permet au mieux une fréquence d'acquisition de 25 ms.

C'est pourquoi on va devoir adapter la vitesse de passage de l'échantillon dans le faisceau afin d'être plus ou moins résolus spatialement lors de la translation. En effet, plus la vitesse de la capsule sera lente, plus le nombre de points détectés au cours du passage sera important.

Afin de caractériser correctement les capsules, on a choisi de se fixer à une vitesse de translation de 100 µm/s, soit, pour une capsule de 200 µm de diamètre, un intervalle de 2.5 µm entre chaque mesure, et un total de 80 points de données. Le code source du logiciel *Capsula* est disponible à l'adresse : https ://github.com/celiwan/Capsula.

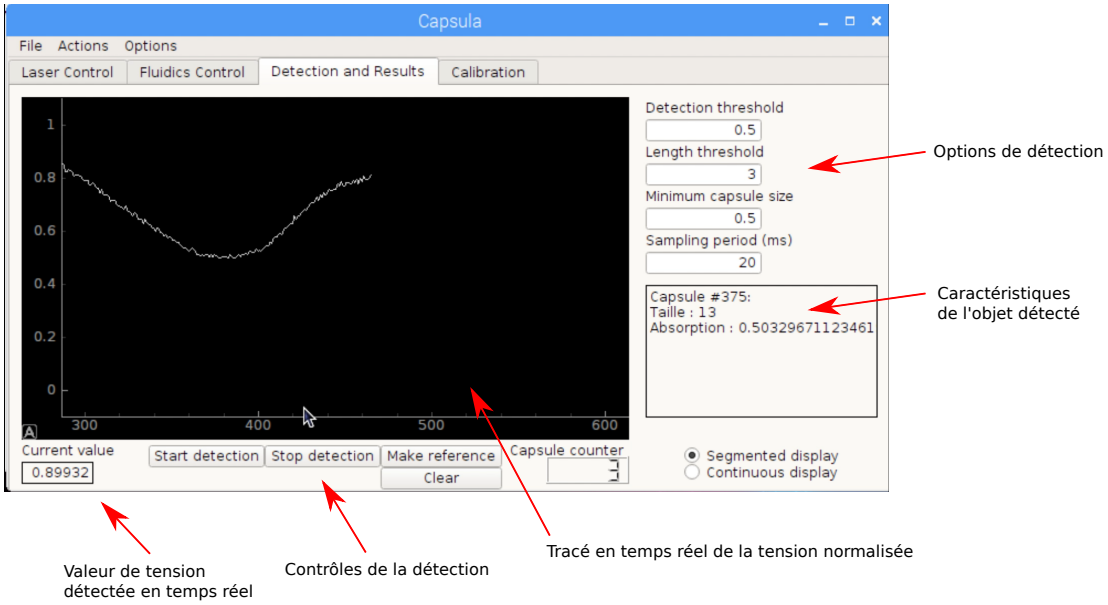


Figure 38 : Capture d'écran du volet « détection » du logiciel Capsula.

3.3 Résultats

3.3.1 Étude de de l'influence du milieu environnant sur le signal de transmission

Avec la perspective de conduire ces mesures d'extinction sur une suspension de capsules en culture, nous avons commencé par nous demander quelle est la contribution du milieu liquide environnant sur le signal mesuré. Les milieux de culture classiquement utilisés sont roses (par ajout de rouge de phénol) puis virent au jaune lorsqu'ils s'acidifient. De même, la concentration de glucose, initialement élevée dans des milieux frais, baisse au fur et à mesure que les cellules prolifèrent et consomment les nutriments. On a donc mesuré l'intensité lumineuse transmise par le faisceau laser gaussien traversant i) de l'eau milliQ ultrapure (Millipore), ii) du Matrigel coloré par du rouge de phénol, iii) du Matrigel sans rouge de phénol, iv) du milieu de culture DMEM complémenté de 4.5 grammes de glucose par litre, v) du DMEM complémenté de 1 gramme de glucose par litre. On utilise la valeur moyenne correspondant à l'eau milliQ ultrapure comme référence pour normaliser les autres mesures. Celles-ci ont été réalisées sur une durée minimum de 12 secondes, avec une période d'échantillonnage de 25 ms, soit environ 500 points de données pour chaque condition. Le signal, stable sur une durée d'acquisition de 12 secondes, est un peu atténué dans tous les milieux (de culture, ou gel) autres que l'eau pure, mais la diminution est de l'ordre de 5-10%. On est également faiblement sensible à la variation de concentration en glucose dans les deux échantillons de milieu DMEM, ce qui suggère que la richesse du milieu en nutriments (milieu frais versus milieu conditionné) n'impactera pas beaucoup les mesures de transmission. De

toute façon, on réalise un « blanc » avant toute détection : le bouton « make reference » de l'interface utilisateur présentée au paragraphe 3.2.2 permet d'obtenir une valeur moyenne sur un échantillon d'une centaine de points de mesure.

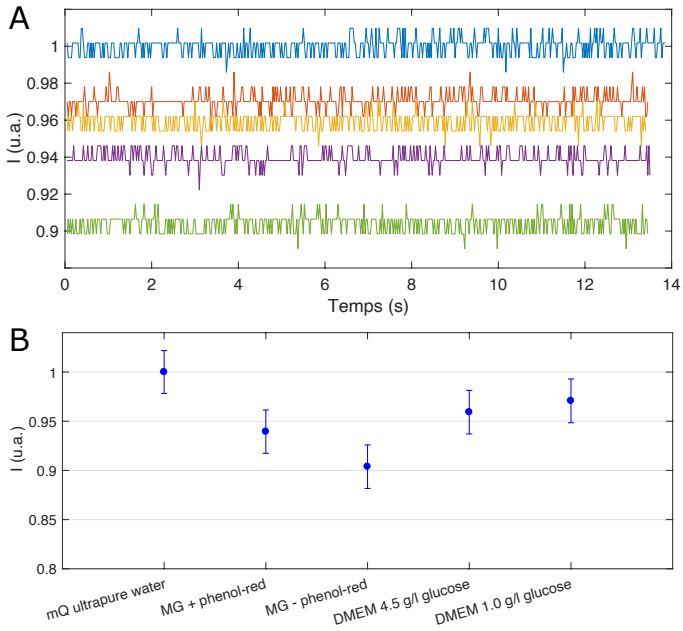


Figure 39 : Caractérisation de l'atténuation de l'intensité lumineuse du laser 635 nm par différents milieux. **A.** Courbes brutes d'intensité lumineuse transmise détectées au travers de différents milieux et espèces chimiques utilisées dans nos expériences, sur une durée d'une dizaine de secondes. — Eau mQ, — DMEM (glucose 1g/L), — DMEM (glucose 4.5g/L), — Matrigel sans rouge de phénol, — Matrigel avec rouge de phénol. **B.** Valeurs moyennées obtenues d'après les données brutes. Barres d'erreur : écart-type à la moyenne.

Le bruit identifié (**Figure 39**-A.), est principalement dû à la carte d'acquisition Arduino UNO, et plus spécifiquement à son convertisseur analogique vers numérique, qui discrétise les valeurs mesurées sur 4 chiffres significatifs. En se reportant aux abaques de I_{min} et en appliquant la variation de mesure induite par le bruit à une simulation pour un sphéroïde classique de rayon 75 µm et d'un coefficient d'extinction de 200 cm^{-1}, on trouve qu'à I_{min}, le bruit détecté (Fig. 17A) correspond à une erreur d'environ 2 cm^{-1} sur le β estimé Il serait possible d'améliorer les paramètres d'acquisition (résolution de mesure, vitesse) en utilisant une carte électronique plus performante (*i.e.* redPitaya, NI DaqmX), mais plus onéreuse et complexe à programmer, et qui permettrait d'atteindre des résolutions de mesure 15 à 20 fois supérieures. Néanmoins, les caractéristiques de la carte Arduino UNO sont suffisantes pour prouver le concept de l'instrument et récolter des données exploitables.

3.3.2 Validation de la mesure de rayon des sphéroïdes

Nous allons ici confronter les résultats issus des calculs numériques rapportés dans des abaques aux mesures expérimentales. On considère des sphéroïdes de cellules HuH6 fixés à trois temps différents, séparés de plusieurs jours d'intervalle. On les enfouit dans un capillaire

en verre rempli d'un gel (voir 3.2.1), puis on les visualise par microscopie en champ clair (Nikon 3DS, 4x, NIS Elements), et on les balaye dans le faisceau laser.

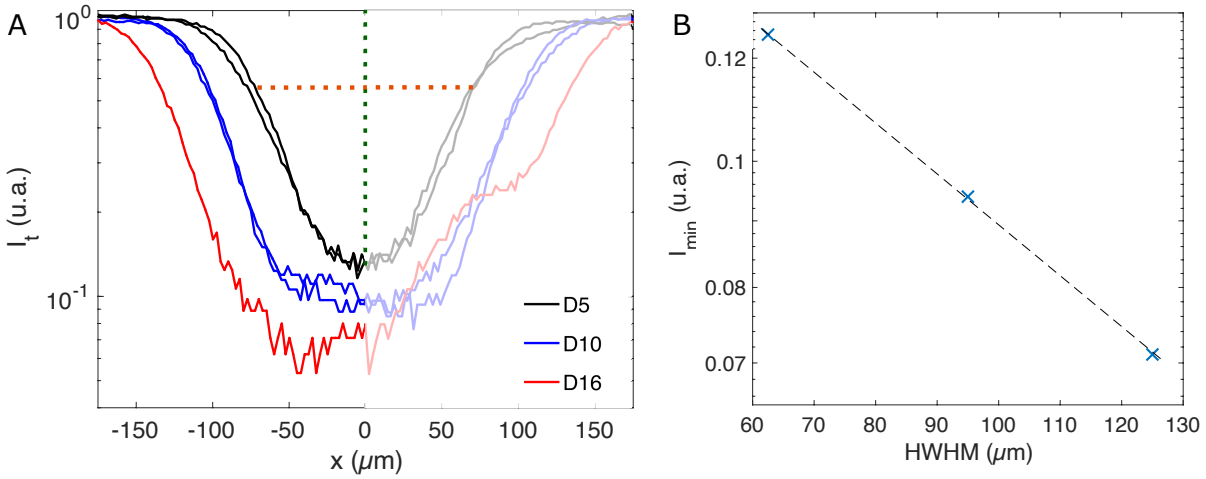


Figure 40 : Passage de sphéroïdes au travers du faisceau gaussien. **A.** Intensité transmise au travers de sphéroïdes de cellules HuH6 âgés de 5, 10 et 16 jours, selon leur position dans le faisceau laser. Ligne en pointillés orange : exemple de largeur à mi-hauteur (courbe noire). Ligne en pointillés verte : axe de symétrie permettant de déterminer l'intensité minimum de transmission. **B.** Intensité minimale transmise I_{min} en échelle semi-logarithmique au travers des sphéroïdes en fonction de la $HWHM$ des traces.

De manière qualitative, on constate que $HWHM$ et I_{min} augmentent avec le temps de culture, c'est-à-dire lorsque le rayon R augmente. On note que la courbe à 16 jours de croissance proposée à la présente une asymétrie. Ceci peut être dû à une asphéricité, donc à une variation d'épaisseur de l'organoïde. Pour l'analyse qui va suivre, nous considérerons uniquement la moitié du signal qui ne présente pas d'accident.

En parallèle, nous définissons R_{im} le rayon moyen de chaque organoïde, imagé en fond clair et analysé avec le logiciel *ImageJ*. Pratiquement, on mesure la section A des agrégats et on obtient $R_{im} = \sqrt{\frac{A}{\pi}}$.

Pour détecter I_{min}tout en évitant de prendre la valeur pic de l'intensité, facile à obtenir par une analyse automatique, mais qui pourrait correspondre à du bruit, on cherche la valeur de I_t pour laquelle la demi-largeur à mi-hauteur du signal est en zéro. On trace alors $I_{min} = I_t(0,0)$ en fonction de R_{im}. Comme $\ln\left(\frac{I_{min}}{I_0}\right) = -2\beta R$, de la pente de la droite en échelle semi-logarithmique (**Figure 41**), on en déduit $\beta = 110 \pm 25$ cm^{-1}. On trace ensuite $HWHM$ (mesuré à la **Figure 40**) en fonction du rayon R_{im} déduit par imagerie (**Figure 42**).

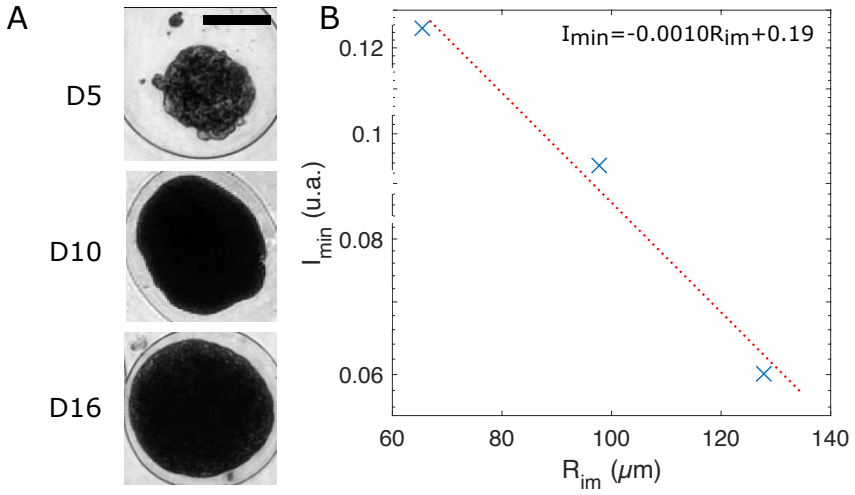


Figure 41 : Obtention de β par la loi de Beer-Lambert. **A.** Images par microscopie en champ clair des échantillons. Barre d'échelle : 100 µm. **B.** Intensité minimale transmise I_{min} en échelle semi-logarithmique au travers des sphéroïdes en fonction de leur rayon R_{im} déduit par microscopie optique.

On retrouve bien, comme dans les simulations, que $HWHM < R_{im}$. On utilise alors R_{im} et β pour tracer le profil de détection attendu sur les 3 sphéroïdes considérés (**Figure 43**-A). On observe que la courbe déduite des simulations rend bien compte de I_{min} et de la $HWHM$, mais il y a une déviation importante en bord de sphéroïde. On joint deux autres courbes, présentant des simulations pour lesquelles on fait tout d'abord varier R en gardant β constant (**Figure 43**-B), puis en faisant varier β (**Figure 43**-C). Ces variations sont réalisées pour voir si, en donnant plus de poids aux bords du sphéroïdes, on peut ajuster correctement les données expérimentales. Les courbes expérimentales ont une queue plus étendue que les courbes théoriques. Pour mieux ajuster le bord, une solution serait alors de supposer que l'on sous-estime R.

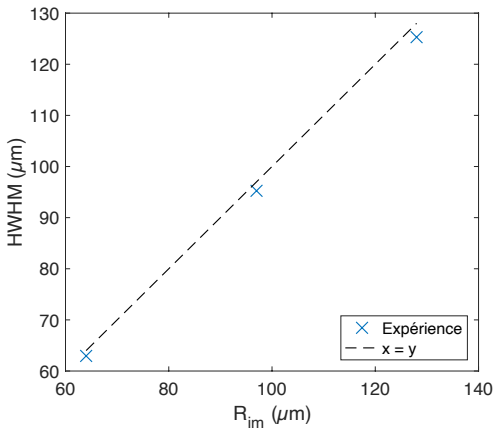


Figure 42 : Évolution de la HWHM en fonction du rayon R_{im} obtenu par imagerie.

Comme le montre la **Figure 43**-B, cela permet un meilleur ajustement des queues de courbes mais génère un ajustement très peu satisfaisant de $HWHM$ et de I_{min}. Mais lorsque

l'on conserve les rayons permettant d'ajuster les bords et que l'on essaie de compenser avec une variation de β de manière à faire correspondre la $HWHM$ de la simulation et de l'expérience, on constate que I_{min} est alors très largement sous-estimé (**Figure 43**-C). En utilisant comme contrôle les mesures des rayons par imagerie, nous avons donc montré que la $HWHM$ du signal de transmission et la mesure de I_{min} permettent d'obtenir une bonne estimation de R et de β. Toutefois, pour être complètement rigoureux, il faut reconnaître que les courbes expérimentales et théoriques montrent une déviation significative en bord de sphéroïde. Même si cela n'est pas a priori préjudiciable par rapport à l'objectif fixé, nous souhaitons approfondir l'origine de cette différence.

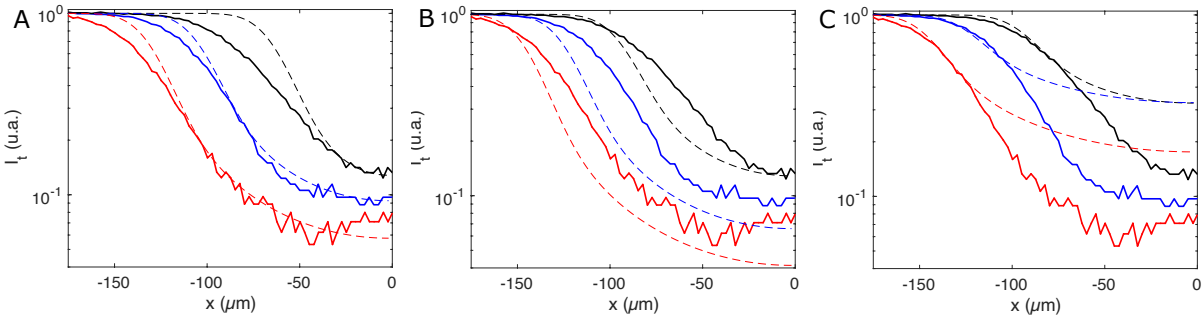


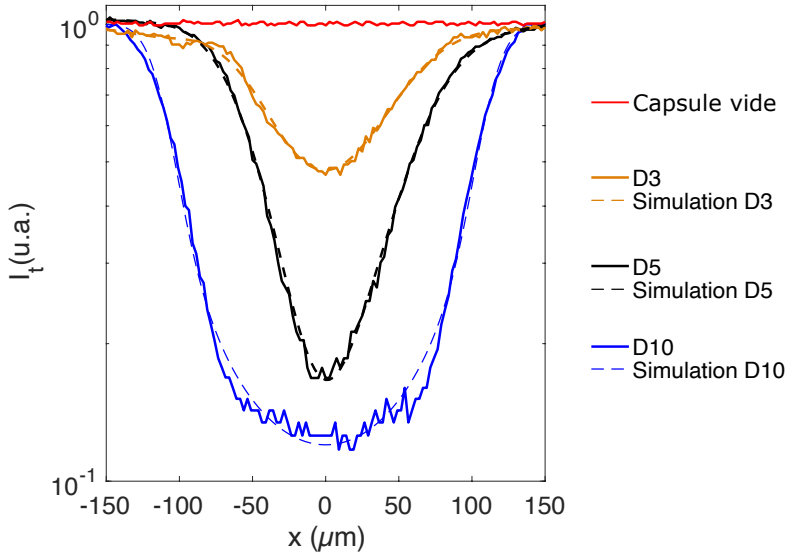
Figure 43 : Comparaison entre courbes expérimentales et simulations pour différentes valeurs de β et de R. — D5, — D10, — D16, --- Simulation D5, --- Simulation D10, --- Simulation D16. A. Courbes expérimentales et simulations avec $R = R_{im}$ et β déduit de la loi de Beer. --- R=65 µm β=110 cm^{-1}, --- R=97 µm β=110 cm^{-1}, --- R=134 µm β=110 cm^{-1}. B. Demi-courbes expérimentales et simulations ajustées aux bords, en variant R de +30 µm pour D5, +20 µm pour D10 et +10 µm pour D16, et β déduit de la loi de Beer. --- R=95 µm β=110 cm^{-1}, --- R=117 µm β=110 cm^{-1}, --- R=145 µm β=110 cm^{-1}. C. Demi-courbes expérimentales et simulations avec R de même valeur qu'en B., de façon à conserver l'ajustement des bords, mais en faisant varier β pour ajuster également la $HWHM$ simulée et la $HWHM$ expérimentale. --- R=95 µm β=60 cm^{-1}, --- R=117 µm β=45 cm^{-1}, --- R=145 µm β=60 cm^{-1}.

Par microscopie, nous avons mesuré le rayon du sphéroïde dans la capsule, et non celui de la capsule entière. Nous avons donc fait l'hypothèse que la présence de la coque d'alginate, très transparent, n'altérait pas le signal de transmission ce qui est ce qui est confirmé par la trace d'une capsule vide (Figure 44). Le test critique consiste cependant à décapsuler les sphéroïdes, c'est-à-dire dissoudre la coque en les plaçant dans une solution de tampon phosphate salin (voir Annexes section 8.3) et réitérer les mesures précédentes.

Puisque les capsules sont enfouies dans du matrigel au cours des mesures, la dissolution de la coque ne peut pas se faire in situ. On ne peut donc pas directement comparer un même agrégat avant et après décapsulation. En revanche, nous nous attendons à voir un impact sur l'allure des queues de signal. La **Figure 44** montre en un ajustement remarquable avec les courbes théoriques. On peut par ailleurs vérifier que la valeur de β déduite de ces courbes, $\beta = 107\ cm^{-1}$, est proche mais inférieure à la valeur précédente. Il est possible que la diffusion des

rayons lumineux par la capsule, même minime influe sur l'atténuation générale. Finalement, la présence de la capsule était bien responsable de la déviation aux bords. Soit la coque d'alginate ajoute une absorption supplémentaire (ce qui n'est pas très visible sur notre expérience contrôle de coque vide), soit l'interface agrégat-alginate dévie la lumière lors de l'entrée et de la sortie du sphéroïde dans le faisceau et génère la modification du profil observé. Néanmoins, on a remarqué précédemment que cette déviation avait une influence faible sur les valeurs des deux grandeurs d'intérêt R et β déduites de $HWHM$ et I_{min} (**Figure 43**-A). Lors des prochaines expériences, par souci de practicité, on ne procèdera donc pas à une décapsulation des sphéroïdes avant leur analyse optique.

Figure 44 : Intensité transmise au travers d'une capsule vide et de sphéroïdes de cellules HuH6 décapsulés âgés de 3, 5 et 10 jours, en fonction de leur position dans le faisceau laser.



Un autre moyen d'obtenir le coefficient d'atténuation des sphéroïdes pourrait être d'utiliser des images en champ clair, et de tracer le profil d'intensité des pixels d'une ligne traversant le sphéroïde et passant en son centre (**Figure 45**-A). Ainsi, on pourrait appliquer la loi de Beer-Lambert aux mesures du rayon (R_{im}) et à l'intensité de pixel minimale ($I_{pix\,min}$) : $\ln\left(\frac{I_{pix\,min}}{I_{pix\,0}}\right) = -2\beta R_{im}$, $I_{pix\,0}$ étant l'intensité de pixel maximale mesurée dans le profil, hors de l'agrégat. En échelle logarithmique, à partir d'une analyse sur des images brutes (non lissées), le bruit est important, ce qui renforce l'utilité de notre approche sans image. Toutefois, qualitativement, on retrouve une diminution de l'intensité transmise au travers des agrégats multicellulaires qui augmente avec leur taille. Pour être plus quantitatif, on mesure le niveau moyen de cette intensité minimale et on en déduit le β correspondant. À D5, $\beta = 99$ cm^{-1}, à D8, $\beta = 120$ cm^{-1} et à D10 $\beta = 121$ cm^{-1}. Ces valeurs, proches de celle trouvée par l'analyseur ($\beta = 110 \pm 25$ cm^{-1}) ne sont pas forcément représentatives de toute la population. Ces

expériences liminaires confirment néanmoins l'ordre de grandeur des β obtenus (en désaccord avec les valeurs obtenues par OCT par Chao Zhou (Huang *et al* 2017).).

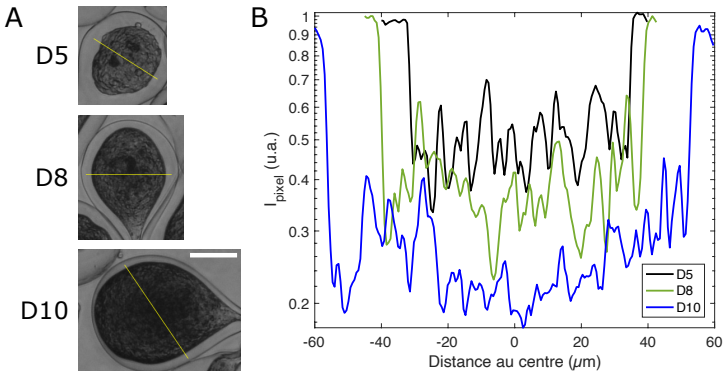


Figure 45 : Analyse d'images de sphéroïdes de cellules HuH6 par microscopie en champ clair. **A.** Images de trois capsules à 5,8 et 10 jours après encapsulation. Ligne jaune : tracé des profils d'intensité. Barre d'échelle commune : 50 µm. **B.** Intensité de pixel (niveaux de gris normalisés) le long des lignes tracées en A.

Puisque l'on veut éviter d'imager les sphéroïdes et que les expériences précédentes ont validé notre système d'abaques, nous utiliserons dorénavant cette approche pour suivre la croissance des sphéroïdes et les changements éventuels des propriétés optiques liées au contenu cellulaire.

3.3.3 Statistiques et sources d'erreur

La Technique des Capsules Cellulaires produit des capsules dont le rayon est fixé par l'instabilité de Rayleigh spontanée, donc présente une certaine dispersion de taille (estimée à 16%) et une asphéricité (caractérisée à la section 2.2.3). Par ailleurs, la quantité de cellules initialement encapsulée varie d'une capsule à une autre, et influe sur le taux de remplissage des capsules (**Figure 46**-A). Nous avons commencé par étudier la dispersion des tailles de sphéroïdes à un temps donné après encapsulation. A ce stade, sans intégration du système microfluidique, nous ne pouvons pas atteindre une statistique élevée ($N < 10$ capsules). Si l'on peut s'attendre à observer des variations de taille, cette analyse a pour but de nous donner la précision obtenue sur la détermination du coefficient d'atténuation.

La **Figure 46** montre l'exemple de capsules de cellules HuH6 à D10. On observe que les $HWHM$, donc approximativement les rayons, varient sur une gamme allant de 30 à 110 µm, avec une valeur moyenne $\bar{R} = (75 \pm 13)$ µm et plus important, $\bar{\beta} = (133 \pm 28)\ cm^{-1}$, pour N = 4. Cette variation sur β vient-elle d'une hétérogénéité cellulaire ou est-elle liée à notre mode de détection et d'analyse ? Il est difficile de conclure à ce stade du fait d'une faible statistique. Nous réaborderons ce point au Chapitre 5.

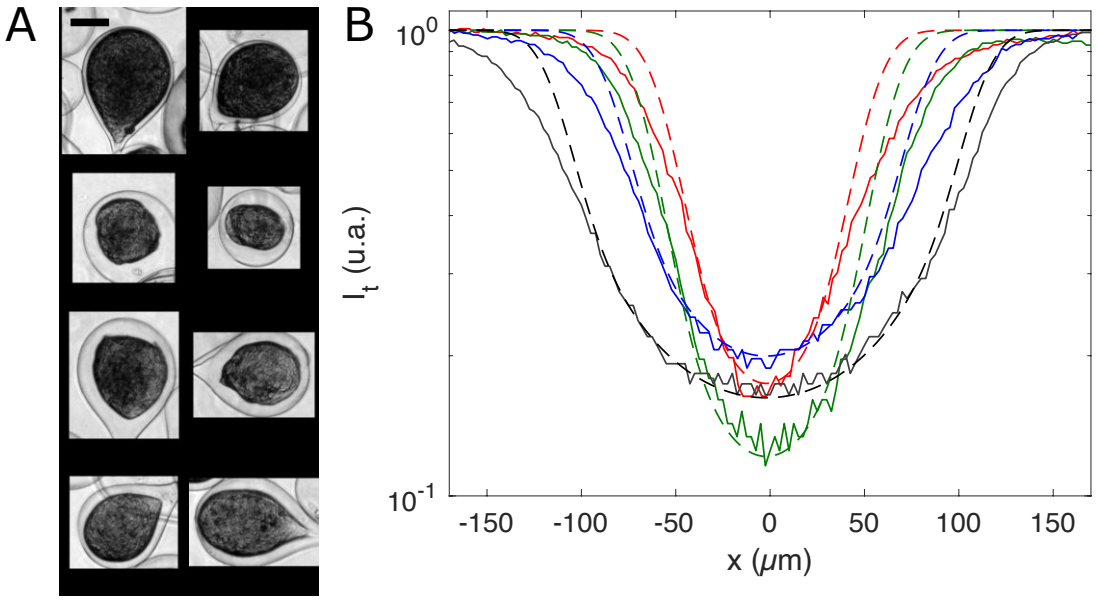


Figure 46 : Exemple de mesure. **A.** Montage représentatif de la population de capsules analysée. Barre d'échelle commune : 100 µm. **B.** Intensité transmise au travers de sphéroïdes de cellules HuH6 âgés de 10 jours en fonction de leur position dans le faisceau laser.

Notons également qu'une source d'erreur supplémentaire peut provenir d'une non-sphéricité de certains agrégats, voire du fait qu'aux temps courts après encapsulation, il peut y avoir plusieurs petits agrégats qui vont finir par fusionner. La mesure optique va donc dépendre de l'orientation et de la disposition de ces agrégats par rapport à l'axe de déplacement relatif du faisceau. Un tel exemple est montré sur la **Figure 47** qui associe le signal de transmission et l'image de la capsule correspondante. En analysant les données obtenues à la **Figure 47**-B, on trouve un coefficient d'atténuation β de 40 cm^{-1} pour un rayon équivalent déduit de l'analyse d'images ($R_{im} = \sqrt{\frac{A}{\pi}}$) de 93 µm, calculé à partir de l'aire de section. Cette mesure surestime le rayon par rapport à la $HWHM$ dans le cas de petits sphéroïdes mal agrégés.

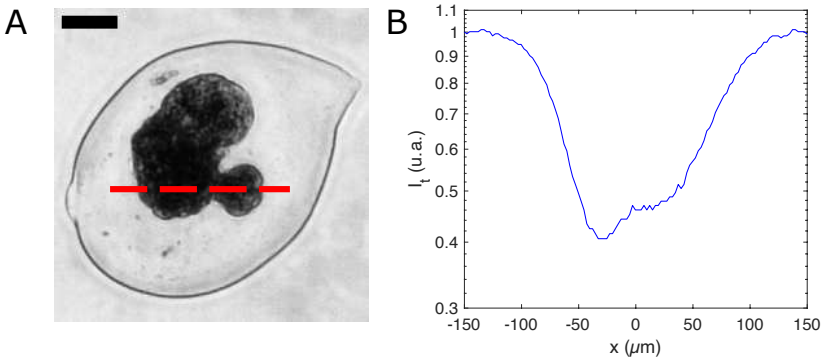


Figure 47 : Cas particulier de mesure. **A.** Imagerie par microcopie en champ clair d'un sphéroïde de cellules HuH6 âgé de 3 jours (4x, NIS Elements). Barre d'échelle : 50 µm. Ligne pointillée : axe de déplacement dans le faisceau. **B.** Courbe expérimentale associée au sphéroïde imagé : intensité lumineuse transmise au travers de l'échantillon en fonction de sa position dans le faisceau laser.

À l'aide du script d'exploitation des abaques, on obtient un coefficient d'atténuation de 153 cm^{-1} et un rayon de 72 µm. Dans notre cas, la $HWHM$ est interprétée sur des abaques qui considèrent l'objet comme parfaitement sphérique.

De plus, comme on l'a vu à la section 3.1.4 , une légère différence de $HWHM$ impacte de façon non négligeable le couple (R, β) déduit des abaques. Pour éviter au maximum ce souci d'identification, on centrifuge les échantillons après encapsulation, à 300G pendant 10 minutes, ce qui tend à forcer l'agrégation des cellules en amas sphériques.

3.3.4 Impact de l'ellipticité des agrégats

Pendant et après la confluence, on remarque à l'œil que les agrégats cellulaires épousent la forme de la capsule, qui est plus ellipsoïdale que sphérique 'voir caractérisation de la sphéricité au Chapitre 2). On s'interroge alors sur l'impact d'une telle géométrie sur la simulation, qui considère les agrégats comme parfaitement sphériques. Nous avons donc modifié l'algorithme pour y inclure l'équation d'un ellipsoïde : $\frac{x^2}{a^2} + \frac{y^2}{b^2} + \frac{z^2}{c^2} = 1$, où a est la longueur du demi grand-axe, et b et c les longueurs des demis petits-axes. Pour plus de simplicité dans le calcul et parce qu'il nous est impossible expérimentalement de déterminer la taille du petit-axe selon la dimension z, nous faisons l'approximation que $b = c$. Dans le cas d'ellipsoïdes, l'orientation de ces derniers par rapport à la direction de translation dans le faisceau gaussien impacte également les mesures. Ce phénomène est explicité à la Figure 48, dans laquelle on note que deux cas limites sont possibles : i) le grand axe de l'ellipsoïde est parallèle ou ii) perpendiculaire à la direction de translation.

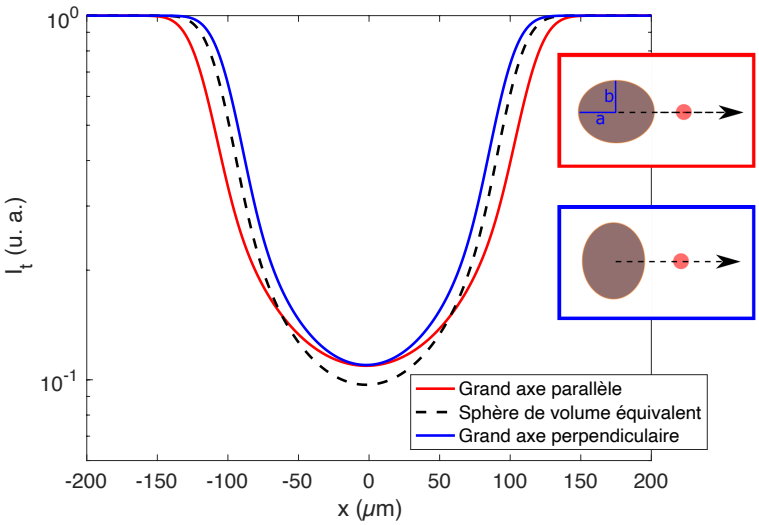
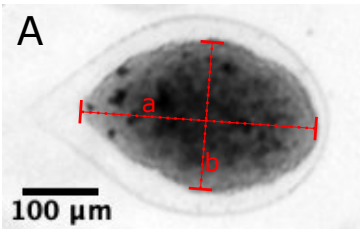


Figure 48 : Simulations de l'intensité transmise au travers d'un ellipsoïde (demi grand axe = 120 µm, demi petit axe = 102 µm, $\beta = 110$ cm^{-1}, Sphéricité S = 0.85) orienté dans les deux cas limites par rapport à sa direction de translation et au travers d'une sphère de volume équivalent (r = 107 µm, β = 110 cm^{-1}).

Nous réalisons donc des simulations pour ces différentes configurations, pour un ellipsoïde de sphéricité 0.85 (valeur réaliste et probable déterminée à la section 2.2.3), de demi grand-axe 120 µm et de coefficient d'atténuation 110 cm^{-1}. Pour compléter l'analyse, nous ajoutons une simulation pour une sphère de volume équivalent à celui des ellipsoïdes orientés.

On remarque alors que l'orientation de l'ellipsoïde fait varier la $HWHM$ de 16% entre les deux cas extrêmes (parallèle ou perpendiculaire). Pour une sphère de volume équivalent, la variation est de 8% par rapport à un ellipsoïde parallèle, mais l'intensité minimale transmise est plus faible car l'épaisseur de matière traversée par le faisceau est légèrement plus grande. Dans le cas d'un écoulement haut-débit des capsules, il ne nous est pas possible pour le moment de savoir quelle sera leur orientation au moment de l'interaction avec le faisceau. Pour donner un exemple concret des divergences entre simulations elliptiques et sphériques, nous avons analysé un ellipsoïde de cellules HLY-1 à 9 jours d'encapsulation, dont le grand axe est parallèle à la direction de translation. Puis, nous avons ajusté manuellement le β des simulations de façon à fitter le minimum d'intensité transmise (**Figure 49**), et comparé les $HWHM$ des deux conditions.

On remarque tout d'abord que la simulation elliptique épouse globalement mieux la trace expérimentale que la simulation sphérique, même si elle semble surestimer la $HWHM$ expérimentale d'environ 5%. Néanmoins, cette surestimation reste tolérable. Pour les simulations, $\beta_{elliptique} = 121\ cm^{-1}$ et $\beta_{sphérique} = 105\ cm^{-1}$. Cette différence de $16\ cm^{-1}$ entre les deux simulations est à modérer par la sphéricité de l'échantillon (0.63).



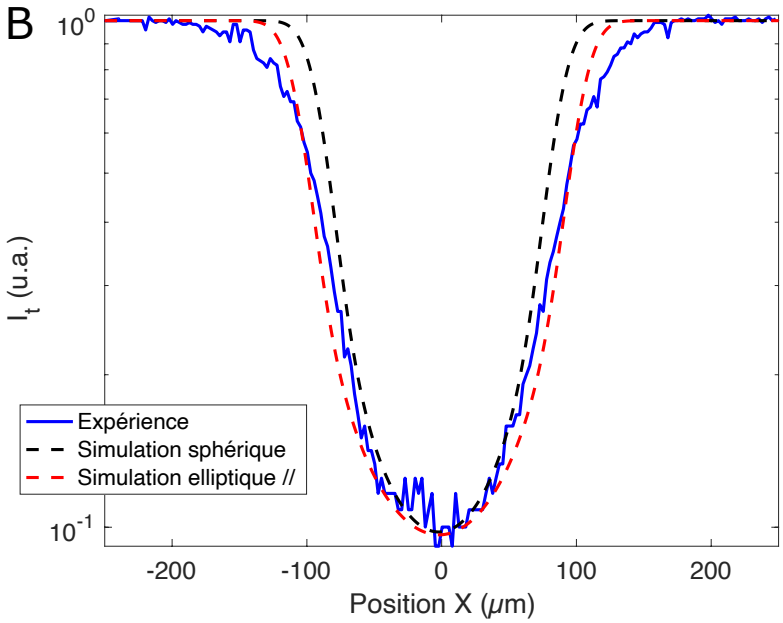


Figure 49 : Impact de la géométrie elliptique d'un sphéroïde de cellules HLY-1 à 9 jours de culture. **A.** Image champ clair du sphéroïde. a : demi grand-axe (151 µm), b : demi petit-axe (96 µm). **B.** Courbe expérimentale associée au sphéroïde et simulations selon le modèle sphérique et elliptique.

Comme ce cas particulier est presque extrême, nous choisissons pour la suite de conserver le modèle sphérique dans nos simulations d'abaques de référence, malgré les erreurs créées par la géométrie spécifique de certains agrégats.

3.3.5 Variations du coefficient d'atténuation

On souhaite estimer la sensibilité de notre mesure du coefficient d'atténuation à des changements d'état induits au cours de la croissance des sphéroïdes. On a choisi d'étudier tout d'abord les cellules HuH6, adhérentes, pour définir l'impact de la densité cellulaire sur β. Nous étudierons ensuite des sphéroïdes de progéniteurs d'adipocytes 3T3F442-A, soumises à deux environnements chimiques différents au cours de leur croissance, susceptibles de faire varier leur coefficient d'atténuation.

Impact de la densité cellulaire sur le coefficient d'atténuation

Comme nous l'avons expliqué auparavant, les agrégats multicellulaires croissent dans la capsule jusqu'à en toucher les bords internes : c'est l'étape de confluence. Puis, les cellules continuant de se diviser dans le sphéroïde, la capsule élastique va se déformer sous leur pression, mais néanmoins exercer en retour une contrainte mécanique, sur l'agrégat, dont la densité cellulaire augmentera, faute d'espace supplémentaire (Alessandri *et al* 2013). Aussi, il serait logique qu'une densification du sphéroïde entraîne une augmentation de son coefficient d'atténuation. Pour étudier cette hypothèse, nous avons sélectionné des capsules de cellules HuH6, et procédé à la détermination de leur β avant et après la confluence, par la méthode des abaques (voir **Figure 50**.). Une première constatation est l'augmentation légère (~10%) mais tout de même significative du β au cours de la croissance, même si la faible statistique ne permet pas de conclure de façon certaine sur le rôle de la densification des agrégats dans ce phénomène.

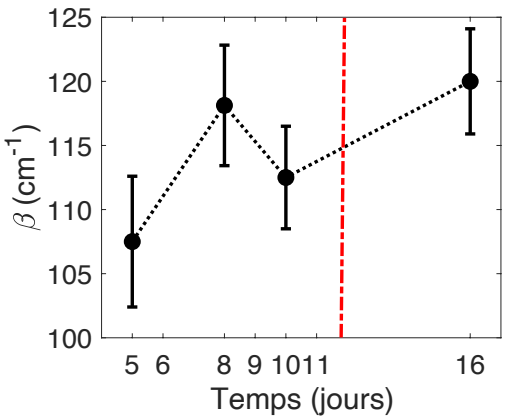


Figure 50 : Évolution du coefficient d'atténuation moyen pour N<10 sphéroïdes de cellules HuH6, avant et après confluence.

En revanche, contrairement à ce que l'on pouvait penser, nous n'observons pas d'augmentation significative de β après la confluence. Nous complèterons cette expérience au Chapitre 5 où nous utiliserons une plus grande statistique, et plusieurs lignées.

Analyse de sphéroïdes de progéniteurs d'adipocytes 3T3F442-A

On va maintenant tenter de détecter un changement de coefficient d'atténuation et de vitesse de croissance lié au contenu cellulaire. Pour ce faire, nous allons analyser des sphéroïdes de pré-adipocytes (lignée 3T3F442A) soumis ou non à l'action d'insuline dans leur milieu de culture (**Figure 51**). On sait que lors de leur exposition à l'insuline, les pré-adipocytes se différencient en adipocytes qui stockent les lipides sous forme de gouttelettes lipidiques possédant un indice de réfraction spécifique qui devrait théoriquement impacter le coefficient d'atténuation des sphéroïdes.

On remarque sur les images de la **Figure 51** une croissance plus rapide pour les sphéroïdes avec insuline que pour ceux n'y étant pas exposés. Ainsi, pour l'analyse réalisée sur des échantillons fixés après 13 jours de culture dans l'une ou l'autre des conditions, on s'attend à observer un rayon et un coefficient d'atténuation plus importants sur les sphéroïdes avec insuline. Pour exemple, la **Figure 52** montre les données de détection pour deux sphéroïdes de chaque condition.

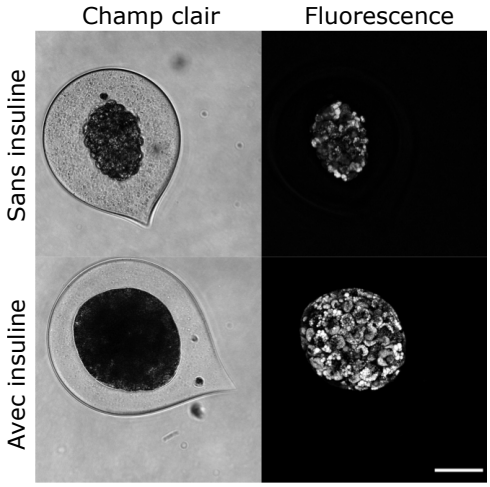


Figure 51 : Imagerie en contraste de phase et en fluorescence de capsules de cellules souches adipeuses (3T3F442A), stimulées ou non par l'ajout d'insuline dans leur milieu de culture, 13 jours après encapsulation. Marqueur fluorescent : BODIPY 505/515 (Thermofischer, marquage de lipides). Barre d'échelle : 100 µm. Crédit : Amaël Mombereau.

On observe une différence de largeur de signal (reflétant le rayon) et d'intensité transmise et de $HWHM$ pour ces échantillons entre culture de sphéroïde complémentée par insuline et contrôle. On peut donc envisager d'utiliser un critère de seuil sur ces grandeurs pour déterminer si des gouttelettes lipidiques se sont formées dans les agrégats au cours de leur culture.

Quantitativement, à l'aide du système d'abaque, on obtient $\overline{R_{-insuline}} = (60 \pm 12)\ \mu m$ et $\overline{\beta_{-insuline}} = (125 \pm 33)\ cm^{-1}$, ainsi que $\overline{R_{+insuline}} = (73 \pm 21)\ \mu m$ et $\overline{\beta_{+insuline}} = (180 \pm 46)\ cm^{-1}$.

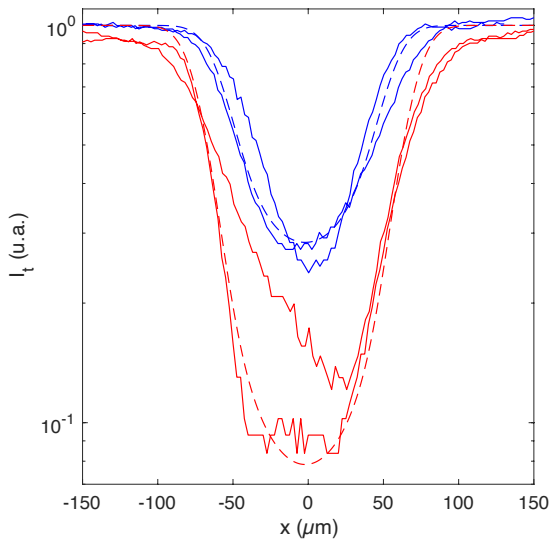


Figure 52 : Intensité transmise au travers d'organoïdes de pré-adipocytes 3T3F442A âgés de 13 jours, cultivés dans un milieu complémenté ou non par insuline (1/100ème), en fonction de leur position dans le faisceau laser.

— : Expérience sans insuline

--- : Simulation sans insuline

— : Expérience avec insuline

--- : Simulation avec insuline

Dans l'expérience présentée à la **Figure 52**, malgré le peu d'échantillons que nous avons analysé, on observe une différence nette entre les deux conditions. Pour renforcer cette conclusion, l'analyse sera répétée avec la plateforme optofluidique complète au Chapitre 5sur plusieurs dizaines de sphéroïdes.

3.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord présenté le concept théorique de mesure pour lequel nous souhaitions développer un instrument : un agrégat cellulaire sphérique est translaté au travers d'un faisceau laser gaussien de dimensions inférieures à celles de l'objet analysé. L'intensité lumineuse transmise au travers de cet échantillon au cours de son déplacement dans le faisceau est enregistrée, générant une courbe de détection caractéristique, de laquelle sont extraites deux grandeurs : l'intensité minimale détectée au cours de la translation (I_{min}), et la demi-largeur à mi profondeur ($HWHM$). De ces grandeurs, on souhaite déduire le rayon (R) et le coefficient d'atténuation (β) de l'échantillon, sans s'appuyer sur une technique d'imagerie. On développe un modèle théorique qui simule l'atténuation de la lumière par une sphère, pour une gamme de rayons et de coefficients d'atténuation définis. On compare ensuite ces simulations aux mesures expérimentales et on détermine à l'aide d'un script informatique les couples ($I_{min}, HWHM$) simulés les plus proches des couples ($I_{min}, HWHM$) mesurés. Ce lien entre simulations et mesures par le truchement d'abaques de référence permet de remonter à une estimation précise de R et β.

Un système expérimental a alors été prototypé, incluant un module optique de mise en forme d'un faisceau laser gaussien aux dimensions requises par le principe de mesure, mais également un module électronique constitué de composants open-source peu coûteux (*Raspberry Pi, Arduino*), régissant l'acquisition du signal de mesure ainsi que le déplacement motorisé des échantillons au travers du faisceau. Afin de contrôler l'instrument, un logiciel comprenant une interface utilisateur ergonomique et un système d'archivage de données a été développé, toujours dans une logique de moindre coût, dans des langages informatiques open-source (*Python 3.7, C++*).

Une expérience de validation du principe de mesure et de calibration a ensuite été proposée, basée sur l'enfouissement des échantillons dans un gel transparent, puis par leur translation motorisée à vitesse définie au travers du faisceau. Les résultats ont été utilisés pour déterminer les forces et les faiblesses des mesures et de l'analyse par comparaison aux simulations, et ont permis l'ajustement de divers paramètres (impact de la capsule d'alginate, conformité aux simulations…). Nous avons ensuite utilisé le système expérimental dans les mêmes conditions pour étudier et comparer différentes lignées cellulaires. Néanmoins, à l'issue de ce premier chapitre, il apparaît nécessaire d'obtenir des résultats sur un plus grand nombre d'échantillons, afin de dégager une tendance statistique de nos mesures. En plus de renforcer les résultats expérimentaux, une analyse massive permettrait d'accélérer le processus de mesure, et d'exploiter la grande quantité d'échantillons naturellement générés par la technologie des capsules cellulaires. Aussi, nous orientons la suite de ce manuscrit vers la conception, le développement et la caractérisation d'un système microfluidique, permettant d'écouler les capsules au travers du faisceau, à haut-débit. Le chapitre suivant sera entièrement consacré à cet aspect.

Chapitre 4

Conception et caractérisation du module microfluidique pour le convoi de capsules cellulaires pesantes

L'objectif principal de ce travail est d'analyser le signal d'atténuation lumineuse de sphéroïdes/organoïdes encapsulés passant en continu au travers d'un faisceau laser, de manière à obtenir des informations à haut débit sur leur rayon et leur coefficient d'atténuation. Pour ce faire, nous souhaitons développer un dispositif de manipulation microfluidique des capsules cellulaires qui permettra : i) de les convoyer à vitesse constante au travers du faisceau, ii) d'aligner leur centre de masse avec le centre du faisceau afin d'atteindre une configuration simple étudiée théoriquement et validée expérimentalement au Chapitre 1.

On pourrait croire qu'il suffit d'adapter les approches désormais classiques de microfluidique pour particules ou cellules ($< 10\ \mu m$) à des objets presque macroscopiques ($> 200\ \mu m$) et que ce changement d'échelle est d'autant plus simple car les objets sont plus gros. S'il est vrai que la contrainte sur la résolution nécessaire pour fabriquer les canaux fluidiques est fortement allégée, une des principales difficultés à surmonter est le fait que les capsules cellulaires, contenant un millier de cellules, ne sont plus des particules browniennes, mais pesantes, et qui sédimentent donc rapidement. Nous commencerons par étudier la sédimentation de capsules remplies de cellules. Ensuite, nous décrirons le procédé de fabrication du système microfluidique que nous avons utilisé pour manipuler les échantillons. Enfin, par une stratégie d'essai-erreur, nous caractériserons de manière quantitative le comportement (position, vitesse) des échantillons lors de leur injection et leur écoulement dans le système microfluidique retenu.

4.1 Sédimentation

L'utilisation des capsules cellulaires nous a montré tous les jours, au cours de notre thèse, que celles-ci étaient « pesantes ». Par rapport à des expériences sur cellules dissociées en suspension (après trypsinisation par exemple) qu'il est nécessaire de centrifuger pour effectuer des lavages, les agrégats multicellulaires ont cet avantage de sédimenter rapidement sans avoir recours à une force centrifuge externe. Tout d'abord guidés par une simple curiosité, nous avons étudié plus quantitativement leur sédimentation dans l'eau.

4.1.1 Montage expérimental

Le montage permettant de suivre la chute de capsules cellulaires dans de l'eau est simple dans son principe (voir **Figure 53**). Nous utilisons une cuve de spectrométrie (Cuve Macro, VWR 634-1067, 1 x 1 x 3,5 cm). Celle-ci est éclairée par une source de lumière blanche (Adafruit, White LED BackLight Module 1622) et la trajectoire des capsules est imagée à l'aide d'une caméra CMOS (Thorlabs, DCC 1645C, vitesse d'acquisition 50 FPS).

En pratique, et pour plus de simplicité, plutôt que de faire tomber les capsules une à une et perturber la surface de l'eau et donc leur trajectoire dans les instants initiaux, nous avons préféré

déposer les capsules cellulaires au fond de la cuve, puis les re-suspendre par un pipetage qui les fait remonter presque jusqu'à la surface.

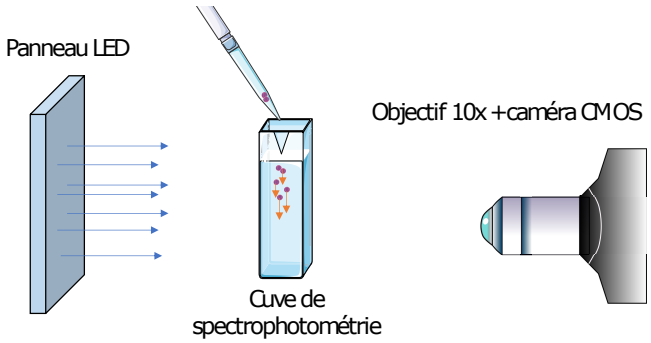


Figure 53 : Montage expérimental permettant la capture vidéo de la chute de capsules cellulaires dans un milieu aqueux (eau mQ).

Les vidéos enregistrées (voir par exemple la vidéo supplémentaire 1 ici) sont analysées à l'aide du logiciel *Fiji* et plus précisément de son module *TrackMate,* qui permet, par segmentation, de localiser un objet sphérique sur chaque image, de calculer sa vitesse instantanée et d'en déduire sa trajectoire. La **Figure 54** présente un montage d'images choisies des chutes, pour des capsules de différentes tailles. On obtient le rayon moyen équivalent de l'agrégat en chute libre en mesurant sa section apparente A, et en calculant $R_{eq} = \sqrt{\frac{A}{\pi}}$. Ce calcul est réalisé automatiquement par une routine du plug-in *TrackMate*.

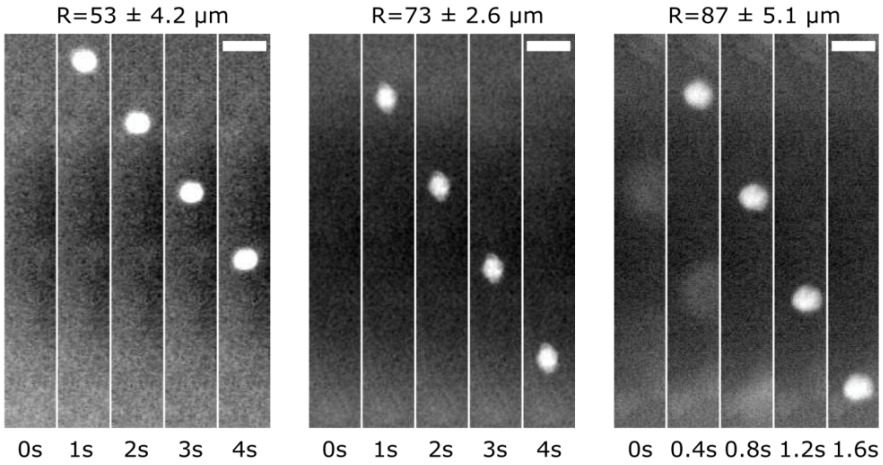


Figure 54 : Montage d'instantanés de vidéos de sédimentation de capsules cellulaires de différents rayons, à plusieurs temps (s). Barres d'échelle : 200 µm.

Sur les instantanés présentés à la **Figure 54**, certains objets paraissent plus petits que leur rayon calculé (c'est notamment le cas de l'échantillon R = 73 µm). En effet, le rayon

équivalent calculé par *TrackMate* est une moyenne réalisée sur toutes les images de la vidéo de chute. Aussi, au cours de cette chute, l'objet peut tourner sur lui-même et présenter successivement à la caméra plusieurs sections d'aire variable. De plus, la netteté de l'échantillon varie selon sa position sur l'axe de captation de la caméra, ce qui peut induire en erreur la segmentation du module.

4.1.2 Résultats : mesure de la densité des capsules cellulaires

La force de gravité dans le liquide est équilibrée par la force visqueuse de Stokes :

(10) $$\frac{4}{3}\pi R^3(\Delta\rho)g = 6\pi\eta R v$$

où η est la viscosité dynamique de l'eau (10^{-3} Pa.s), R le rayon de l'objet, $\Delta\rho$ la différence de masse volumique entre l'objet et l'eau, g le champ de pesanteur (9.81 m.s^{-2}), et v la vitesse de chute de l'échantillon. La vitesse limite de chute est donc :

(11) $$v = \left(\frac{2\Delta\rho g}{9\eta}\right) R^2$$

De la mesure automatique de la vitesse à l'aide de *Trackmate* et de la détermination du rayon du sphéroïde, on peut donc déduire $\Delta\rho$. La **Figure 55** montre la variation de la vitesse de chute instantanée de plusieurs capsules de cellules SU-DHL-4 de tailles différentes. Immédiatement, on remarque, étant donné que les vitesses sont de l'ordre de 1 mm/s, qu'une sédimentation sur 1 cm s'accomplit en environ 10 secondes. Une cellule de 10 µm de rayon sédimenterait en 1000 secondes, soit 20 minutes, ce qui illustre la forte dépendance (en R^2) de v.

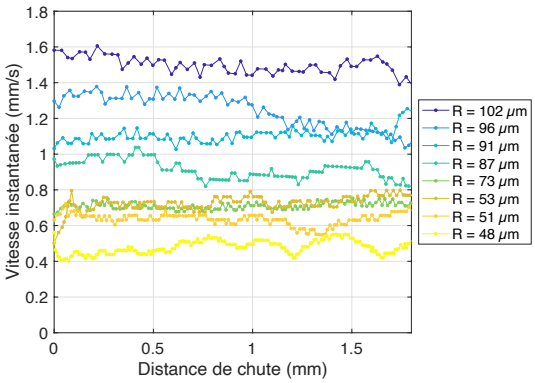


Figure 55 : Évolution de la vitesse instantanée d'agrégats encapsulés, de rayons variables au cours de leur chute dans une cuve de spectrométrie. La fin de détection de chute se situe à 10 mm du fond de la cuve.

On observe aussi que la vitesse de sédimentation reste sensiblement constante au cours de la chute. On peut donc calculer la vitesse moyenne sur la totalité de la distance de chute pour

chaque capsule, dont le rayon est connu indépendamment. Toutes les données sont rapportées sur la Figure 56. Un simple ajustement polynomial d'ordre 2 de la forme $y = ax^2$ donne : $\overline{\rho_{caps}} = 1054 \pm 45\ kg.m^{-3}$, en prenant $\rho_{eau} = 1000\ kg.m^{-3}$.

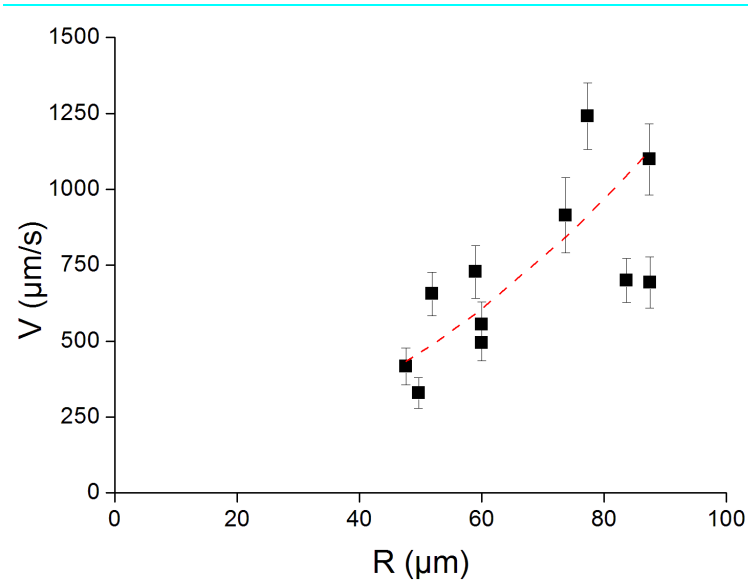


Figure 56 : Variation de la vitesse de sédimentation en fonction du rayon pour des capsules cellulaires de cellules SU-DHL-4. ■ : points de mesure. --- : ajustement polynomial.

Cette valeur est à comparer à des données de la littérature. De manière surprenante, peu d'études ont visé à mesurer précisément la densité cellulaire. La méthode la plus classique et établie de mesure de la densité d'une population de cellules consiste à utiliser la centrifugation à gradient de densité (Zhao *et al* 2014, 2015). Pendant la sédimentation, les cellules se stabilisent dans un gradient de densité à une position d'équilibre où la densité du milieu est égale à leur propre densité de flottabilité. Cette mesure, adaptée de la technique de séparation de macromolécules permet de travailler sur une population de cellules. Depuis, deux autres méthodes sur cellule unique ont été développées.

La première (Bryan *et al* 2014) utilise un résonateur suspendu à micro-canal. En faisant passer des cellules dans un cantilever contenant un canal, on mesure le changement de fréquence de résonance, donc la masse de la cellule. Couplée à une estimation de volume cellulaire, ou à une détermination du volume par calibration dans des fluides différents, la densité cellulaire peut être déduite (Bryan *et al* 2014, Godin *et al* 2010). Par exemple, la densité de cellules lymphoblastiques a été déterminée dans la gamme 1.05-1.07 g/ml.

Enfin, plus récemment, une méthode électrocinétique induite optiquement consiste à étudier, comme nous l'avons fait, la sédimentation de cellules individuelles. Mais dans le cas du groupe de Hong-Kong (Zhao *et al* 2015, 2014), la mise en suspension des cellules déposées se fait sur

une courte distance (une dizaine de microns) par di-électrophorèse induite optiquement, et la trajectoire de chute est suivie en tenant compte des conditions de lubrification. Sur deux types de lymphocytes, la densité cellulaire a été mesurée dans la gamme 1.06-1.10 g/ml. Cette méthode est très précise car elle ne génère qu'une perturbation minimale du fluide environnant. Notre méthode, beaucoup moins sophistiquée, nous permet cependant d'obtenir rapidement et simplement des valeurs similaires.

Toutefois, il est à noter que nous avons fait ici une approximation importante à savoir que la taille de l'objet en chute libre était celle de l'agrégat cellulaire visible et mesuré par microscopie.

Or, l'agrégat cellulaire est entouré d'une capsule d'alginate. En d'autres termes, nous analysons la chute de l'objet « agrégat + coque d'alginate » et nous avons considéré que son rayon était celui de l'agrégat. Nous souhaitons maintenant savoir si la présence de la coque d'alginate a un impact significatif sur la densité cellulaire déterminée ci-dessus. Pour ce faire, nous répétons l'expérience de sédimentation, mais cette fois sur des agrégats décapsulés (après dissolution de l'alginate dans du PBS).

Notons que, sur cette seconde série d'expériences, les sphéroïdes sont plus gros car plus avancés dans la croissance. La Figure 57 montre ces nouvelles données ajoutées à celles de la Figure 56. Un ajustement des données avec l'équation (13) donne $\Delta\rho_d = 44 \pm 13\ kg.m^{-3}$.

Nous observons que pour un même rayon d'agrégat cellulaire, la vitesse de sédimentation est plus élevée dans le cas des agrégats encapsulés, car leur rayon hydrodynamique a été sous-estimé de l'épaisseur de la coque. On peut reprendre le calcul de la vitesse de sédimentation en considérant que l'agrégat cellulaire de densité ρ_c est entouré d'une coque d'alginate d'épaisseur h et de densité : $\rho_a \approx 1010\ kg.cm^{-3} \approx \rho_w$.

(12) $$\left[\frac{4}{3}\pi R^3\rho_c + 4\pi R^2 h\rho_a - \frac{4}{3}\pi(R+h)^3\rho_w\right] g = 6\pi\eta(R+h)v$$

Par une approximation au premier ordre en h, on trouve :

(13) $$v = \frac{2g}{9\eta}(R^2 + 2hR)\Delta\rho$$

Étant donné le relativement faible nombre de points, on fixe $h = 20\ \mu m$ (mesuré optiquement) pour l'ajustement polynomial et on trouve $\Delta\rho_{encapsulé} = 42 \pm 5\ kg.m^{-3}$.

On trouve donc un bon accord entre les deux mesures. Cette valeur se retrouve bien dans la gamme des valeurs rapportées dans les travaux déjà publiés (Bryan *et al* 2014, Drasdo and Höhme 2005, Godin *et al* 2010, Zhao *et al* 2014b, 2015b). C'est cette valeur de densité cellulaire que nous considérerons dans les sections suivantes.

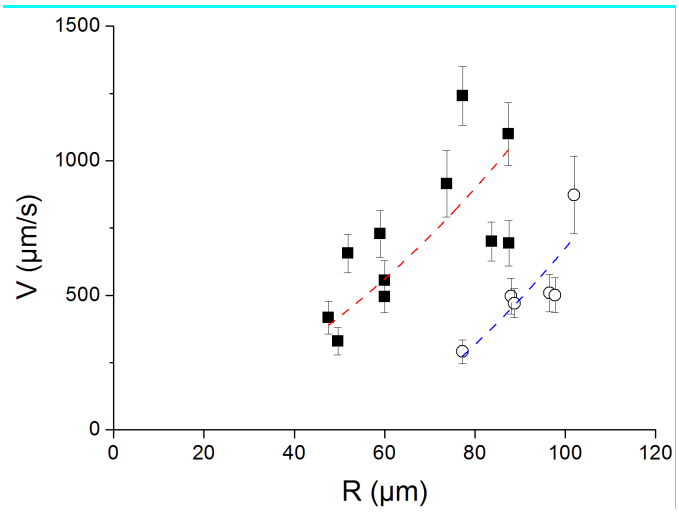


Figure 57 : Variation de la vitesse de sédimentation en fonction du rayon pour des agrégats encapsulés et décapsulés de cellules SU-DHL-4.

■ : sphéroïdes encapsulés.
--- : ajustement polynomial sphéroïdes encapsulés.
o : sphéroïdes décapsulés.
--- : ajustement polynomial sphéroïdes décapsulés.

4.2 Design microfluidique : Fabrication de circuits microfluidiques à l'aide de moules réalisés en impression 3D - DLP

Dans la plupart des laboratoires académiques, les circuits microfluidiques sont fabriqués à partir de PolyDiméthilSiloxane solidifié, un gel de polymère siliconé, inerte vis-à-vis des cellules et perméable aux gaz, permettant la fabrication de fins canaux, jusqu'au µm de largeur (valeur basse). Cet ordre de grandeur nécessite l'utilisation de moules (historiquement fabriqués en silicium, puis en résine photo-polymérisable, de type SU-8, puis le coulage de PDMS et sa réticulation pour obtenir la topographie inversée. Nous n'avons pas de contrainte sur la résolution de la fabrication des canaux fluidiques puisque, étant donné que les capsules cellulaires ont un rayon R~100 µm, les canaux de convoyage doivent avoir au moins une largeur l>200 µm. D'autre part, une des limitations de la photolithographie est l'épaisseur des films de photoresist, au maximum typiquement de 100 µm (à moins d'utilisation de films secs multicouches ou dans des conditions de cuisson et éclairement délicates (Mukherjee *et al* 2019, Koukharenko *et al* 2005). Après étude de la littérature associée à la manipulation de particules dans un système microfluidique, nous constatons que peu de travaux proposent des solutions pour contrôler la vitesse et la position d'échantillons de dimensions similaires aux nôtres en microfluidique. En effet, les travaux publiés relatifs aux objets supra-cellulaires pour la biologie sont relatifs à la manipulation d'embryons (Glasgow *et al* 2001), ou proposent des développements permettant d'accélérer la formation des sphéroïdes (Ruppen *et al* 2015), ou bien des nouvelles technologies facilitant leur culture (Krisher and Wheeler 2010) (renouvellement du milieu, ajout d'espèces chimiques, etc.). Notre stratégie consistera donc à s'inspirer de ces systèmes optimisés pour cellules uniques et à étudier expérimentalement si, une fois mis à l'échelle, ils permettront de focaliser hydrodynamiquement les capsules cellulaires pour les faire passer au point de focalisation du faisceau laser.

Sur la base de l'expérience que nous avons acquise en impression 3D pour la fabrication des puces de co-extrusion, et la nécessité de disposer de canaux microfluidiques de hauteur au moins supérieure au diamètre des capsules les plus grosses, nous avons décidé de prototyper les moules des circuits de la plateforme microfluidique développée ici en utilisant également l'impression 3D plutôt que la lithographie molle. Comme la formation de chaque couche de l'objet imprimé nécessite environ 10s, selon l'épaisseur du modèle (typiquement 15 mm pour les systèmes considérés ici) et la résolution verticale de l'impression (25 µm), un prototype de moule est fabriqué en quelques heures, et hors d'une salle grise. La résine liquide utilisée pour la fabrication des moules, la HTM140V2 (EnvisionTEC), présente une résistance à la chaleur allant jusqu'à 80°C avant fluage. On traite ensuite le moule à l'aide d'un spray de silicone (Ease Release 200, Mann Formulated Products, USA) afin d'éviter que le PDMS (Sylgard 184) n'adhère au moule lors de sa réticulation, et se déchire lorsqu'on le pèle.

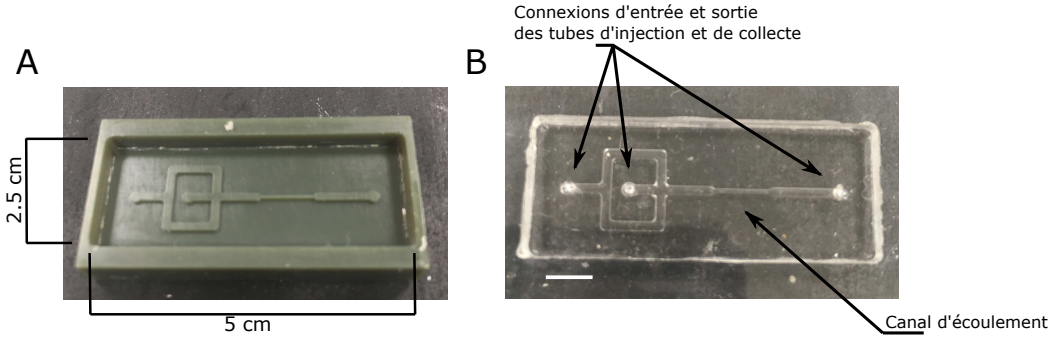


Figure 58 : Fabrication de circuits microfluidiques à l'aide de l'impression 3D. **A.** Moule pour circuit microfluidique fabriqué par impression 3D DLP à l'aide d'une imprimante Envision TEC MicroPlus RP. Dimensions d'un voxel : $5 \times 5 \times 25\ \mu m$. **B.** Circuit de microfluidique en PDMS obtenu à partir d'un moule fabriqué par impression 3D DLP. Barre d'échelle : 5mm.

Une fois le moule en résine à disposition, on prépare le PDMS réactif en mélangeant. le polymère silicone et son agent réticulant (Sylgard 184 Silicone Elastomere Kit, parts A&B, Dow Corning) au fond d'une boîte de Petri. On dégaze le mélange à l'aide d'une pompe à vide jusqu'à obtenir un produit visqueux sans bulle. On remplit ensuite les moules imprimés à 90% de leur contenance, puis on les place au four pendant 12 heures à la température de 65°C. La partie PDMS est ensuite démoulée par découpe, les entrées percées à l'aide d'un outil de biopsie de diamètre 1 mm (Darwin Microfluidics), et la surface est activée par un flux de plasma (18W, 1 min, 375 mTorr, PDC 002 - Harrick Plasma), pour permettre une adhésion forte avec une lame de microscope en verre, elle aussi activée. Le circuit microfluidique ainsi réalisé est ensuite testé par écoulement d'eau stérile et d'Ethanol 70% v/v, afin de i) stériliser et nettoyer les canaux ii) vérifier l'étanchéité de la jonction verre-PDMS. Le motif et les performances du circuit microfluidique présenté à la **Figure 58** seront détaillés dans la prochaine section.

Fabrication d'un module d'injection et de récupération des échantillons

Un des premiers problèmes liés à la sédimentation des capsules est leur tendance à s'entasser lors de l'injection, ce qui provoque des bouchages à l'entrée du circuit microfluidique. On a donc besoin d'une méthode d'injection qui permet i) d'insérer les capsules une à une dans le circuit microfluidique ii) de ne pas perturber la vitesse des échantillons lors de leur passage dans le canal, et donc, en particulier d'éviter l'entrée de bulles d'air. On s'est inspiré de stratégies déjà existantes pour fabriquer un module d'injection de capsules (**Figure 59**).

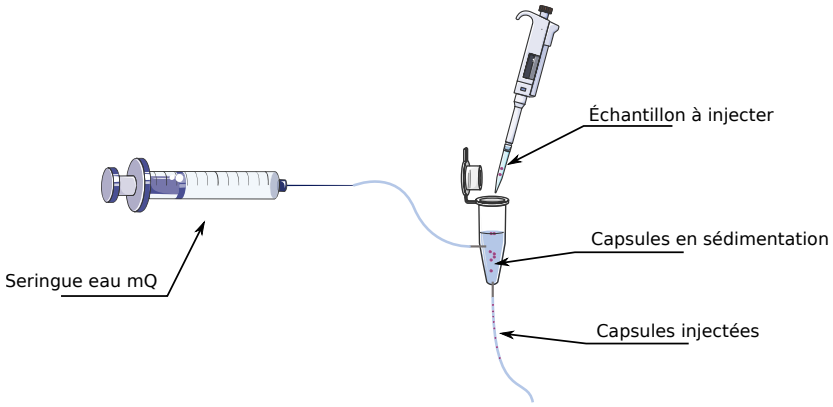


Figure 59 : Dessin du module d'injection des capsules cellulaires dans un circuit microfluidique. Une seringue contenant de l'eau mQ ou du milieu de culture, pilotée par un pousse seringue (Harvard Apparatus PHD-4400) permettant le choix du débit d'injection est connectée à un microtube percé au col et au fond, dans lequel sont déposées manuellement les capsules à injecter. Les bulles d'air induites lors de ce dépôt remontent naturellement dans le haut du microtube, tandis que les capsules sédimentent au fond, passant tour à tour dans la sortie du microtube et étant ensuite convoyées et alignées dans un tube en téflon, qui sera raccordé au circuit microfluidique.

Un microtube (Eppendorf, 1 ml) est percé au col et au fond, afin d'y insérer des connecteurs métalliques (Ø = 1.5 mm) reliés à des tubes d'écoulement en téflon (Ø = 1.4 mm). L'entrée « col » permet le passage d'un flux centrant de fluide « porteur », à un débit choisi par l'utilisateur, qui déterminera la vitesse d'injection des échantillons. Les capsules en suspension sont déposées dans le microtube via son clapet d'ouverture étanche, et sédimentent au fond de ce dernier progressivement, pour s'écouler via la sortie « fond » du tube, et être réparties assez régulièrement dans le tube de sortie reliant le module d'injection au circuit microfluidique.

4.3 Spécificités de la manipulation fluidique de particules lourdes et grosses

Il est primordial d'obtenir une interaction maximale entre les capsules et le faisceau gaussien. On souhaite donc que le centre de masse des agrégats, lors de leur passage dans le circuit, soit superposé avec le point de focalisation du faisceau. Pour tenter de trouver une

géométrie de circuit permettant un tel centrage, nous avons procédé à une mise au point empirique du circuit microfluidique, et testé leurs performances. Nous allons commencer par déterminer les ordres de grandeurs des différents paramètres hydrodynamiques pertinents, puis nous étudierons le mouvement de capsules cellulaires dans un canal simple avant d'y introduire des éléments ou en faisant varier les paramètres susceptibles de focaliser les capsules.

4.3.1 Paramètres hydrodynamiques : ordres de grandeur et contribution de la gravité

Nombre de Reynolds

Il est souvent considéré comme acquis que les systèmes microfluidiques opèrent non seulement en régime laminaire ($Re \ll 2000$) mais aussi en régime de Stokes ($Re \ll 1$, où l'inertie du fluide est ignorée). Or, dans une gamme intermédiaire, typiquement $1 < Re < 100$, la réversibilité temporelle et la linéarité ne sont plus garanties, conduisant à des mélanges (autrement possibles que par diffusion moléculaire à $Re \ll 1$) ou par turbulence ($Re > 2000$)(Sudarsan and Ugaz 2006).

Le nombre de Reynolds est défini par : $Re = \frac{\rho_f U D_h}{\eta}$, avec ρ_f la densité du fluide, U la vitesse moyenne du flux, η la viscosité du fluide et D_h la longueur caractéristique, ici le diamètre hydraulique équivalent, défini pour un capillaire à section rectangulaire $l \times h$, par $D_h = \frac{2lh}{l+h}$.

Pour un canal de taille caractéristique $D_h \approx 600\ \mu m$ et un débit $Q = 600\ \mu l.min^{-1}$, qui est proche du débit maximal au-delà duquel nous observons des bouchages fréquents ou des fuites par décollement du PDMS, la vitesse du fluide $U = \frac{Q}{{D_h}^2}$, pour un canal de section $l \times h = 1 \times 0.5\ mm$, est $U \approx 3\ cm.s^{-1}$. On obtient donc $Re \sim 20$.

Pour une particule ou un obstacle dans un flux, on préfère définir le nombre de Reynolds particulaire $Rp = Re(\frac{R}{D_h})^2 = 3$. On se trouve donc précisément dans le régime où les effets inertiels ne peuvent être négligés. Evidemment, un moyen pour diminuer Rp serait i) d'augmenter D_h, auquel cas il faudrait augmenter le débit en évitant que le flux ne devienne pulsatile, ce qui n'est pas facile en pratique, ou ii) de diminuer U, mais pour lutter contre la sédimentation des particules, intuitivement, un flux transverse à la direction de sédimentation suffisamment élevé est nécessaire.

Nombre de Stokes

En définissant τ, le temps de sédimentation en absence de flux par $V = g\tau$, avec V la vitesse de sédimentation calculée et mesurée à la section 4.1 , on a : $\tau = \frac{2}{9} \cdot \frac{\Delta\rho R^2}{\eta}$. En prenant $\Delta\rho \approx 40\ kg.m^{-3}$ et $R \approx 100\ \mu m$, on trouve $\tau = 0.2\ ms$. Le nombre de Stokes, qui représente

le rapport du temps caractéristique de sédimentation par rapport au temps caractéristique advectif, soit $\frac{D_h}{U}$, est donné par $Stk = \frac{\tau U}{D_h} \approx 0.1$. Comme le nombre de Stokes est une mesure de la fidélité des particules à suivre les lignes de flux, des valeurs de Stk typiquement supérieures à 0.01 impliquent une déviation par rapport à un comportement de traceur de flux.

Sédimentation versus portance

La première condition triviale pour que les capsules emportées par le flux ne sédimentent pas est que la vitesse du flux U soit supérieure à la vitesse de sédimentation $V = g\tau$. C'est bien le cas puisqu'on a vu, à la section précédente, que V est de l'ordre du $mm.s^{-1}$. Avec une vitesse de flux de quelques $cm.s^{-1}$, cela signifie qu'une capsule initialement injectée au centre d'un canal de hauteur $h{\sim}500\ \mu m$ toucherait le fond au bout de $\frac{h}{2V}$, soit 100 ms, ou de manière équivalente un trajet de 3 mm dans le canal microfluidique. Toutefois, ce seul effet de la gravité peut être en partie compensé par des forces de portance.

La première force de portance, connue car c'est elle qui intervient dans le « brossage » des ballons de football ou des balles de tennis, est la force de Magnus. Dans un flux de Poiseuille, la sphère est en rotation, ce qui induit une différence de pression transverse, et une force de poussée vers le haut. Toutefois, cette force a été montrée négligeable devant deux autres effets. Tout d'abord, la force de portance induite par la paroi, vient du fait que lorsque la particule s'approche de cette surface, elle créée une sorte de constriction, ce qui génère une différence de pression qui écarte la particule du voisinage de la paroi. A l'inverse, il y a aussi une force induite par le gradient de cisaillement, qui vient de la courbure du profil de vitesse parabolique. Cette force a tendance à pousser la particule vers la paroi.

Finalement, il a été montré, notamment par le groupe de Dino Di Carlo (Amini *et al* 2014) que ces deux forces de portance conduisent à une position d'équilibre qui n'est pas au centre du canal, et qui dépend notamment du nombre de Reynolds particulaire. Dans le cas limite ou la taille des particules n'est pas très inférieure au diamètre hydraulique du canal, typiquement pour $\frac{R}{D_h} > 0.4$, la position d'équilibre s'approche de la ligne centrale. C'est pourquoi, nous avons choisi de commencer par des canaux de hauteur 500 µm et de largeur 1 mm (soit $D_h{\sim}600\ \mu m$), avant de réduire la largeur.

Effets de sphéricité et perturbation du flux

Outre ces effets maintenant bien connus et utilisés pour le tri inertiel de particules dans le régime intermédiaire entre le régime de Stokes et de turbulence, il y a aussi des effets moins facilement modélisables et prédictibles, à savoir i) le fait que nos capsules cellulaires ne sont pas parfaitement sphériques, et ii) le fait que ces grosses « particules » perturbent les lignes de flux et génèrent des flux secondaires. La position d'équilibre de particules inertielles est alors délicate à prévoir. Compte-tenu de ces considérations théoriques, mais tout en gardant à l'esprit

que la réalité des systèmes expérimentaux est plus complexe, nous avons, sur la base des quelques principes énoncés ci-dessus, mené une étude essentiellement empirique.

4.3.2 Écoulement dans un canal à section rectangulaire

On considère un canal à section rectangulaire de dimensions $L \times l \times h = 5 \times 1 \times 0.5\ mm$ fabriqué à partir d'un moule imprimé en 3D. On y injecte des capsules avec un débit de $150\ \mu l.min^{-1}$. La vitesse du fluide est donc $U_f \approx 5\ mm.s^{-1}$. En utilisant le plug-in *Trackmate (Fiji)*, nous déterminons les trajectoires et la vitesse des capsules moyennée sur la longueur du canal. On remarque sur la **Figure 60** que les capsules cellulaires s'écoulent de façon quasi-rectiligne. Seulement quelques capsules semblent changer de ligne de flux en cours de trajectoire, comme attendu pour des nombres de Stokes > 0.01. En revanche, les capsules se répartissent sur toute la largeur du canal.

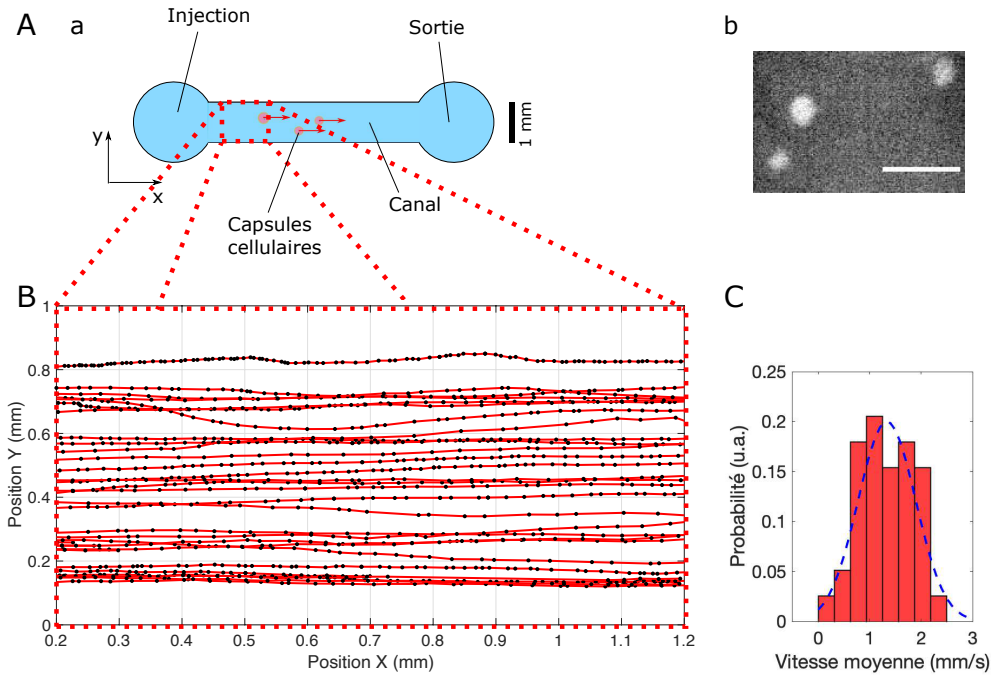


Figure 60 : Écoulement dans un canal rectangulaire simple. **A. a.** Schéma (vue du dessus) du canal d'écoulement des capsules cellulaires. **b.** image extraite de la vidéo de l'écoulement des sphéroïdes dans le canal. Barre d'échelle : 500 µm. **B.** Traces du passage de capsules dans un canal rectangulaire en PDMS de dimensions $5 \times 1 \times 0.5$ mm, pour un débit d'injection de $150\ \mu l.\min^{-1}$. N = 27 capsules. **C.** Distribution des vitesses moyennes d'écoulement des sphéroïdes (pour chaque trace) dans un canal rectangulaire en PDMS de dimensions $5 \times 1 \times 0.5$ mm, pour un débit d'injection de $150\ \mu l.\min^{-1}$. N = 27 capsules.

Comme attendu, l'utilisation d'un simple canal ne permet pas d'accéder à un centrage des capsules à partir d'une injection aléatoire. Nous avons également calculé les vitesses moyennes de chaque trace sur 1 mm au centre du canal. La distribution des vitesses est

représentée sur l'histogramme de la **Figure 60**-C. Un ajustement gaussien donne $v_{moy} = 1.33 \pm 0.31\ mm.s^{-1}$. On constate donc que, bien que la vitesse moyenne du flux soit de 5 $mm.s^{-1}$, la vitesse des capsules est près de 5 fois inférieure. Cela suggère que les capsules ne sont pas au centre du flux (i.e. à la vitesse maximale $U_{max} = \frac{3U}{2}$), mais plutôt proches de la paroi. Avant d'étudier la position en altitude des capsules, nous allons commencer par tenter de centrer les trajectoires des capsules sur la largeur du canal en ajoutant un module de centrage hydrodynamique.

4.3.3 Écoulement dans un canal rectangulaire après centrage hydrodynamique

On modifie le circuit microfluidique en ajoutant deux canaux latéraux de dimensions $2 \times 1 \times 0.5\ mm$ de part et d'autre du canal principal présenté précédemment, à 90° (**Figure 61**-A). Conformément à la littérature (Lee *et al* 2001, Stiles *et al* 2005, Lee *et al* 2006) et notamment aux travaux de Knight *et al* 1998, les débits les plus adéquats pour que le centrage hydrodynamique des capsules soit le plus efficace doivent respecter un ratio de $\frac{Q_{central}}{2Q_{latéral}} \approx \frac{1}{3}$.

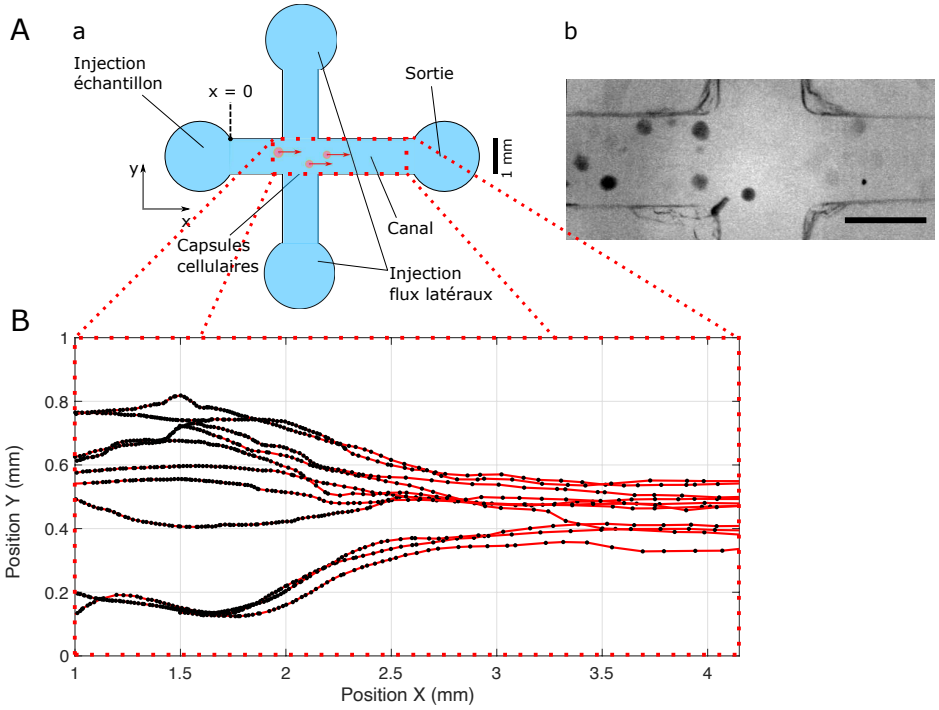


Figure 61 : Écoulement dans un canal rectangulaire avec centrage hydrodynamique. **A. a.** Vue de dessus schématique du canal d'écoulement des capsules cellulaires. **b.** Image extraite de la vidéo de l'écoulement des sphéroïdes dans le canal. Barre d'échelle : 1 mm. **B.** Traces du passage de capsules dans un canal rectangulaire en PDMS de dimensions $5 \times 1 \times 0.5$ mm, puis soumises à un module de centrage hydrodynamique de mêmes dimensions, au rapport de débits 1:3 (principal/latéral) pour un débit d'injection principal de $150\ \mu l.min^{-1}$. N = 11 capsules.

En effet, il est important que les objets restent dans le flux central et ne basculent pas dans le flux « fourreau », ce qui les décentrerait et perturberait les lignes de flux et l'écoulement général de l'échantillon. Il est donc important d'avoir un flux central de largeur supérieure ou égale au diamètre maximal d'une capsule (que nous fixons à 300 µm pour les plus grosses). Notre canal d'écoulement mesurant 1 mm de large pour éviter des bouchages, le ratio $\frac{1}{3}$ est approprié. Dans notre cas, après différents essais, nous avons fixé un débit central (Q_c) de $150\ \mu l.min^{-1}$ (comme au paragraphe précédent) et un débit latéral (de gaine, Q_l) de $225\ \mu l.min^{-1}$. La vidéo de cet écoulement est disponible au téléchargement : vidéo supplémentaire 2 ici.

Nous remarquons tout d'abord une réduction de la dispersion selon l'axe y des positions d'écoulement des capsules cellulaires. L'enveloppe des trajectoires qui couvrait presque la largeur du canal d'injection, soit 1 mm, est ensuite resserrée sur environ 280 µm après le module de centrage. Puisque le débit central représentait ¼ du débit total, on s'attend, puisqu'il n'y a pas de mélange à $Re \ll 2000$, à ce que le flux central occupe la même fraction de la largeur du canal après focalisation, soit 25%, ou 250 µm, ce qui est cohérent avec la largeur de l'enveloppe des trajectoires.

Sur la **Figure 62**-A, nous avons représenté la vitesse des capsules en fonction de leur position selon l'axe du flux (en x). On observe qu'au passage de la croix permettant la focalisation hydrodynamique, la vitesse augmente. Lorsqu'on mesure la vitesse moyenne entre des positions de x_1 et x_2 µm), on obtient l'histogramme des vitesses moyennes de la **Figure 62**-B. Cette distribution est piquée à $v_{moy2} = 4.85 \pm 0.32\ mm.s^{-1}$.

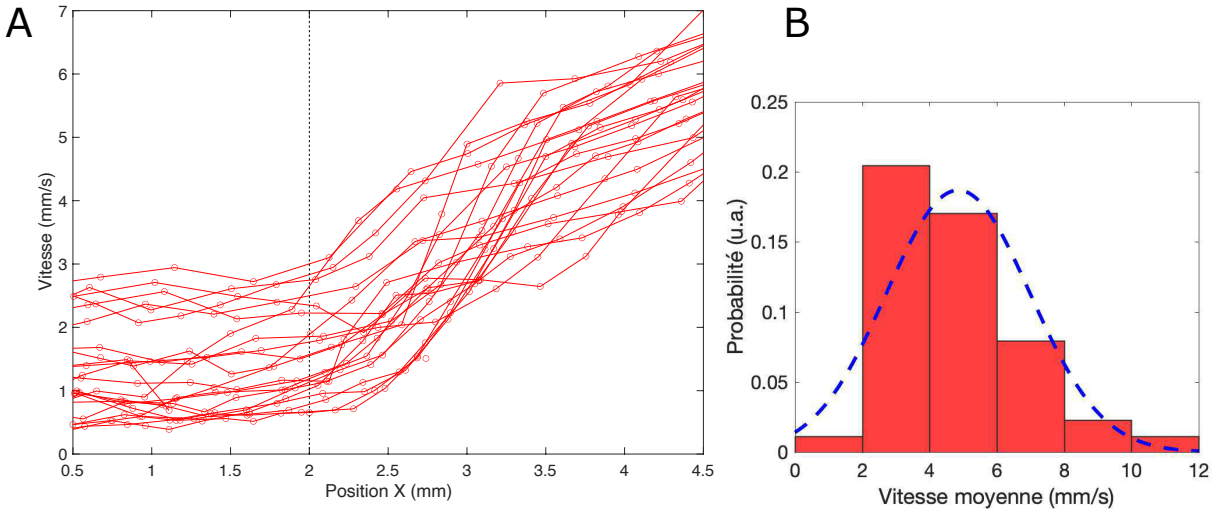


Figure 62 : Vitesse des capsules cellulaires pour un circuit de centrage hydrodynamique. **A.** Évolution de la vitesse des capsules en fonction de leur position en X dans le canal. La ligne en points tillés noire marque le centre du système de centrage hydrodynamique. N = 19 capsules. **B.** Histogramme des vitesses moyennes entre les positions X=3.5 mm et X = 4 mm. N = 39 capsules.

Puisque la section occupée par le flux initial a été réduite à ¼ de la section initiale, la conservation des volumes impose que la vitesse du fluide central soit 4 fois supérieure à la vitesse

initiale, qui était $v_{moy1} = 1.33 \pm 0.31\ mm.s^{-1}$. On a donc un accord relativement satisfaisant, sachant que la vitesse après focalisation a été un peu sous-estimée, car mesurée alors que l'état stationnaire n'était pas tout à fait atteint.

Finalement, cette focalisation sur un peu moins de 300 µm ne permet toujours pas un alignement suffisant des centres de masse des capsules avec le centre du faisceau laser, puisque la largeur de ce dernier est de 25 µm. Pour tenter d'améliorer encore la focalisation, nous avons décidé de réduire la largeur du canal post-centrage à 400 µm (au lieu de 1 mm), afin de forcer l'alignement de capsules d'un diamètre à peine deux fois inférieur, avec le risque plus élevé de bouchage.

4.3.4 Écoulement dans un canal rectangulaire réduit après centrage hydrodynamique

Un cas idéal de géométrie serait celui d'une réduction de la largeur aux dimensions des capsules. Mais comme les capsules présentent une hétérogénéité de taille et ne sont pas strictement sphériques, la probabilité de bouchage devient pratiquement trop élevée pour un canal de largeur inférieure à 400 µm (Figure 63-B).

Nous avons choisi d'ajouter un goulot de largeur 400 µm après la zone de centrage hydrodynamique, et de réitérer l'analyse de position des capsules pour les mêmes conditions expérimentales qu'aux sections précédentes (Figure 63-C.)

La distribution des positions moyennes des capsules selon la largeur du canal capsules est centrée autour de $y_{moy} = 195 \pm 33\ \mu m$. Même si la position moyenne est proche du centre du canal, il n'en reste pas moins que 95% des capsules s'étalent encore sur une zone d'environ 150 µm de large.

A partir de maintenant, nous allons accepter ce centrage approximatif des capsules. Mais, il nous faut alors quantifier l'impact de cette variation latérale des capsules sur l'interaction avec le faisceau laser. Aussi, avons-nous réalisé des simulations similaires à celles présentées au Chapitre 1, en faisant varier la position y de l'échantillon (gardée jusqu'à présent à $y_0 = 0$).

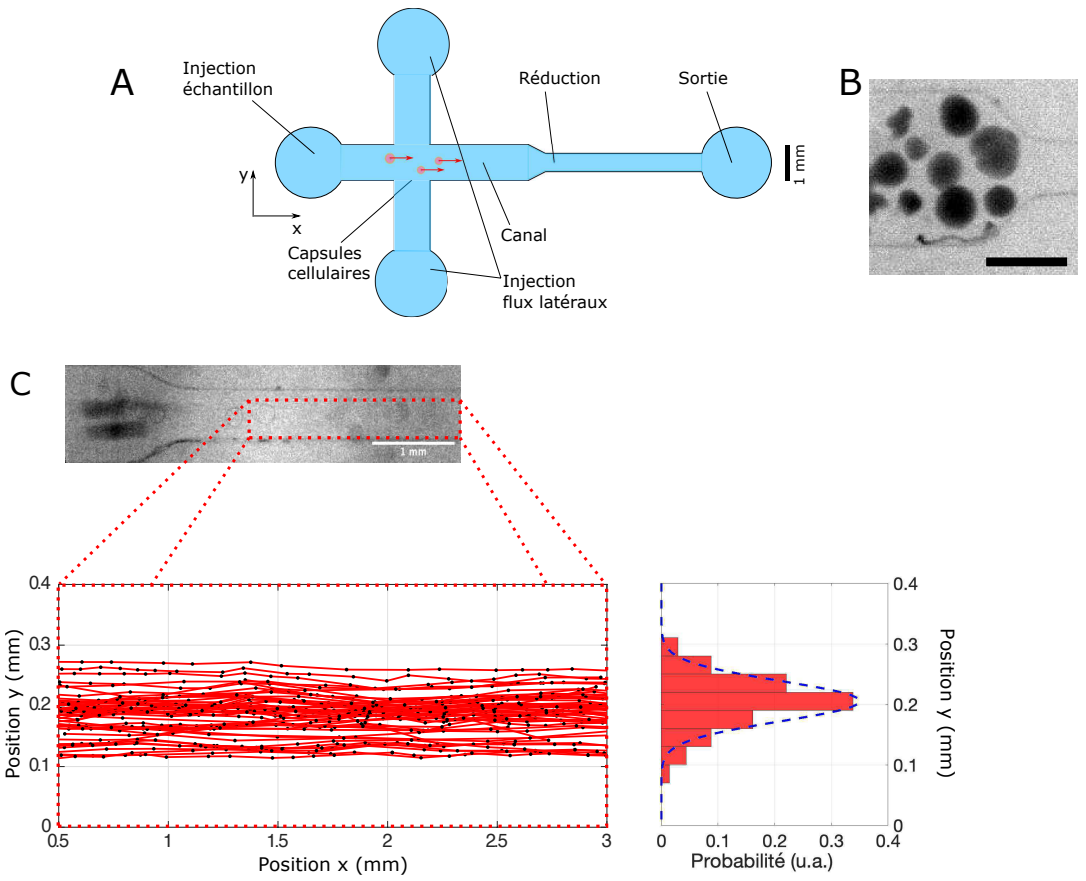


Figure 63 : Écoulement dans un canal rectangulaire avec centrage hydrodynamique et goulot. **A.** Schéma (vue du dessus) du canal d'écoulement des capsules cellulaires. **B.** Phénomène de bouchage d'un circuit microfluidique par superposition d'échantillons au niveau d'un goulot de réduction de largeur 350 µm. Barre d'échelle : 500 µm. **C.** Traces du passage de capsules (sans bouchage) dans un canal rectangulaire en PDMS de dimensions $5 \times 0.45 \times 0.5$ mm, après traversée d'un module de centrage hydrodynamique et d'un goulot de centrage. Rapport de débits 1:3 (principal/latéral) pour un débit d'injection principal de $150\ \mu\mathrm{l.min^{-1}}$. Image extraite de la vidéo de l'écoulement des sphéroïdes dans le canal (Barre d'échelle : 1 mm). Distribution de probabilité de la position selon l'axe y de chaque trace. --- : ajustement gaussien. N = 28 capsules.

Comme attendu, on voit sur la **Figure 64** que le décentrage d'une capsule selon l'axe y lors de son passage dans le faisceau affecte les valeurs mesurées de l'intensité transmise et de la largeur à mi-hauteur du signal. Pour un décalage Δy correspondant à $\sigma_y = 33\ \mu m$, nous observons que l'erreur relative sur le logarithme de I_{min} (correspondant approximativement à l'erreur commise sur la détermination du coefficient d'atténuation β) sera d'environ 7%. Par ailleurs, puisque la capsule est décalée par rapport au centre du faisceau, tout se passe comme si son rayon apparent était plus petit. On sous-estimera donc la HWHM, donc le rayon R de l'agrégat. L'erreur maximale sera de 23%. Lors de la recherche des couples (R, β) dans les abaques (voir section 3.1.3), nous pourrons tenir compte de ces erreurs en définissant un seuil de tolérance sur les valeurs à rechercher. Plus critique que le centrage, on constate que d'un échantillon à l'autre, la vitesse fluctue de façon non-négligeable, intuitivement selon les

dimensions de l'objet, mais aussi selon la position (axe x) de la mesure dans le canal d'environ 50% pour un même débit.

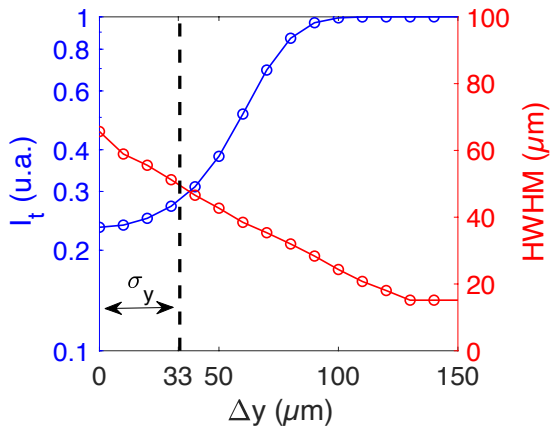


Figure 64 : Variation de la demi-largeur et de l'intensité du signal au maximum d'absorption.

-o- : minimum d'intensité transmise au travers d'une sphère de rayon R=75 µm et de coefficient d'atténuation 100 cm^{-1}, en fonction de sa position selon l'axe y, le centre du faisceau étant localisé en y=0.

-o- : HWHM de la courbe de détection d'une sphère de rayon R=75 µm et de coefficient d'atténuation 100 cm^{-1}, en fonction de sa position selon l'axe y, le centre du faisceau étant localisé en y=0.

L'analyse de la distribution dans le canal réduit donne $v_{moy\ réduction} = 12.33 \pm 4.50\ mm.s^{-1}$ (**Figure 65**-A). Cette nouvelle valeur moyenne de vitesse est cohérente avec la théorie, car, lors de la réduction du canal à une largeur de 400 µm, sa section est passée de 0.5 mm^2 (avant goulot) à 0.2 mm^2 (après goulot). On quantifie l'écart à la moyenne de la vitesse des capsules en un point (pour chaque capsule), par rapport à leur vitesse moyenne au point d'interrogation (ici x = 1.5 mm, **Figure 65**-B), et on constate que cet écart varie de 2 à 12 mm/s.

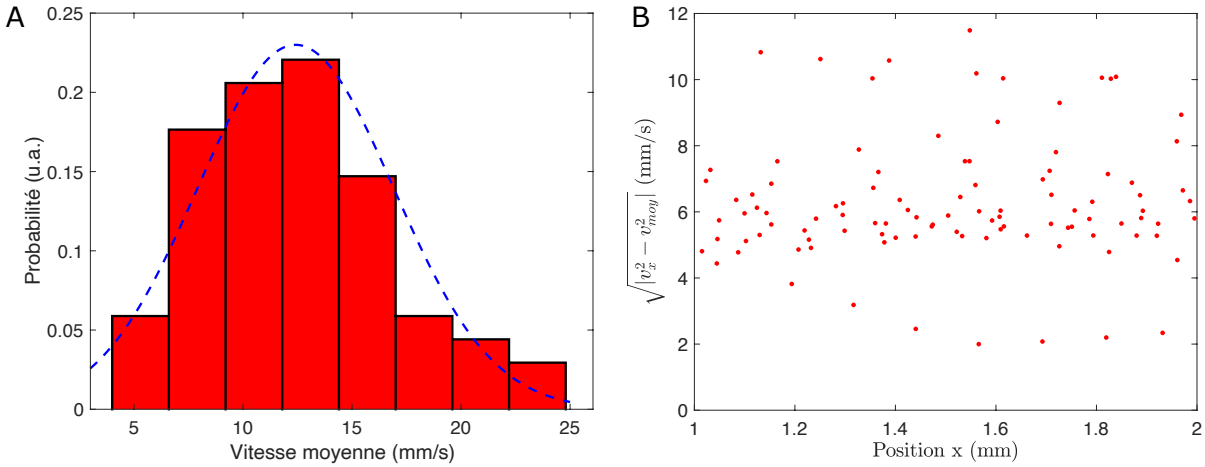


Figure 65 : Variations de la vitesse d'écoulement de capsules cellulaires après goulot. **A.** Histogramme des vitesses moyennes sur une zone de 50 µm de part et d'autre du point d'interrogation. **B.** Écart à la moyenne de la vitesse instantanée en un point autour de la position du point d'interrogation (1.5 mm).

Nous ne pouvons donc pas affirmer que les capsules évoluent à une vitesse fixe dans un circuit microfluidique uniquement sur la base des dimensions du canal ou des débits d'injection

de l'échantillon. Comme il est crucial de connaître la vitesse pour en déduire le rayon de la capsule à partir de l'analyse du signal optique, nous devrons adapter notre système optique pour déterminer la vitesse de chaque capsule analysée. Cet aspect sera développé dans le Chapitre 5.

Une dernière interrogation subsiste concernant l'impact du débit d'injection sur la dispersion des objets selon l'axe y. On a donc réitéré l'analyse présentée plus haut pour des débits variables autour de 150 µl/min (**Figure 66**). Il apparaît que pour nos conditions expérimentales, le débit d'injection n'a pas une influence significative sur le positionnement des capsules en y, mais uniquement sur la vitesse d'écoulement. Aussi, nous fixons les paramètres suivants pour la suite de nos expériences : débit d'injection central de $150\ \mu l.min^{-1}$ et rapport de centrage hydrodynamique de $1:3$.

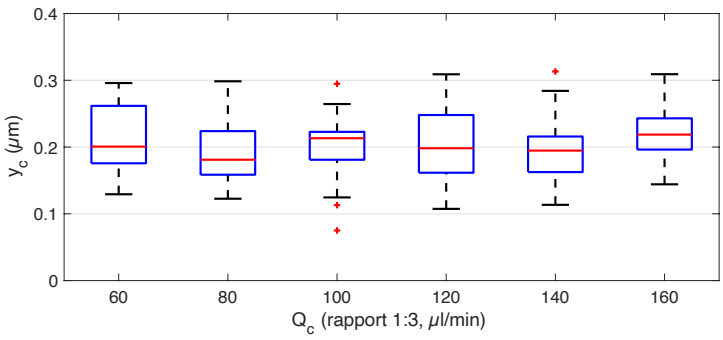


Figure 66 : Distribution de la position le long de la largeur de l'axe découlement (axe y, y_c) des capsules en fonction du débit d'injection central (Q_c), au niveau de la zone réduite du circuit (après goulot). Chaque condition est quantifiée pour une population d'une cinquantaine de capsules. 75% des valeurs sont contenues à l'intérieur des boîtes représentées en bleu, et 90% entre les barres segmentées. Les croix rouges représentent les points hors distribution.

4.3.5 Positionnement des sphéroïdes selon l'axe z lors d'un écoulement dans un canal rectangulaire

Il est a priori important de bien aligner l'altitude du canal avec le point de focalisation du faisceau gaussien, de façon à ce que les sphéroïdes interagissent avec toujours la même section de faisceau. Mais, comme on l'a vu au Chapitre 3, la longueur de Rayleigh du faisceau est très grande ($Z_r = 773\ \mu m$) et minimise cet effet. Toutefois, on souhaite savoir si le débit d'injection impacte la position des capsules selon l'axe z. Pour avoir une idée du positionnement des capsules dans le flux, nous avons réalisé un suivi des capsules dans le plan (y, z) (voir vidéo supplémentaire 3 ici).

Le dispositif d'écoulement a été modifié de façon à pouvoir filmer de côté les capsules cellulaires. En effet, pour un circuit classique, l'épaisseur des murs latéraux du canal empêche d'obtenir une image exploitable de côté. Ainsi, au lieu d'une hauteur de 500 µm et d'une largeur de 1 mm, nous avons réalisé un canal de hauteur 1 mm et de largeur 500 µm. Puis, en effectuant

une rotation à 90° de ce circuit, nous pouvons alors observer l'écoulement des capsules comme s'il s'agissait du canal initial, avec des murs bien plus fins permettant la réalisation de la vidéo. De plus, nous avons fait varier le débit principal d'injection, en conservant le même rapport (1:3) de centrage hydrodynamique dans le plan (x, y) (voir **Figure 67**).

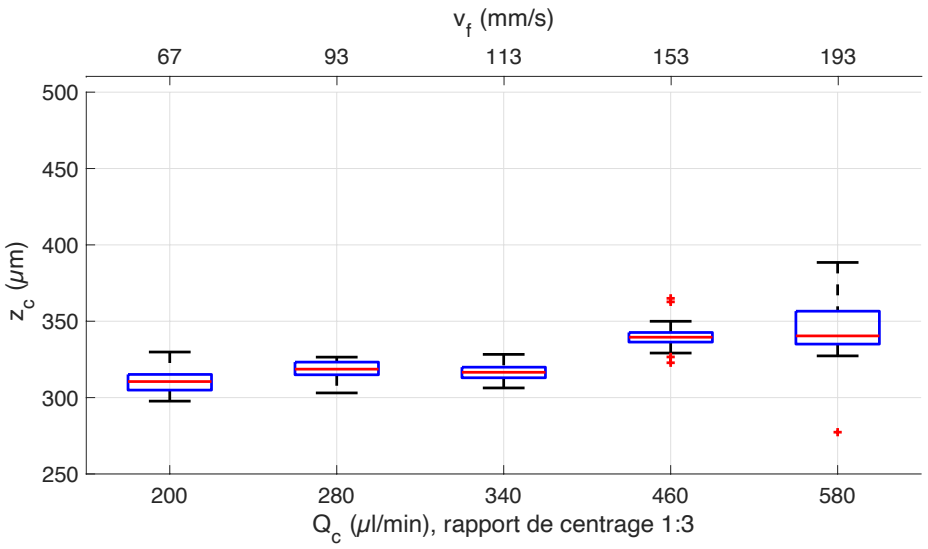


Figure 67 : Évolution de l'altitude du centre de masse des capsules (z_c) dans un canal de dimensions $5 \times 0.4 \times 0.5$ mm, selon le débit d'injection central (Q_c), et la vitesse de flux (V_f) correspondante. Chaque condition est quantifiée pour une population d'une cinquantaine de capsules. 75% des valeurs sont contenues à l'intérieur des boîtes représentées en bleu, et 90% entre les barres segmentées. Les croix rouges représentent des points hors distribution. Notons que le rayon moyen des capsules est $R = 110 \pm 15$ µm.

Aux débits $Q_c < 340\ \mu l.min^{-1}$, on observe que l'altitude moyenne du centre de masse des capsules est de l'ordre de 120 µm. Compte-tenu du rayon des capsules utilisées ($R = 110 \pm 15\ \mu m$), cela signifie que les capsules sont en interaction avec le fond du canal. Contrairement à ce que l'on aurait pu s'attendre, elles ne « lévitent » pas, et ne sont pas centrées verticalement dans le canal. Aux débits plus élevés ($Q_c > 460\ \mu l.min^{-1}$), un décollage des capsules est observé. Toutefois, alors que ces débits sont trop importants en pratique, pour éviter un risque de décollement du circuit microfluidique (observé pour un tiers des circuits dans notre cas) et pour permettre une détection efficace (avec suffisamment de points de mesure, de l'ordre de 100, au cours de la traversée du faisceau par les capsules), les capsules ne sont toujours pas centrées en z. Cela met en évidence, une fois de plus, l'importance de la gravité de ces agrégats cellulaires.

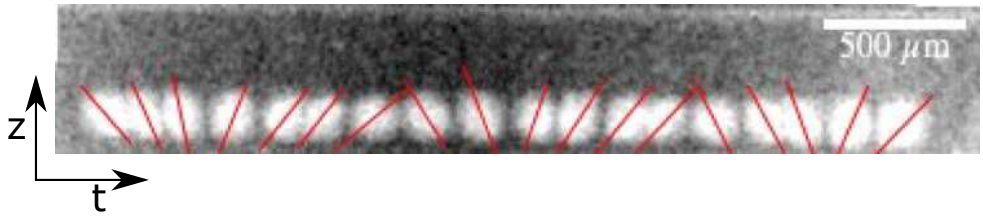


Figure 68 : Superposition de vues de côté du déplacement de capsules dans un canal de largeur 1 mm et de profondeur 500 µm, vue de côté, pour un débit d'injection central Q_c de 200 µl.min^{-1}. Marques rouges : axe de symétrie de l'agrégat cellulaire pseudo-sphérique contenu dans la capsule.

La **Figure 68** montre des instantanés d'un agrégat dans un flux de débit central 200 µl.min^{-1}. Dans ce cas, l'agrégat, d'un diamètre d'environ 200 µm a la forme d'un ellipsoïde. C'est ici un avantage, car si l'agrégat avait été parfaitement sphérique, il aurait été impossible de distinguer s'il roule ou glisse sur la surface. En marquant le grand axe de l'agrégat par un trait (Figure 69), il semblerait que la capsule roule ou oscille sur le fond du canal. Nous n'avons pas cherché a analyser davantage ce phénomène. Quoi qu'il en soit, les capsules cellulaires restent au niveau de la paroi dans le flux. Cette interaction engendre des fluctuations de vitesse qui seront prises en compte dans l'analyse finale au Chapitre 5.

4.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté notre méthode de manipulation des capsules cellulaires à l'aide d'un système microfluidique conçu empiriquement, selon des observations expérimentales de vitesses de sédimentation, d'écoulement et de centrage latéral. Il ressort de cesexpériences que la sédimentation des objets, dans notre cas, ne peut être négligée car elle est susceptible d'entraîner le déplacement des échantillons sur le fond du canal d'écoulement. Par la suite, nous avons étudié l'apport d'un module de centrage hydrodynamique classique sur la position latérale des sphéroïdes dans le canal, centrage que nous considérons critique pour la bonne mesure des grandeurs d'intérêt lors du passage des capsules au travers du faisceau laser gaussien. Ce module étant efficace mais non suffisant pour remplir notre cahier des charges, nous avons ajouté *a posteriori* un goulot rétrécissant, réduisant la largeur du canal d'écoulement, et diminuant donc la dispersion des positions latérales des capsules cellulaires. Cette dispersion a alors été jugée satisfaisante, et une estimation des marges d'erreur liées à la distribution a été réalisée par le biais de simulations théoriques présentées au Chapitre 3.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la vitesse d'écoulement des sphéroïdes dans ce canal, montrant par l'expérience qu'au vu de l'hétérogénéité de taille et de forme des sphéroïdes, cette dernière ne pouvait être constante d'un échantillon à l'autre, ce qui nous impose de mesurer la vitesse de chaque objet passant dans le faisceau, afin de remonter à sa taille, ce qui sera l'objet du début du chapitre suivant.

Chapitre 5

Analyse optofluidique des capsules cellulaires

Après avoir validé le système optique de détection des capsules cellulaires au Chapitre 3 et mis au point au Chapitre 4 un module microfluidique permettant l'écoulement contrôlé des capsules au centre d'un canal rectangulaire transparent, l'objectif est ici d'intégrer les deux modules au sein d'une plateforme optofluidique. Cela nécessite quelques modifications. Dans un premier temps, nous présenterons une adaptation du système optique, permettant de connaître la vitesse de chaque capsule au niveau de la zone d'interrogation. Dans une deuxième section, nous détaillerons les modifications apportées à l'infrastructure électronique d'acquisition des données en temps réel, ainsi que la méthode d'analyse des données après détection. Nous terminerons par la présentation des résultats expérimentaux obtenus.

5.1 Adaptation du système optique : mesure de la vitesse de chaque capsule

L'analyseur optique a été validé en déplaçant à vitesse constante les capsules au travers du faisceau à l'aide d'un système motorisé. L'intensité transmise est enregistrée en fonction du temps. Cela nous a permis, de manière simple, d'établir une équivalence temps ↔ espace, par laquelle le profil temporel était directement converti en profil spatial.

Une fois que les capsules s'écoulent dans le canal, nous avons vu que leur vitesse subissait certaines variations (voir section 4.3.4). On ne peut donc pas supposer une vitesse théorique, fixée par le débit du fluide de transport. Nous devons adapter notre dispositif optique pour mesurer, au voisinage de la zone d'interrogation, la vitesse de chaque capsule qui passe.

5.1.1 Principe de la mesure de vitesse

Pour pouvoir mesurer la vitesse de chaque capsule, nous avons choisi de dédoubler le faisceau laser, afin d'obtenir deux signaux de détection lors du passage d'une capsule. En fixant la distance entre les deux faisceaux et en mesurant l'intervalle de temps entre les deux détections, on en déduit simplement la vitesse de l'objet (voir **Figure 69**).

Plus précisément, la vitesse instantanée mesurée sera utilisée pour obtenir la $HWHM_x = v \times HWHM_t$, où $HWHM_x$ et $HWHM_t$ sont les demi-largeurs à mi-profondeur spatiale et temporelle, respectivement.

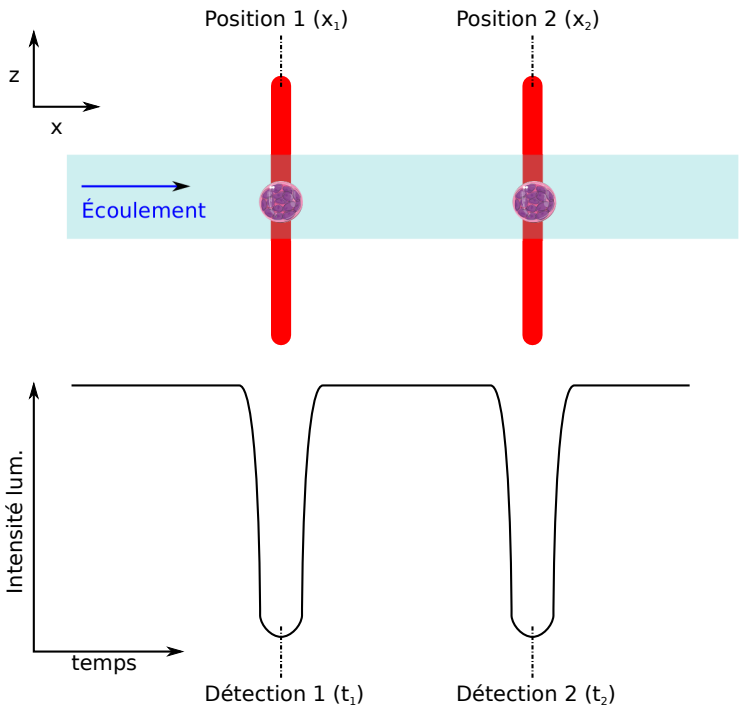


Figure 69 : Schéma du principe du système de double détection d'une capsule unique permettant d'obtenir sa vitesse. L'objet s'écoule au travers de deux faisceaux gaussiens successifs espacés d'une distance supérieure aux dimensions de la capsule, constante et connue. Le détecteur unique recueillant la combinaison des deux faisceaux enregistre une courbe de détection pour chaque passage. La différence de temps ainsi déterminée entre les deux détections est utilisée pour accéder à la vitesse de l'objet.

5.1.2 Dédoublement et mesure de la taille des deux faisceaux selon z

Afin de pouvoir réaliser la mesure de vitesse en conservant un système optique comportant un seul laser et un seul détecteur, nous avons opté pour une combinaison de polariseurs et de miroirs, qui permet de produire deux faisceaux parallèles. Le choix de la distance de séparation entre les deux faisceaux est guidé par deux contraintes : i) celle-ci doit être évidemment plus grande que la taille caractéristique d'une capsule pour éviter tout recouvrement de signal ; ii) elle doit être la plus petite possible pour obtenir la meilleure précision sur la détermination de la vitesse instantanée, et minimiser l'erreur sur la détermination de HWHM. Pratiquement, la distance inter-faisceaux a été fixée à 2 fois le diamètre typique d'une capsule, soit 600 µm.

Cette distance est mesurée précisément au début de chaque expérience. Le premier faisceau servira à détecter le passage d'une capsule et définir la référence temporelle ; on l'appellera faisceau de « trigger ». Le deuxième faisceau sera celui qui permettra l'enregistrement du signal d'absorption de lumière et sera appelé faisceau de « détection ». Le reste du système optique n'est pas modifié et est décrit sur la **Figure 70**. Nous avons choisi de conserver dans ce montage optique la partie micromanipulateur et moteur pas à pas, ces deux outils nous permettant de parfaire l'alignement du circuit microfluidique dans le laser. De plus, cela donne une versatilité augmentée de la plateforme, qui peut passer d'un mode de détection sous flux (décrit ici) à un mode de détection en déplacement motorisé de capsules immobilisées (décrit au chapitre 1), en masquant un des deux faisceaux en amont de la zone d'interaction.

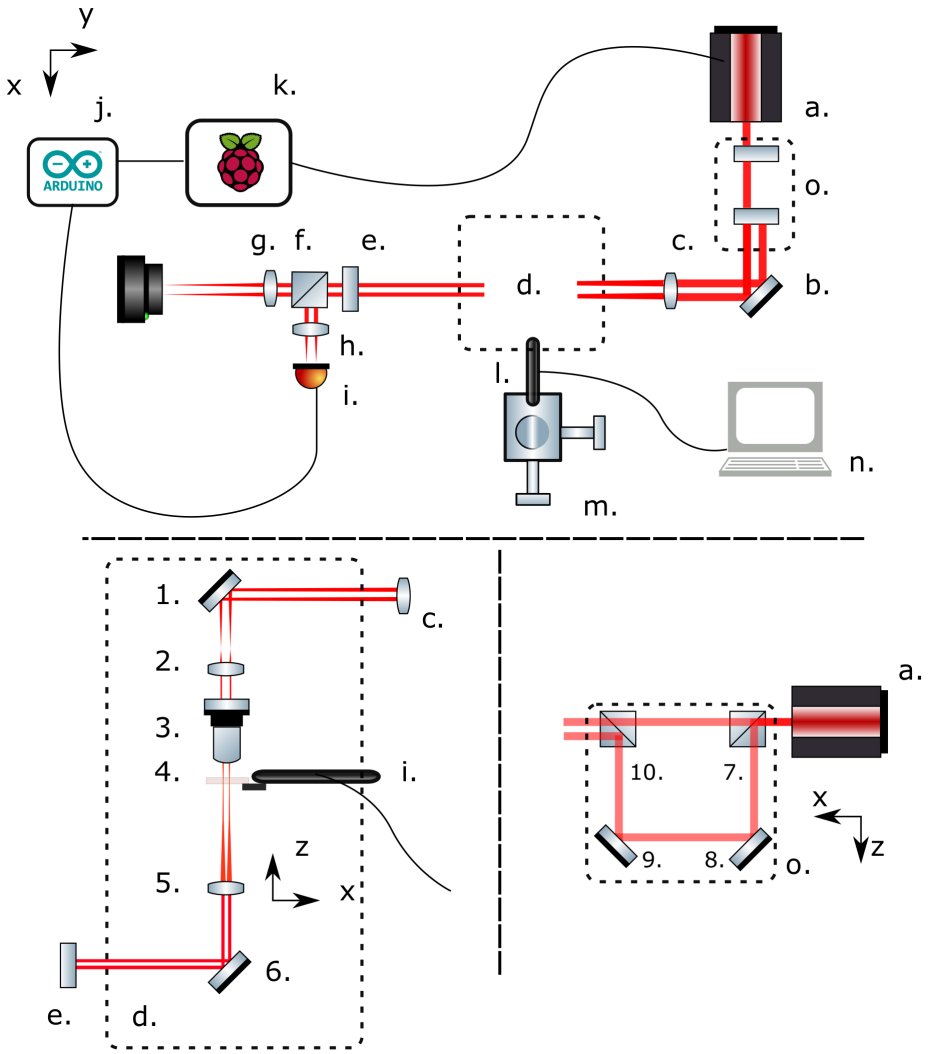


Figure 70 : Montage optique permettant l'analyse par translation de capsules uniques identifiées. **a.** Source laser collimatée circulaire, 1.2 mW, 635 nm, diamètre 2.9 mm. **b.** Miroir d'alignement. **c.** Lentille bi-convexe, f = 200 mm. **d. : Zone verticale : 1.** Second miroir d'alignement. **2.** Lentille bi-convexe, f = 15 mm, **3.** Objectif 10X Olympus plan achromat, ouverture numérique 0.25. **4.** Système microfluidique d'écoulement des capsules cellulaires. **5.** Lentille bi-convexe de collection, f = 75 mm. **6.** Miroir redirigeant. **e.** Lame à polarisation variable. **f.** Lame séparatrice polarisée. **g.** Lentille bi-convexe, f = 45 mm. **h.** Lentille bi-convexe, f = 30 mm. **i.** Photodiode. **j.** carte électronique d'acquisition arduino uno. **k.** Micro-ordinateur Raspberry PI. **l.** Moteur pas à pas, translation selon l'axe x. **m.** Micromanipulateur 3 axes (x,y,z). **n.** Ordinateur de contrôle du moteur pas à pas. **o. : Zone verticale de dédoublement du faisceau laser : 7.** Séparateur de faisceau cubique 40/60 **8.,9.** Miroirs d'alignement **10.** Lame recombinante des deux faisceaux décalés.

On notera également la possibilité de déplacer indépendamment l'un ou l'autre des faisceaux selon le plan (x, y), à l'aide des miroirs d'alignement du système de dédoublement (**Figure 70**-o.), afin de modifier la distance séparant les faisceaux, et d'obtenir une valeur précise de la vitesse de chaque sphéroïde. La **Figure 71** montre des images d'illustration du nouveau système expérimental.

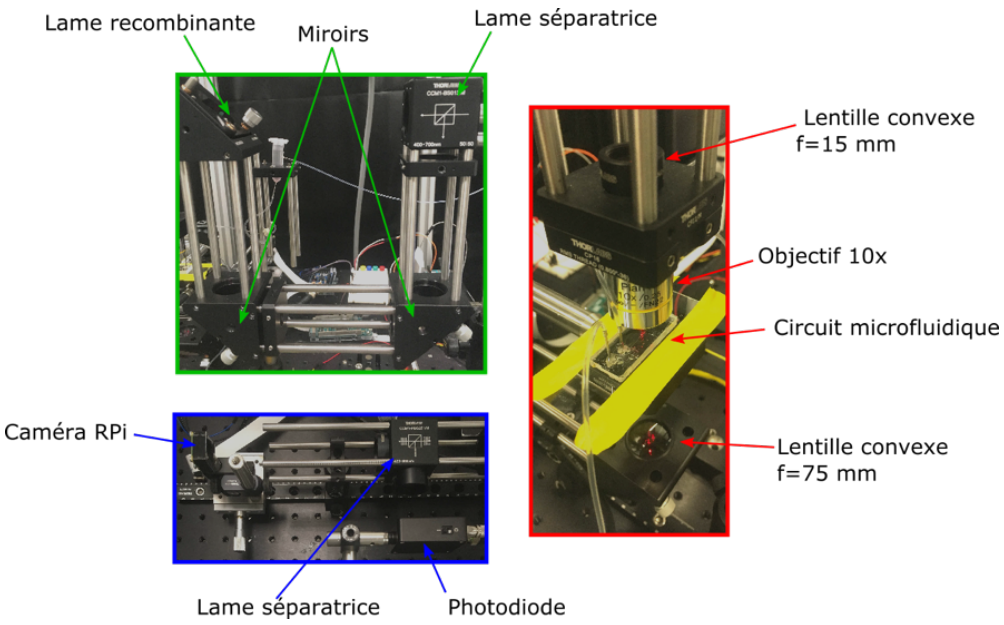


Figure 71 : Photographies du dispositif expérimental à double faisceau combinant module optique et module microfluidique. — Module de dédoublement du faisceau. — Module de détection. — Module d'acquisition.

Comme au chapitre 1, il est important de mesurer la largeur de chaque faisceau, afin de pouvoir réaliser les simulations nécessaires à l'identification des couples de rayon et de coefficient d'extinction. Nous réalisons cette analyse à l'aide d'une caméra adaptée (WinCamD , S-WCD-UHR), et d'un logiciel spécialisé (WinCamD Soft), qui nous permet d'obtenir la largeur de faisceau à différentes positions selon l'axe z.

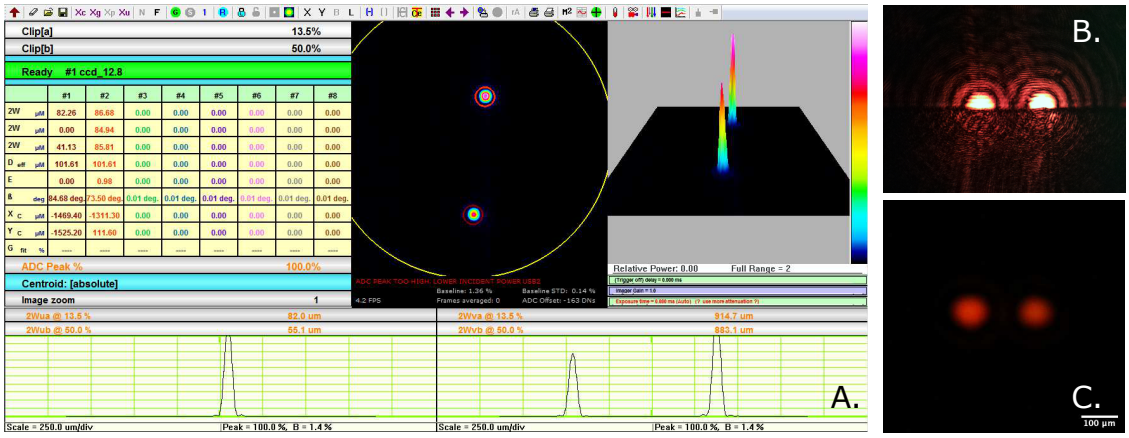


Figure 72 : Présentation du double faisceau. **A.** Capture d'écran du logiciel de mesure de largeur de faisceau (WinCam D Soft.). **B.** Image obtenue par caméra rpi v2 (système capsula) des deux faisceaux laser. **C.** Image obtenue par saturation du gain de la caméra rpi v2, montrant l'interaction entre les deux faisceaux et le bord du canal rectangulaire d'écoulement situé dans le circuit microfluidique

.

Cette caméra de profilage de faisceau a donc remplacé le circuit microfluidique et a été translatée par pas de 500 µm autour du point focal de la zone d'interaction laser-circuit, à l'aide du micro-manipulateur. Les résultats de ces mesures sont présentés à la Figure 73. La largeur $2\omega_0$ des deux faisceaux est de l'ordre de 20 et 25 µm respectivement au point focal, ce qui nous permet de rester dans le régime défini pour les simulations. On constate aussi que leur largeur varie de part et d'autre du point focal. Cette variation peut paraître importante sur une gamme de 8 mm, mais il faut rappeler que le canal microfluidique utilisé pour convoyer les capsules est de profondeur 500 µm. Or, pour un déplacement de 500 µm de chaque côté du point focal théorique, $2\omega_0$ ne varie que de 2%. Aussi, quelle que soit l'altitude des échantillons dans ce canal, la section d'interaction entre laser et capsule pourra être considérée comme constante. Notons en passant que le problème de sédimentation et le centrage hydrodynamique à 3D des capsules deviennent moins critiques (Zhao *et al* 2018). L'étape suivante est de mesurer l'intensité de chaque faisceau avec la photodiode PDA10A. Pour ce faire, nous cachons tour à tour l'un et l'autre des faisceaux au niveau du système de dédoublement, et enregistrons l'intensité détectée (vidéo supplémentaire correspondant à la **Figure 73**-B disponible ici). Comme on le voit sur le schéma optique de la Figure 70, les deux faisceaux sont focalisés sur le même détecteur, ce qui nous affranchit de problèmes de synchronisation des signaux détectés. Pour obtenir ces deux faisceaux, nous avons divisé le faisceau initial servira de « trigger ». Le second, pour lequel nous avons vérifié a posteriori que 60% de l'intensité initiale était suffisante pour obtenir une bonne sensibilité de mesure est utilisé comme faisceau de « détection ». Pour chaque expérience, nous réalisons au préalable une mesure « zéro » des deux faisceaux, qui sera ensuite utilisée lors du traitement des données, que nous présenterons à la prochaine section.

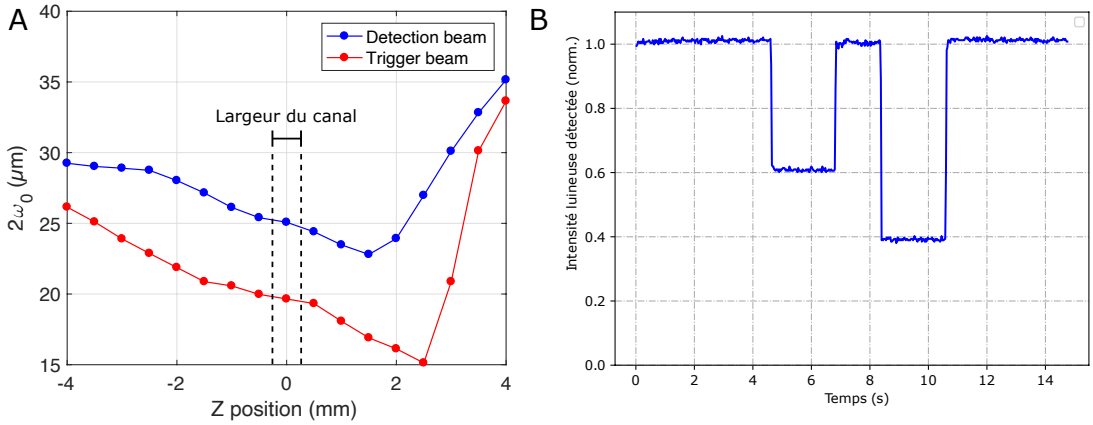


Figure 73 : Caractéristiques du double faisceau. **A.** Évolution de la largeur des faisceaux en fonction de la position selon z autour des coordonnées théoriques du point focal, pour deux faisceaux. **B.** Évolution de l'intensité détectée lors du masquage de l'un ou l'autre des deux faisceaux gaussiens.

5.2 Modification de l'électronique d'acquisition et traitement des données

La carte électronique Arduino UNO utilisée dans le système décrit au Chapitre 3est limitée en résolution temporelle d'acquisition à 25 ms par point de données. Cette limite est en partie due à la représentation en temps réel de l'évolution du signal par le RaspBerry Pi, et à la faible capacité de mémoire de stockage de la carte UNO. Il est nécessaire de faire évoluer le système vers une électronique plus performante, permettant un transfert et un stockage des valeurs bien plus rapide, adapté aux vitesses de passage des échantillons au travers du faisceau, et ce au prix de la représentation en temps réel.

5.2.1 Faisceau déclencheur et faisceau de détection, électronique associée

Comme on l'a présenté à la section précédente, les deux faisceaux utiles au calcul de la vitesse des capsules ne possèdent pas la même intensité lumineuse. La chute de l'intensité du faisceau déclencheur en dessous d'une valeur seuil définie par l'utilisateur servira uniquement à déclencher une détection électronique rapide qui aura lieu lors du passage de la capsule dans le deuxième faisceau plus intense. Nous n'utiliserons pas le signal issu de ce faisceau déclencheur pour l'analyse des données proprement dites, car l'enregistrement ne se fait pas en continu, et cela pour plusieurs raisons : Nous utilisons maintenant une carte d'acquisition Arduino DUE, qui permet l'enregistrement d'un signal de données à une fréquence maximale de 84 MHz. Mais, celle-ci est dotée d'une mémoire flash pouvant stocker 4096 octets de données, et les données sont ensuite transférées via un port série vers un ordinateur où seront répertoriées les détections dans des fichiers texte qui seront analysés après expérience. Une résolution temporelle de 1 point de données toutes les 10 µs étant suffisante dans notre gamme de vitesses d'écoulement (voir Chapitre 4), nous avons fixé notre fréquence d'acquisition à 100 kHz. A des vitesses d'écoulement de l'ordre de 10 mm/s et des capsules de 100-300 µm de diamètre, cela signifie qu'un signal de détection comportera environ 2000 points, ce qui est satisfaisant. Mais, toutes les 4 secondes, la détection est suspendue et les données stockées dans la mémoire flash sont envoyées à l'ordinateur pour écriture, ce qui ne nous permet pas de détecter en continu. Donc, la détection est déclenchée lorsqu'une capsule traverse le premier faisceau et l'acquisition se poursuit pendant 4 secondes maximum (paramétrable dans le script selon les débits d'injection des échantillons), durée plus que suffisante pour laisser à la capsule le temps de traverser le second faisceau, voire d'enregistrer le signal de capsules suivantes. Nous générons ainsi automatiquement au cours d'une expérience des dizaines de fichiers contenant chacun 40 000 points de données. Ces fichiers, qui peuvent contenir les détections de plusieurs capsules à la suite, nécessitent l'utilisation d'un script de traitement automatique et d'extraction des grandeurs d'intérêt (minimum d'extinction, $HWHM$), qui sera détaillé dans la prochaine section.

5.2.2 Reconnaissance de pics et extraction automatisée des valeurs d'intérêt

Après acquisition, les données de détection sont stockées sous forme de fichiers contenant 40 000 points, représentant chacun 4 secondes de signal. Sur cette durée, il faut identifier les pics correspondant au passage des capsules au travers du module optique à double faisceau. Il est primordial de différencier les pics du faisceau déclencheur et du faisceau de mesure. Pour chaque fichier remplissant les conditions de détection définies par l'utilisateur (dépassement d'un certain seuil d'intensité, vitesse maximale, largeur de pic…), on génère une figure de la détection brute (voir **Figure 74**). Dans notre cas, l'expérience nous a montré que le seuil de détection classique approprié pour les capsules cellulaires est une diminution soudaine de 10% de l'intensité reçue.

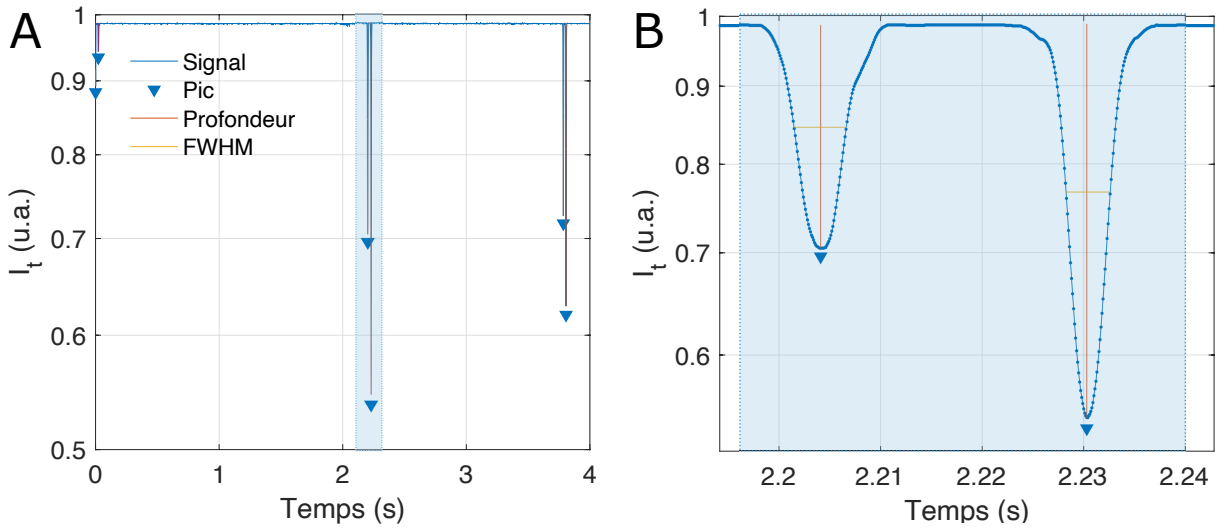


Figure 74 : Détection type d'une capsule unique centrée traversant le double faisceau. **A.** Intensité transmise en fonction du temps. Zone bleutée : pics de détection d'une capsule cellulaire traversant le faisceau. **B.** Zoom sur la zone utile.

Nous définissons dans le script de reconnaissance de pics les lignes de base d'intensité de chaque faisceau, préalablement déterminés (**Figure 73**-B). Le fonctionnement et le code associé à ce script sont détaillés en annexe, section 8.6 . On remarque que la détection des deux faisceaux est successivement atténuée par le passage d'une capsule. La différence de temps entre les deux pics permet alors de déterminer la vitesse de l'objet, qui est ensuite utilisée pour calculer la $HWHM$ du deuxième pic. La valeur minimale et la $HWHM$ sont stockées et seront ensuite traitées pour déterminer le rayon et le coefficient d'atténuation de chaque sphéroïde, comme cela a été décrit au chapitre 1. L'exemple présenté à la **Figure 74** montre un cas

« parfait », pour lequel les capsules sont bien espacées lors de leur écoulement. Mais, il arrive parfois que les détections comportent plus d'échantillons, comme à la **Figure 75**. Ceci complexifie l'analyse des données et nécessite quelquefois des ajustements dans les seuils de tolérance du script d'analyse.

Notons que, même si le processus d'analyse semble simple dans son principe, de nombreux cas particuliers peuvent venir compliquer la détection automatisée, puis fausser l'interprétation. La **Figure 76** montre quelques-uns de ces cas que nous avons rencontrés.

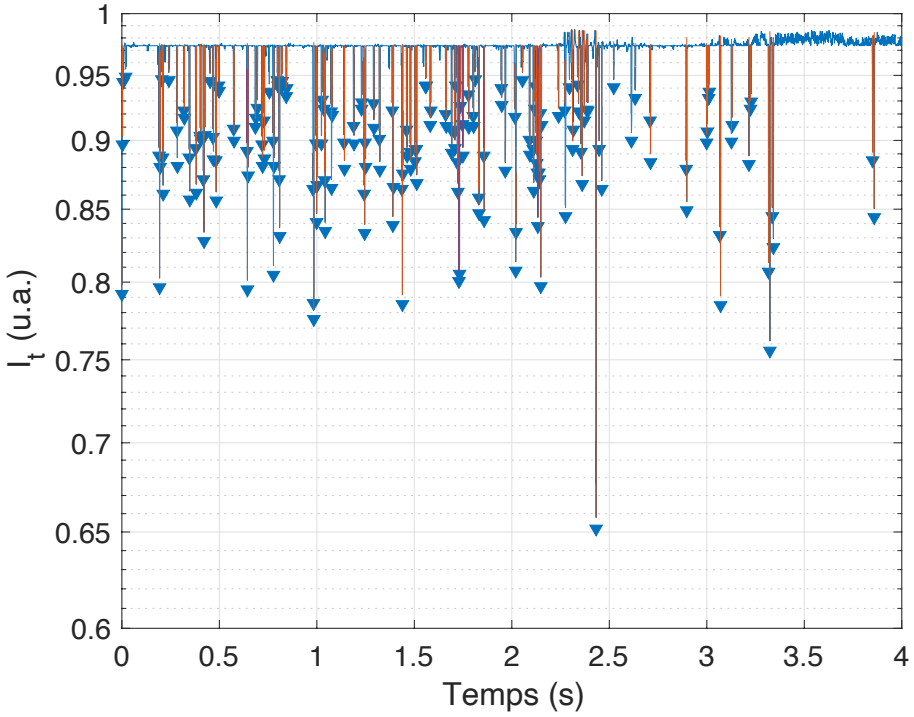


Figure 75 : Détection brute non-normalisée d'un cluster de capsules alignées traversant le module optique à des instants très proches.

La technique des capsules cellulaires permet de générer des dizaines de milliers de capsules. L'enjeu est d'obtenir une représentation statistique de leur taille et de caractériser optiquement leur contenu cellulaire. Il n'est pas de détecter tous les événements (comme c'est le cas par exemple dans la détection de cellules circulantes rares dans un échantillon sanguin).

Sans le souci de rater des événements, nous éliminerons donc simplement ces événements exotiques, qui sont issus de la préparation et l'injection de l'échantillon et représentent typiquement environ 5% de la totalité des événements analysés.

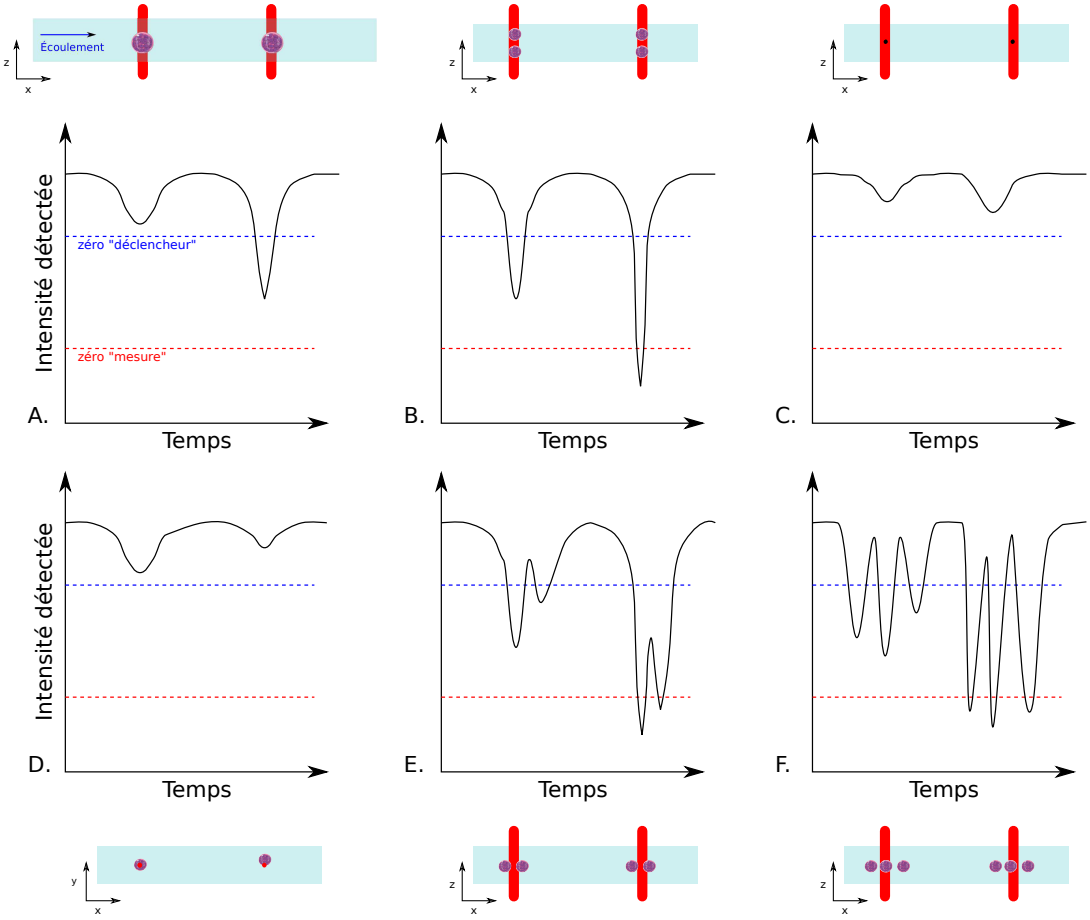


Figure 76 : Cas potentiels de détection de capsules rencontrés au cours d'une expérience : **A.** Cas idéal, une capsule seule et centrée traverse successivement les deux faisceaux. **B.** Deux capsules superposées traversent de front les faisceaux, entraînant une indétermination (cas rare). **C.** Impureté, détection inférieure à un seuil défini par l'utilisateur. **D**. Capsule décentrée entre les deux faisceaux. Doublet de capsules pour lequel l'ordre de passage peut être modifié, en plus d'un recouvrement partiel des deux détections. **F.** Train de capsules, pouvant arriver lors d'un bouchage ou une trop grande densité d'injection : données inexploitables.

Pour les résultats présentés ici, nous utilisons le logiciel MATLAB, dont le langage scripté permet aisément l'identification de pics au sein d'une courbe, et ce de manière paramétrable et automatisée. Néanmoins, une version *Python* « open-source » du code d'analyse est en développement, afin de s'affranchir totalement de ce langage propriétaire. À l'aide de ces scripts, l'utilisateur pourra modifier les critères d'analyse des mesures en fonction du type d'échantillon. Le code source de ce script d'analyse est disponible en annexe (section 8.6). À l'issue du traitement des données, nous obtenons une série de HWHM et de I_{min}, dont nous extrayons les valeurs extrêmes et moyennes que nous utiliserons avec le script permettant d'identifier les couples coefficient d'extinction-taille associés. Ces couples de valeurs sont donc caractéristiques des populations analysées mais représentent une tendance générale et non pas des mesures uniques propres à chaque capsule. Néanmoins, ce type d'analyse est également réalisable en récupérant les grandeurs propres à chaque pic détecté, et en appliquant le code d'identification de couples à chaque paire HWHM-I_{min}.

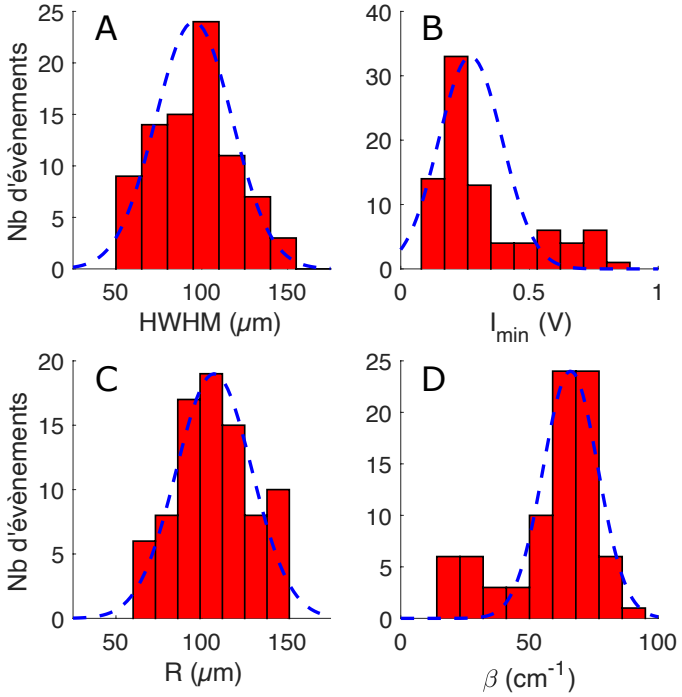


Figure 77 : Distributions des grandeurs mesurées et des grandeurs déduites par le système d'abaques, pour un échantillon de 83 capsules de cellules HuH6 vivantes, 8 jours après encapsulation.

A : Distribution de la HWHM. $\mu = 96.06 \pm 23\ \mu m$

B : Distribution de I_{min}. $\mu = 0.2407 \pm 0.0607$ V

C : Distribution de R. $\mu = 107.97 \pm 22.03\ \mu m$

D : Distribution de β. $\mu = 66.76 \pm 9.71\ cm^{-1}$

Ainsi, comme le montre la **Figure 77**, nous obtenons des distributions de HWHM et I_{min}, desquelles nous déduisons R et β, moyennés, sur toute la population. Notons ici que la distribution permet d'identifier des sous-populations, par exemple dans le cas où une partie des agrégats n'aurait pas poussé après l'encapsulation (voir **Figure 77**-B. valeurs < 0.4, et D. valeurs < 50). On pourrait ainsi se servir de ces distributions pour quantifier la proportion d'échantillons ayant poussé ou non lors des expériences, ou le taux de mortalité sous certaines conditions de culture.

5.3 Résultats

Nous nous focaliserons d'abord ici sur les lignées de lymphocytes B, SU-DHL-4 et HLY-1, pour lesquelles nous étudierons la croissance et l'évolution du coefficient d'atténuation. Le fait de pouvoir faire cette analyse sous flux nous permet d'utiliser des capsules contenant des agrégats de cellules vivantes, et non fixées comme au Chapitre 3. Une comparaison des deux conditions nous permettra de quantifier l'impact de la fixation au paraformaldéhyde sur le coefficient d'atténuation des sphéroïdes. Enfin, nous considérerons des organoïdes de cellules souches adipeuses, qui par différenciation induite par l'insuline, conduisent à des agrégats d'adipocytes chargés de gouttelettes d'huile. Nous évaluerons si la mesure du coefficient d'extinction est un indicateur possible de l'état « souche » ou « différencié » des progéniteurs adipeux.

5.3.1 Croissance de sphéroïdes de lymphocytes B

Dans le cadre d'un projet en collaboration avec l'Institut Bergonié visant à établir un modèle 3D in vitro de lymphome (manuscrit en préparation en Annexe, section 8.4), nous avons encapsulé deux lignées de lymphocytes B représentatives des lymphomes diffus à grandes cellules B. Ces deux lignées sont les SU-DHL-4 et HLY-1, qui ont été présentées au Chapitre 2. D'un point de vue biologique et dans leur réponse aux drogues, elles ont un comportement similaire (voir section 8.4). Nous les avons donc choisies pour déceler si notre technique permettait de faire émerger des différences plus subtiles. Nous les avons suivies pendant 10 jours de culture environ. Chaque jour, nous avons prélevé environ 100 capsules et les avons analysées en utilisant le dispositif décrit dans ce chapitre. La **Figure 78** présente les courbes de croissance obtenues. L'analyse ne commence qu'au jour 4 car la croissance débute par la formation d'une grappe cellulaire diffuse (et non un agrégat quasi sphérique) comme décrit à la section 3.3.3 du Chapitre 3.

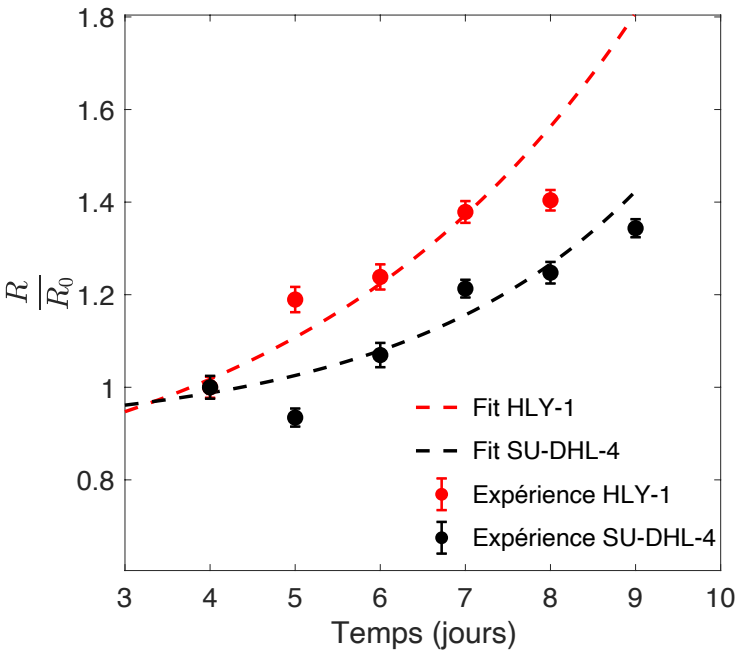


Figure 78 : Rayon normalisé,R/R_0, des sphéroïdes en fonction du temps pour deux lignées de lymphocytes B. A chaque pas de temps et pour chaque lignée, $N \sim 80$.

Nous observons que, dans les deux cas, le rayon du sphéroïde croît au cours du temps, ce qui signifie que les cellules survivent, se divisent et remplissent la capsule. En notant τ_d le temps de doublement (ou division cellulaire), on s'attend à ce que le nombre $N(t)$ de cellules suive une loi exponentielle (Drasdo and Höhme 2005) : $N(t) = N_0 e^{\frac{t}{\tau}}$, avec $\tau = \frac{\tau_d}{\ln(2)}$ et N_0 le nombre initial de cellules. Dans l'approximation où le volume cellulaire V_0 reste constant au cours de la croissance, le volume $V(t)$ de l'agrégat suit la même loi de croissance : $V(t) =$

$V_0 e^{\frac{t}{\tau}}$, avec V_0 le volume initial. Donc, la loi qui donne l'évolution du rayon est $R(t) = R_0 e^{\frac{t}{3\tau}}$. Cela signifie que la constante de temps est $\frac{3}{\ln(2)} = 4.3$ fois le temps de division cellulaire τ_d. En pratique, pour ajuster de telles courbes de croissance, il faut aussi introduire un éventuel délai (lag time) t_0 et une taille R_0 en dessous de laquelle la croissance du sphéroïde ne démarre pas. On a donc cherché à ajuster les données avec $R(t) = R_0 + \Delta R e^{\frac{t-t_0}{4.3\tau_d}}$. Or, dans cette série d'expériences destinée à atteindre une preuve de faisabilité, nous n'avons que 5 points de temps. Nous avons donc, après des initialisations variées des paramètres, recherché les solutions qui donnaient à la fois un ajustement satisfaisant et une valeur de la constante de temps compatible avec les valeurs attendues, c'est à dire τ_d~1 jour. Les deux ajustements sont représentés sur la **Figure 78**. Nous voyons que le temps de lag et la valeur du rayon minimal de l'agrégat pour déclencher la croissance sont plus élevés dans le cas des SU-DHL-4. Cela suggère que les HLY-1 sont plus promptes à former des sphéroïdes que les SU-DHL-4. En revanche, les temps de division sont de l'ordre de la journée et comparables : $\tau_d = 22\ h$ pour HLY-1 et $31\ h$ pour SU-DHL-4. Nous ne pouvons affirmer que cette différence est significative. Toutefois, une croissance un peu plus rapide pour HLY1 semble compatible avec le fait qu'elles forment plus facilement, et sans délai, des sphéroïdes.

De manière évidente, pour véritablement utiliser notre dispositif pour suivre la croissance de sphéroïdes et d'organoïdes, des prélèvements de capsules à intervalles plus courts ou une analyse en continu (par recirculation des capsules dans une enceinte à atmosphère et température contrôlée) sont nécessaires. Il est également dommage que nous n'ayons pu poursuivre ces expériences (faute de temps) sur des durées plus longues. En effet, c'est à 8-9 jours après encapsulation que les sphéroïdes arrivent à confluence. Après la confluence, les cellules étant confinées, la croissance n'est plus exponentielle(Drasdo and Höhme 2005) mais linéaire et l'hypothèse d'un volume cellulaire constant n'est plus valide. En effet, dans un travail antérieur Alessandri *et al* 2013 ont montré une augmentation induite par compaction de près d'un facteur 2 de la densité cellulaire après confluence. Cet effet aurait sans doute pu être décelé et quantifié par la mesure du coefficient d'atténuation β. Notre méthode optofluidique nous permettant d'obtenir directement β à partir du signal optique, nous avons également suivi son évolution dans la phase de croissance exponentielle pré-confluente.

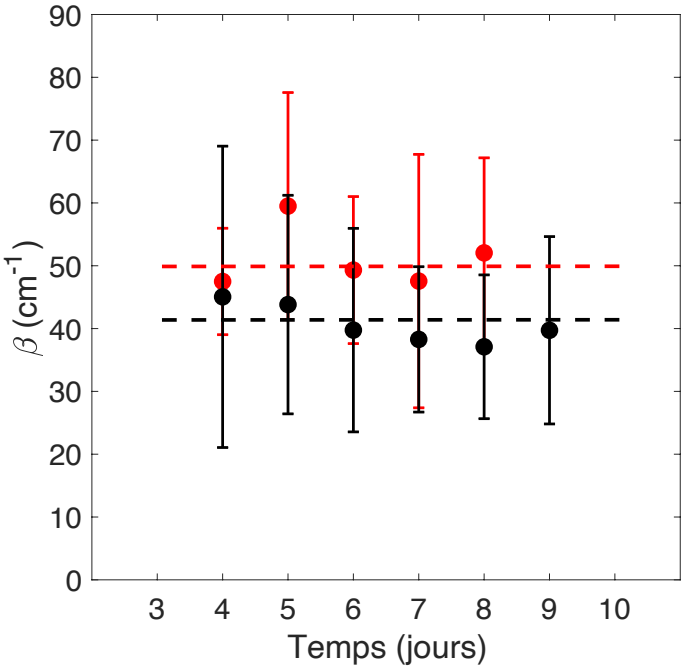
5.3.2 Propriétés optiques des sphéroïdes de, lymphocytes B

Le graphe du coefficient d'atténuation β en fonction du temps est représenté sur la **Figure 79** pour les deux mêmes lignées.

On constate que β reste quasiment constant au cours de la durée d'observation. La légère diminution initiale apparente, puis l'augmentation légère au jour 8 (correspondant à la confluence) ne peuvent toutefois être considérées comme significatives, compte tenu des barres

d'erreur. La différence sur la valeur moyenne de β au cours du temps est faible : au maximum 9 cm^{-1} pour SU-DHL-4 et 12 cm^{-1} pour HLY-1. Elle est cependant compatible avec le fait que, comme les cellules HLY-1 ont une plus grande « avidité » à former des sphéroïdes, on peut s'attendre à une meilleure cohésion, donc une plus grande densité cellulaire, donc un coefficient d'atténuation de la lumière supérieur. De manière plus frappante, il est à noter que les valeurs de β rapportées ici sont environ deux fois inférieures à celles déduites des mesures décrites au Chapitre 3. La différence essentielle entre les deux types d'échantillons est que les agrégats cellulaires étaient fixés alors qu'ils sont ici constitués de cellules vivantes. Ceci nous pousse à étudier plus en détail l'impact de l'étape de fixation sur le coefficient d'atténuation.

Figure 79 : Évolution du coefficient d'atténuation d'agrégats de cellules SU-DHL-4 (•) et HLY-1 (•). ---,--- : Valeurs moyennes.



5.3.3 Analyse d'une population de sphéroïdes de cellules HuH7, fixées et vivantes

Alors qu'il est couramment rapporté dans la littérature que la fixation modifie les propriétés physiques et optiques des cellules (par exemple la « transparence » dans les protocoles de « clearing » (Silvestri *et al* 2016, Richardson and Lichtman 2015)), à notre connaissance, aucune mesure quantitative n'a été rapportée. L'objet de ce paragraphe est précisément de mesurer le coefficient d'atténuation par des sphéroïdes fixés et vivants en utilisant la plateforme optofluidique développée ici. Pour s'affranchir d'une variabilité liée aux conditions de culture des cellules, nous avons encapsulé une lignée de cellules et avons laissé les agrégats croitre pendant 12 jours. En relation avec un projet du groupe sur la génération d'un tissu mimant un lobule du foie, nous avons sélectionné des hépatocytes, à savoir la lignée HuH7. Les sphéroïdes de ces cellules adhérentes croissent lentement mais forment des agrégats compacts. A J12, les capsules sont proches de la confluence (**Figure 80**-A). Nous en avons

prélevé, fixé la moitié et utilisé les autres (vivantes) immédiatement pour analyse. A partir d'une trentaine de traces (dont quelques-unes sont représentées à la **Figure 80**-B, pour chaque condition (fixée vs vivante), nous avons déterminé les valeurs moyennes de R et β déduites du « bee swarm plot » (**Figure 80**-C). Comme attendu, puisque les capsules fixées et vivantes sont issues du même lot de capsules pour un temps de culture identique, le rayon moyen est identique dans les deux cas : $R_f = 124.5 \pm 21.1\ \mu m$ et $R_v = 122.5 \pm 26.5\ \mu m$ pour les capsules fixées et vivantes respectivement. En revanche, la fixation a un effet significatif sur le coefficient d'atténuation : $\beta_f = 116 \pm 28\ cm^{-1}$ et $\beta_v = 48 \pm 41\ cm^{-1}$.

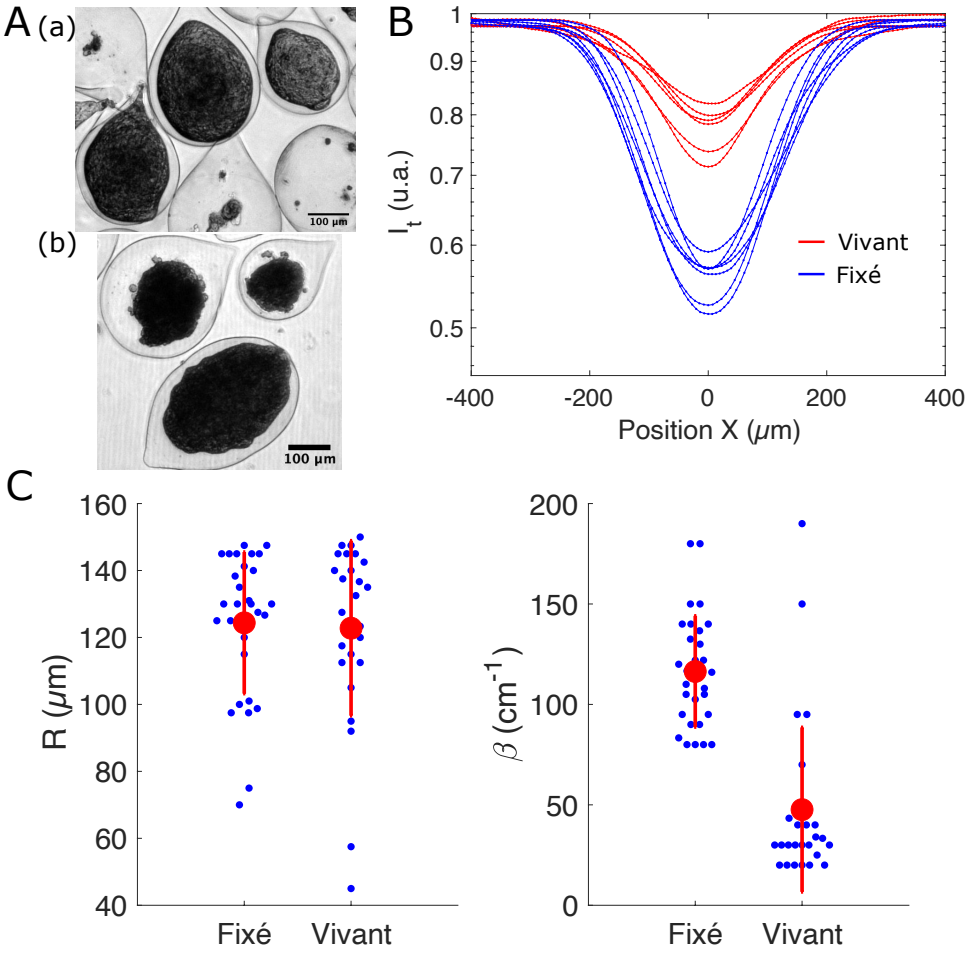


Figure 80 : Comparaison des rayons et du coefficient d'atténuation de sphéroïdes de cellules HuH7 vivants et fixés âgés de 12 jours, fixés (N=33) et vivants (N=34). **A.** Images en microscopie en champ clair de sphéroïdes vivants (a) et fixés (b). **B.** Traces brutes représentatives extraites des données expérimentales. **C.** Distribution des rayons et des coefficients d'atténuation pour chaque condition. Les points et barres rouges représentent la moyenne et l'écart-type, respectivement.

On retrouve à la fois les valeurs de β_f mesurées pour les sphéroïdes de lymphocytes fixés au Chapitre 3 section 3.3.3 , et les valeurs de β_v déduites à la section précédente pour les

sphéroïdes de lymphocytes vivants. Cela appelle deux remarques : i) notre dispositif a permis de quantifier le coefficient d'atténuation de micro-tissus fixés et vivants, ce qui n'avait pas été rapporté précédemment à notre connaissance, et montre que ceux-ci ont des propriétés optiques (de transparence dans le visible) très différentes. De manière un peu surprenante, l'atténuation est plus forte dans les systèmes fixés. On aurait pu s'attendre à la tendance opposée puisque les protocoles de transparisation reposent pour la plupart sur une fixation préalable. Cela suggère donc que les traitements ultérieurs au cours de ces protocoles permettent de surcompenser cette absorption augmentée due à l'utilisation de PFA ; ii) bien que trois lignées cellulaires différentes aient été testées, dont l'une donne lieu à des tumeurs solides et les deux autres sont caractéristiques de tumeurs liquides (moins compactes a priori), nous n'observons pas de différence significative au niveau des β déduits de nos mesures (pour une même condition).

5.3.4 Analyse d'une population d'organoïdes de cellules souches adipeuses et d'adipocytes (différenciés)

Pour tenter de savoir si notre dispositif optofluidique peut être utilisé pour distinguer des agrégats de contenu cellulaire différent, nous avons étudié un quatrième cas. La stimulation de cellules progénitrices d'adipocytes de souris (3T3F442-A) par de l'insuline provoque leur différenciation en adipocytes, qui sont caractérisés par i) l'apparition de gouttelettes d'huile à l'intérieur du cytoplasme (stockage des graisses), et ii) une augmentation du volume cellulaire (lié à cette accumulation de lipides). On peut anticiper que i) le volume (ou le rayon) d'un agrégat d'adipocytes (i.e. pour lequel les cellules ont été stimulées par l'insuline) sera supérieur à celui d'un agrégat de pré-adipocytes (non différenciés par l'insuline), et que ii) ce changement de composition, avec notamment l'apparition d'huile dans un milieu cellulaire essentiellement aqueux, pourrait induire une modification du coefficient d'atténuation. Nous avons effectué une analyse sur une quinzaine de sphéroïdes vivants, 10 jours après encapsulation, dans les deux conditions.

On retrouve bien que le rayon des agrégats cellulaires stimulés par insuline est supérieur à celui des agrégats sans insuline même si leur rayon ne leur permet pas encore d'atteindre la confluence. Plus important, le coefficient d'atténuation mesuré est sensiblement plus grand pour les adipocytes par rapport aux pré-adipocytes ($\beta_a = 70 \pm 23\ cm^{-1}$ et $\beta_p = 51 \pm 16\ cm^{-1}$, pour les adipocytes et les pré-adipocytes, respectivement). Pour aller plus loin, on pourrait envisager d'utiliser la mesure de β comme un indicateur de progression adipocytaire. Cela implique de calibrer l'augmentation de β avec l'augmentation volumique des gouttelettes lipidiques.

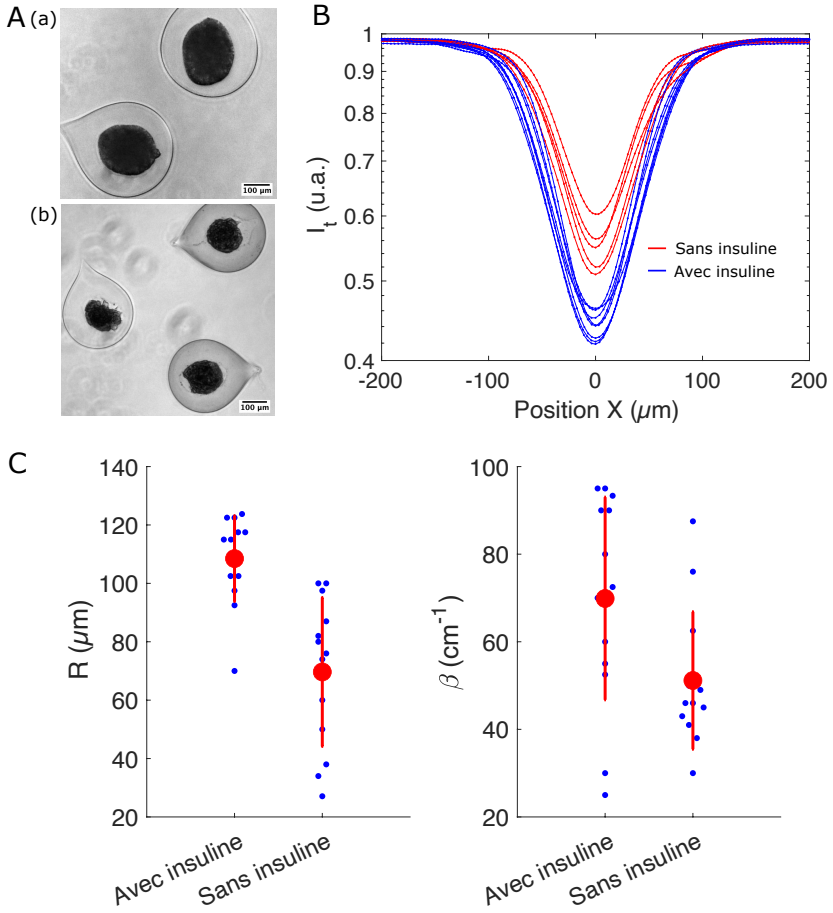


Figure 81 : Comparaison des rayons et du coefficient d'atténuation de'organoïdes de cellules 3T3F442-A vivants âgés de 10 jours, cultivés avec ajout d'insuline (N=15) et sans insuline (N=13). **A.** Images en microscopie en champ clair de sphéroïdes avec ajout d'insuline (a) et sans ajout d'insuline (b). **B.** Traces brutes représentatives extraites des données expérimentales. **C.** Distribution des rayons et des coefficients d'atténuation pour chaque condition. Les points et barres rouges représentent la moyenne et l'écart-type, respectivement.

5.4 Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons tout d'abord défini et mis en œuvre un moyen optique de détermination de la vitesse d'écoulement de chaque sphéroïde, afin de pouvoir remonter à leur taille. Après avoir présenté ce nouveau système optique, nous nous sommes penchés sur l'élaboration d'un système électronique permettant l'acquisition rapide et résolue temporellement de nos traces de détection, qui permettront d'extraire nos grandeurs d'intérêt : largeur à mi-profondeur et minimum d'intensité lumineuse transmise.

Nous avons ensuite écrit un script automatisé de détermination de couples rayon/coefficient d'atténuation correspondant aux valeurs mesurées, et permettant également d'obtenir des statistiques sur des populations entières analysées. A l'aide de cet outil informatique, nous avons alors réalisé des expériences d'analyse de capsules cellulaires de diverses lignées,

identiques à celles utilisées au Chapitre 3, à l'exception du fait que les échantillons qui y étaient analysés avaient été fixés, *a contrario* de ceux-ci, vivants.

Après avoir supposé que la fixation provoquait des différences notoires dans le coefficient d'atténuation des sphéroïdes, nous avons vérifié cette assertion en comparant une même lignée de cellules adhérentes dans les deux conditions, ce qui a corroboré notre hypothèse de départ, à savoir que la fixation augmente le coefficient d'atténuation des sphéroïdes.

Nous avons également utilisé le système pour analyser des sphéroïdes de cellules pro-génitrices d'adipocytes, ce qui nous a permis d'identifier un changement de coefficient d'atténuation entre agrégats différentiés sous l'action d'insuline et non différentiés, différence ouvrant la porte sur des applications de quantification des lipides accumulés et de détermination de l'état (différentié ou non) des cellules composant les agrégats. D'autres suggestions d'analyse et d'améliorations du système expérimental seront décrites dans la prochaine partie.

Chapitre 6

Conclusions et Ouvertures

L'objectif principal de ces travaux de recherche était de réaliser un instrument permettant d'étudier la taille et la composition des capsules cellulaires produites dans le laboratoire, de façon non destructrice, sans marquage fluorescent ni imagerie, et à haut-débit. La conception de cet instrument a mené à l'étude du comportement de ces capsules cellulaires dans un fluide en mouvement, et à la génération d'abaques pour les grandeurs de mesure, à l'aide de simulations de l'interaction entre un faisceau laser gaussien et une sphère de rayon et de coefficient d'atténuation fixés.

Synthèse des travaux menés

Au cours de ce travail de thèse, nous avons développé le prototype d'un analyseur optofluidique d'organoïdes et sphéroïdes multicellulaires, enveloppés de micro-capsules d'alginate réticulé. Il a été montré que cet instrument pouvait, en utilisant un simple faisceau laser comme sonde, obtenir une estimation du diamètre de chaque échantillon, puis reproduire une courbe de croissance des agrégats cellulaires. De plus, nous avons pu estimer le coefficient d'atténuation de chaque échantillon, ce qui fournit une information sur l'état de l'agrégat et son type. Ainsi, une différence de coefficient d'extinction a pu permettre de déterminer si les agrégats étaient fixés ou non, ou bien stimulés chimiquement dans le cas de cellules pro-génitrices d'adipocytes.

Pour arriver à ces résultats, nous avons développé un système optique simple, qui a tout d'abord permis la calibration de l'instrument et l'établissement d'une preuve de concept ainsi qu'une estimation de la qualité de nos mesures. Lors du passage d'un agrégat cellulaire sphérique dans le faisceau laser, on observe une baisse du signal lumineux due à la réfraction, l'absorption et la diffusion au sein de l'échantillon. Cette baisse se traduit par une courbe caractéristique, en forme de pic inversé, sur laquelle on relève deux grandeurs de mesure : la largeur à mi-profondeur et la valeur minimale de pic. Ces grandeurs peuvent alors être comparées à des abaques générées par simulation théorique, qui permettent de remonter à des valeurs estimées de diamètre et de coefficient d'atténuation pour chaque échantillon traversant le faisceau.

De façon à vérifier s'il était possible de mettre en pratique ce concept de mesure, des sphéroïdes au préalable imagés en microscopie classique ont été enfouis dans un gel transparent et déplacés à vitesse constante dans le faisceau. Les résultats de cette première calibration, en accord avec la littérature, ont notamment permis de conclure sur l'inutilité de « décapsuler » les échantillons avant analyse, ce qui va donc dans l'intérêt premier du système, à savoir la préservation des capsules cellulaires et la grande statistique de mesures.

Ces conclusions nous ont mené à l'étape suivante du projet : le prototypage d'un circuit microfluidique adéquat à la manipulation des capsules cellulaires, objets denses de taille sub-micrométrique, ne reproduisant pas le comportement classique de particules en mouvement dans un fluide à ces échelles de taille. Nous avons développé empiriquement un circuit microfluidique à l'aide d'une technologie d'impression 3D permettant de réaliser rapidement

de nombreux essais de moules à moindre coût. Le cahier des charges d'un tel circuit a été respecté, à savoir un centrage latéral des échantillons, et une distance de séparation entre chaque particule s'écoulant dans le canal microfluidique permettant une détection unitaire de chaque objet. Une analyse de l'altitude des échantillons dans le canal montre que ces derniers s'écoulent sur le fond de celui-ci, avec un mouvement de rotation ou de glissement oscillant. Cette altitude constante permet de placer les échantillons au waist du faisceau incident, assurant la même section d'interaction lumière-matière quelle que soit la dimension de l'agrégat étudié. Malgré les précautions prises lors de la fabrication du circuit microfluidique, chaque échantillon injecté possède une vitesse propre qui ne peut être ramenée à une valeur moyenne pour un débit d'injection donné. Aussi, cette valeur de vitesse étant critique dans le calcul de la largeur à mi-profondeur du pic de détection, nous avons dédoublé le faisceau laser incident de façon à pouvoir estimer la vitesse de déplacement de chaque capsule traversant le canal. Cette vitesse est alors enregistrée et utilisée pour obtenir le rayon de l'agrégat.

Les résultats issus de ce second set-up expérimental ont permis d'analyser des populations de sphéroïdes et d'organoïdes de plus de cinquante objets. Le nombre d'échantillons analysés a bien sûr été réduit pour des raisons de temps d'analyse et de multiplicité des conditions, mais le système est *a priori* capable d'analyser un nombre illimité de capsules cellulaires. Selon la vitesse d'injection de ces dernières, le taux de capsules analysées est situé entre 1000 et 2000 objets par heure. Ce taux est alors diminué par la sélection post-expérience des pics de détection qui est également modifiable par l'utilisateur. Par nos expériences, nous avons pu remonter à une estimation du temps de doublement de lymphocytes. De plus, nous avons mis en évidence l'impact d'un protocole de fixation des agrégats sur leur coefficient d'extinction et observé une variation de ce même coefficient lorsque des cellules souches adipocytaires se différencient.

Améliorations expérimentales

La première amélioration souhaitable sur un tel système serait un module de tri des capsules cellulaires détectées, selon les caractéristiques des courbes de détection enregistrées en temps réel, à l'instar d'un système de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) pour les cellules uniques. Ce tri est réalisable de diverses manières dans le cas des populations cellulaires, et il serait pertinent d'adapter les technologies déjà disponibles à cette échelle aux capsules cellulaires.

Une piste de travail déjà largement exploitée dans le cadre de tri d'embryons est l'utilisation de valves pneumatiques pour modifier l'injection ou non de fluides dans le système, à différentes pressions. On pourrait également modifier le circuit microfluidique de façon à générer des goulots de tailles inférieures à celle des capsules cellulaires, pour les piéger en deux temps et les diriger, selon leurs caractéristiques, vers des canaux différents.

Nous avons constaté que la résolution de notre méthode d'impression 3D permettait de telles modifications, et avons tenté de fabriquer un système microfluidique classique de piégeage de capsules, qui n'a pas encore été testé.

Un autre aspect qu'il serait pertinent d'apporter au projet est son utilisation sous une hotte stérile. Pour ce faire, il serait important de réduire les dimensions de l'analyseur, en miniaturisant les systèmes optiques. Une expérience intéressante dans ce cas de figure serait de cultiver les capsules cellulaires au sein même du système, en circuit fermé, pour pouvoir injecter toujours le même échantillon à intervalles réguliers, via un module d'injection automatisé, paramétrable directement dans le logiciel *Capsula*.

Enfin, l'ajout d'autres longueurs d'ondes d'interrogation serait facilement réalisable, et permettrait d'adapter l'analyse en fonction du type cellulaire étudié. Même si l'aspect « sans image » du système est clairement défendu, il serait possible, en remplaçant certains miroirs simples par des miroirs dichroïques ne réfléchissant que les longueurs d'onde des lasers, d'utiliser la partie optique de l'analyseur à l'envers, comme un microscope en champ clair. Avec une source de lumière blanche et une caméra rapide, il serait possible d'obtenir une vidéo contrôle en temps réel du circuit microfluidique, pour vérifier si aucun bouchage n'a eu lieu et si les capsules sont centrées.

Toutes ces améliorations techniques demandent de plus grandes ressources électroniques que celles proposées par les cartes Arduino, et il semble naturel de s'orienter vers une carte RedPitaya, qui propose un module FPGA (Field Programmable Gate Array), permettant la paralélisation des actions, ce qui autoriserait la détection, le tri et le contrôle simultanément.

Améliorations de l'analyse

Pour rendre l'utilisation du système plus « user-friendly », il serait pertinent d'implémenter le code de simulation directement dans le logiciel *Capsula*. Pour l'heure, ce code a uniquement été réalisé en langage *MATLAB*, mais une traduction vers le langage *Python* permettrait l'implémentation et la possibilité de régler les paramètres de simulation à l'intérieur même du logiciel. Néanmoins, un ordinateur RaspBerryPi ne pourrait pas simuler rapidement des abaques précises, faute de mémoire de travail suffisante. On pourrait donc utiliser un serveur distant, qui servirait également d'espace de stockage pour les détections. On contrôlerait alors à distance le système, ce qui faciliterait des expériences en conditions stériles.

Le code d'analyse des pics, également réalisé en langage *MATLAB,* a fait l'objet d'une première traduction vers *Python* qui, faute de temps, n'a pu être implémentée. L'apport de toutes ces modifications permettrait de fournir un instrument « clés en mains » mais adaptable par un utilisateur ayant des connaissances limitées en informatique et en électronique.

Ouverture expérimentale

Comme l'intégralité de l'analyseur est modifiable, il est possible d'utiliser d'autres circuits microfluidiques, d'autres débits d'injection, d'autres longueurs d'ondes, pour réaliser des expériences innovantes sur des agrégats multicellulaires. On pourrait par exemple transposer notre méthode aux embryons, avec un circuit microfluidique à canal plus large.

Une autre idée d'expérience inspirée par les mesures que nous avons réalisées sur les pré-adipocytes murins 3T3F442A serait de calibrer le système pour qu'il puisse déduire, du coefficient d'atténuation, la quantité de lipides formés au cours de la croissance de ces agrégats.

Dans une approche plus médicale, il serait très intéressant de parvenir à encapsuler des cellules tumorales de patients. Il serait alors possible de tester diverses chimiothérapies sur des sous populations de capsules cellulaires, et contrôler avec une grande statistique la croissance ou non de ces agrégats sous l'effet des traitements, afin de potentiellement déterminer celui qui serait le plus efficace à utiliser pour traiter le malade.

Chapitre 7

Bibliographie

Agarwal P, Zhao S, Bielecki P, Rao W, Choi J K, Zhao Y, Yu J, Zhang W and He X 2013 One-step microfluidic generation of pre-hatching embryo-like core–shell microcapsules for miniaturized 3D culture of pluripotent stem cells *Lab on a Chip* **13** 4525

Aggeler J, Park C S and Bissell M J 1988 Regulation of Milk Protein and Basement Membrane Gene Expression: The Influence of the Extracellular Matrix *Journal of Dairy Science* **71** 2830–42

Agresti J J, Antipov E, Abate A R, Ahn K, Rowat A C, Baret J-C, Marquez M, Klibanov A M, Griffiths A D and Weitz D A 2010 Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107** 4004–9

Alessandri K 2013 The Cellular Capsules technology 121

Alessandri K, Feyeux M, Gurchenkov B, Delgado C, Trushko A, Krause K-H, Vignjević D, Nassoy P and Roux A 2016 A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC) *Lab on a Chip* **16** 1593–604

Alessandri K, Sarangi B R, Gurchenkov V V, Sinha B, Kießling T R, Fetler L, Rico F, Scheuring S, Lamaze C, Simon A, Geraldo S, Vignjevic D, Doméjean H, Rolland L, Funfak A, Bibette J, Bremond N and Nassoy P 2013 Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110** 14843–8

Alinezhad S, Väänänen R-M, Mattsson J, Li Y, Tallgrén T, Tong Ochoa N, Bjartell A, Åkerfelt M, Taimen P, Boström P J, Pettersson K and Nees M 2016 Validation of Novel Biomarkers for Prostate Cancer Progression by the Combination of Bioinformatics, Clinical and Functional Studies ed N Kyprianou *PLOS ONE* **11** e0155901

Amini H, Lee W and Di Carlo D 2014 Inertial microfluidic physics *Lab on a Chip* **14** 2739

Anon Geislinger et Franke - 2014 - Hydrodynamic lift of vesicles and red blood cells .pdf

Banoth E, J V K, Srinivasan R and Gorthi S S 2014 Single-cell Transmittance Measurements on a Blood-smear for the Detection of Malaria **1** 29–33

Banoth E, Kasula V K, Jagannadh V K and Gorthi S S 2016a Optofluidic single-cell absorption flow analyzer for point-of-care diagnosis of malaria *Journal of Biophotonics* **9** 610–8

Banoth E, Kasula V K, Jagannadh V K and Gorthi S S 2016b Optofluidic single-cell absorption flow analyzer for point-of-care diagnosis of malaria *Journal of Biophotonics* **9** 610–8

Baret J-C, Miller O J, Taly V, Ryckelynck M, El-Harrak A, Frenz L, Rick C, Samuels M L, Hutchison J B, Agresti J J, Link D R, Weitz D A and Griffiths A D 2009 Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity *Lab on a Chip* **9** 1850

Beauvoit B, Kitai T, Liu H and Chance B 1995 Time-resolved spectroscopy of mitochondria, cells, and rat tissues under normal and pathological conditions International Symposium on Biomedical Optics Europe '94 ed S Avrillier, B Chance, G J Mueller, A V Priezzhev and V V Tuchin (Lille, France) pp 127–36 Online: http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?articleid=979023

Bellini N, Vishnubhatla K C, Bragheri F, Ferrara L, Minzioni P, Ramponi R, Cristiani I and Osellame R 2010 Femtosecond laser fabricated monolithic chip for optical trapping and stretching of single cells *Optics Express* **18** 4679

Bon P, Maucort G, Wattellier B and Monneret S 2009 Quadriwave lateral shearing interferometry for quantitative phase microscopy of living cells *Optics Express* **17** 13080

Bremond N, Santanach-Carreras E, Chu L-Y and Bibette J 2010 Formation of liquid-core capsules having a thin hydrogel membrane: liquid pearls *Soft Matter* **6** 2484

Breslin S and O'Driscoll L 2016 The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance *Oncotarget* **7** Online: http://www.oncotarget.com/fulltext/9935

Brody J P and Quake S R 1999 A self-assembled microlensing rotational probe *Applied Physics Letters* **74** 144–6

Brunel B 2018 *Mesure de la migration cellulaire dans des tissus non transparents, une application de la diffusion dynamique de la lumière*

Bryan A K, Hecht V C, Shen W, Payer K, Grover W H and Manalis S R 2014 Measuring single cell mass, volume, and density with dual suspended microchannel resonators *Lab Chip* **14** 569–76

Camou S, Fujita H and Fujii T 2003 PDMS 2D optical lens integrated with microfluidic channels: principle and characterization *Lab on a Chip* **3** 40

Chang S and Bowden A K 2019 Review of methods and applications of attenuation coefficient measurements with optical coherence tomography *Journal of Biomedical Optics* **24** 1

Chen C H, Cho S H, Tsai F, Erten A and Lo Y-H 2009 Microfluidic cell sorter with integrated piezoelectric actuator *Biomedical Microdevices* **11** 1223–31

Cheong W F, Prahl S A and Welch A J 1990 A review of the optical properties of biological tissues *IEEE Journal of Quantum Electronics* **26** 2166–85

Chignola R, Schenetti A, Andrighetto G, Chiesa E, Foroni R, Sartoris S, Tridente G and Liberati D 2000 Forecasting the growth of multicell tumour spheroids: implications for the dynamic growth of solid tumours *Cell Proliferation* **33** 219–29

Cho S H, Godin J M, Chen C-H, Qiao W, Lee H and Lo Y-H 2010 Review Article: Recent advancements in optofluidic flow cytometer *Biomicrofluidics* **4** 043001

Chung K, Wallace J, Kim S-Y, Kalyanasundaram S, Andalman A S, Davidson T J, Mirzabekov J J, Zalocusky K A, Mattis J, Denisin A K, Pak S, Bernstein H, Ramakrishnan C, Grosenick L, Gradinaru V and Deisseroth K 2013 Structural and molecular interrogation of intact biological systems *Nature* **497** 332–7

Clausell-Tormos J, Lieber D, Baret J-C, El-Harrak A, Miller O J, Frenz L, Blouwolff J, Humphry K J, Köster S, Duan H, Holtze C, Weitz D A, Griffiths A D and Merten C A 2008 Droplet-Based Microfluidic Platforms for the Encapsulation and Screening of Mammalian Cells and Multicellular Organisms *Chemistry & Biology* **15** 427–37

da Costa E T, Mora M F, Willis P A, do Lago C L, Jiao H and Garcia C D 2014 Getting started

with open-hardware: Development and control of microfluidic devices: Microfluidics and Miniaturization *ELECTROPHORESIS* **35** 2370–7

Cukierman E 2001 Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension *Science* **294** 1708–12

Czyz J and Wobus A M 2001 Embryonic stem cell differentiation: The role of extracellular factors *Differentiation* **68** 167–74

Dawson E, Mapili G, Erickson K, Taqvi S and Roy K 2008 Biomaterials for stem cell differentiation *Advanced Drug Delivery Reviews* **60** 215–28

DeChiara N S, Wilson D J and Mace C R 2017 An Open Software Platform for the Automated Design of Paper-Based Microfluidic Devices *Scientific Reports* **7** Online: http://www.nature.com/articles/s41598-017-16542-8

Dekkers J F, Alieva M, Wellens L M, Ariese H C R, Jamieson P R, Vonk A M, Amatngalim G D, Hu H, Oost K C, Snippert H J G, Beekman J M, Wehrens E J, Visvader J E, Clevers H and Rios A C 2019 High-resolution 3D imaging of fixed and cleared organoids *Nature Protocols* **14** 1756–71

Domachuk P, Cronin-Golomb M, Eggleton B J, Mutzenich S, Rosengarten G and Mitchell A 2005 Application of optical trapping to beam manipulation in optofluidics 11

Drasdo D and Höhme S 2005 A single-cell-based model of tumor growth *in vitro* : monolayers and spheroids *Physical Biology* **2** 133–47

Eke I, Hehlgans S, Sandfort V and Cordes N 2016 3D matrix-based cell cultures: Automated analysis of tumor cell survival and proliferation *International Journal of Oncology* **48** 313–21

Fercher A F, Drexler W, Hitzenberger C K and Lasser T Optical coherence tomography—principles and applications 66

Freyer J P and Sutherland R M 1980 Selective Dissociation and Characterization of Cells from Different Regions of Multicell Tumor Spheroids **40** 11

Freyer J P, Wilder M E and Jett J H 1987 Viable sorting of intact multicellular spheroids by flow cytometry *Cytometry* **8** 427–36

Fujii E, Yamazaki M, Kawai S, Ohtani Y, Watanabe T, Kato A and Suzuki M 2018 A simple method for histopathological evaluation of organoids *Journal of Toxicologic Pathology* **31** 81–5

Geislinger T M and Franke T 2014 Hydrodynamic lift of vesicles and red blood cells in flow — from Fåhræus & Lindqvist to microfluidic cell sorting *Advances in Colloid and Interface Science* **208** 161–76

Girard Y K, Wang C, Ravi S, Howell M C, Mallela J, Alibrahim M, Green R, Hellermann G, Mohapatra S S and Mohapatra S 2013 A 3D Fibrous Scaffold Inducing Tumoroids: A Platform for Anticancer Drug Development ed K Mehta *PLoS ONE* **8** e75345

Glasgow I K, Zeringue H C, Beebe D J, Seong-Jun Choi, Lyman J T, Chan N G and Wheeler M B 2001 Handling individual mammalian embryos using microfluidics *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* **48** 570–8

Godin M, Delgado F F, Son S, Grover W H, Bryan A K, Tzur A, Jorgensen P, Payer K, Grossman A D, Kirschner M W and Manalis S R 2010 Using buoyant mass to measure the growth of single cells *Nature Methods* **7** 387–90

Gossett D R, Tse H T K, Dudani J S, Goda K, Woods T A, Graves S W and Di Carlo D 2012a Inertial Manipulation and Transfer of Microparticles Across Laminar Fluid Streams *Small* **8** 2757–64

Gossett D R, Tse H T K, Dudani J S, Goda K, Woods T A, Graves S W and Di Carlo D 2012b Inertial Manipulation and Transfer of Microparticles Across Laminar Fluid Streams *Small* **8** 2757–64

Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H, Fukami K, Sakaue-Sawano A and Miyawaki A 2011 Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain *Nature Neuroscience* **14** 1481–8

Hardman R 2006 A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors *Environmental Health Perspectives* **114** 165–72

Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W and Kunz-Schughart L A 2010 Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again *Journal of Biotechnology* **148** 3–15

Holzinger M, Le Goff A and Cosnier S 2014 Nanomaterials for biosensing applications: a review *Frontiers in Chemistry* **2** Online: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2014.00063/abstract

Hosmane S, Fournier A, Wright R, Rajbhandari L, Siddique R, Yang I H, Ramesh K T, Venkatesan A and Thakor N 2011 Valve-based microfluidic compression platform: single axon injury and regrowth *Lab on a Chip* **11** 3888

Hsieh Y-F, Yang A-S, Chen J-W, Liao S-K, Su T-W, Yeh S-H, Chen P-J and Chen P-H 2014 A Lego®-like swappable fluidic module for bio-chem applications *Sensors and Actuators B: Chemical* **204** 489–96

Huang Y, Wang S, Guo Q, Kessel S, Rubinoff I, Chan L L-Y, Li P, Liu Y, Qiu J and Zhou C 2017 Optical Coherence Tomography Detects Necrotic Regions and Volumetrically Quantifies Multicellular Tumor Spheroids *Cancer Research* **77** 6011–20

Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, Funakoshi Y, Chayahara N, Toyoda M, Kiyota N, Takao S, Kono S, Nakatsura T and Minami H 2015 Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer *Oncology Reports* **33** 1837–43

Ino K, Ito A and Honda H 2007 Cell patterning using magnetite nanoparticles and magnetic force *Biotechnology and Bioengineering* **97** 1309–17

Kalra K and Tomar P C Stem Cell: Basics, Classification and Applications 10

Knight J B, Vishwanath A, Brody J P and Austin R H 1998 Hydrodynamic Focusing on a Silicon Chip: Mixing Nanoliters in Microseconds *Physical Review Letters* **80** 3863–6

Kolesky D B, Truby R L, Gladman A S, Busbee T A, Homan K A and Lewis J A 2014 3D Bioprinting of Vascularized, Heterogeneous Cell-Laden Tissue Constructs *Advanced Materials* **26** 3124–30

Kong D S, Thorsen T A, Babb J, Wick S T, Gam J J, Weiss R and Carr P A 2017 Open-source, community-driven microfluidics with Metafluidics *Nature Biotechnology* **35** 523–9

Koukharenko E, Kraft M, Ensell G J and Hollinshead N 2005 A comparative study of different thick photoresists for MEMS applications *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* **16** 741–7

Kretzschmar K and Clevers H 2016 Organoids: Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish *Developmental Cell* **38** 590–600

Krisher R L and Wheeler M B 2010 Towards the use of microfluidics for individual embryo culture *Reproduction, Fertility and Development* **22** 32

Kuswandi B, Nuriman, Huskens J and Verboom W 2007 Optical sensing systems for microfluidic devices: A review *Analytica Chimica Acta* **601** 141–55

Lee G Y, Kenny P A, Lee E H and Bissell M J 2007 Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells *Nature Methods* **4** 359–65

Lee G-B, Chang C-C, Huang S-B and Yang R-J 2006 The hydrodynamic focusing effect inside rectangular microchannels *Journal of Micromechanics and Microengineering* **16** 1024–32

Lee G-B, Hung C-I, Ke B-J, Huang G-R, Hwei B-H and Lai H-F 2001 Hydrodynamic Focusing for a Micromachined Flow Cytometer *Journal of Fluids Engineering* **123** 672–9

Li Z, Zhang Z, Emery T, Scherer A and Psaltis D 2006 Single mode optofluidic distributed feedback dye laser *Optics Express* **14** 696

Lo A T, Mori H, Mott J and Bissell M J 2012 Constructing Three-Dimensional Models to Study Mammary Gland Branching Morphogenesis and Functional Differentiation *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **17** 103–10

Lu H, Caen O, Vrignon J, Zonta E, El Harrak Z, Nizard P, Baret J-C and Taly V 2017a High throughput single cell counting in droplet-based microfluidics *Scientific Reports* **7** Online: http://www.nature.com/articles/s41598-017-01454-4

Lu Y-C, Fu D-J, An D, Chiu A, Schwartz R, Nikitin A Yu and Ma M 2017b Scalable Production and Cryostorage of Organoids Using Core-Shell Decoupled Hydrogel Capsules *Advanced Biosystems* **1** 1700165

Lu Y-C, Song W, An D, Kim B J, Schwartz R, Wu M and Ma M 2015 Designing compartmentalized hydrogel microparticles for cell encapsulation and scalable 3D cell culture *Journal of Materials Chemistry B* **3** 353–60

Ma M, Chiu A, Sahay G, Doloff J C, Dholakia N, Thakrar R, Cohen J, Vegas A, Chen D, Bratlie K M, Dang T, York R L, Hollister-Lock J, Weir G C and Anderson D G 2013 Core-Shell Hydrogel Microcapsules for Improved Islets Encapsulation *Advanced Healthcare Materials* **2** 667–72

Masters J R 2002 HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly *Nature Reviews Cancer* **2** 315–9

Mattei C, Alshawaf A, D'Abaco G, Nayagam B and Dottori M 2018 Generation of Neural Organoids from Human Embryonic Stem Cells Using the Rotary Cell Culture System: Effects

of Microgravity on Neural Progenitor Cell Fate *Stem Cells and Development* **27** 848–57

Minsky M 1955 Confocal scanning microscope *Rapport technique, Patent* **3** 14

Minsky M 1988 Memoir on inventing the confocal scanning microscope *Scanning* **10** 128–38

Mitteregger R, Vogt G, Rossmanith E and Falkenhagen D 1999 Rotary Cell Culture System (RCCS): A new Method for Cultivating Hepatocytes on Microcarriers *The International Journal of Artificial Organs* **22** 816–22

Mohapatra S, Nandi S, Chowdhury R, Das G, Ghosh S and Bhattacharyya K Spectral Mapping of 3D Multi-cellular Tumor Spheroid: Time- resolved Confocal Microscopy 42

Mori R, Sakai Y and Nakazawa K 2008 Micropatterned organoid culture of rat hepatocytes and HepG2 cells *Journal of Bioscience and Bioengineering* **106** 237–42

Mourant J R, Johnson T M, Doddi V and Freyer J P 2002 Angular dependent light scattering from multicellular spheroids *Journal of Biomedical Optics* **7** 93

Mroue R and Bissell M J 2012 Three-Dimensional Cultures of Mouse Mammary Epithelial Cells *Epithelial Cell Culture Protocols* Methods in Molecular Biology vol 945, ed S H Randell and M L Fulcher (Totowa, NJ: Humana Press) pp 221–50 Online: http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-125-7_14

Mukherjee P, Nebuloni F, Gao H, Zhou J and Papautsky I 2019 Rapid Prototyping of Soft Lithography Masters for Microfluidic Devices Using Dry Film Photoresist in a Non-Cleanroom Setting *Micromachines* **10** 192

Nath S and Devi G R 2016 Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model *Pharmacology & Therapeutics* **163** 94–108

Okumus B, Baker C J, Arias-Castro J C, Lai G C, Leoncini E, Bakshi S, Luro S, Landgraf D and Paulsson J 2018 Single-cell microscopy of suspension cultures using a microfluidics-assisted cell screening platform *Nature Protocols* **13** 170–94

Palacios-Ortega S, Varela-Guruceaga M, Martínez J A, de Miguel C and Milagro F I 2016 Effects of high glucose on caveolin-1 and insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes *Adipocyte* **5** 65–80

Pampaloni F, Ansari N and Stelzer E H K 2013 High-resolution deep imaging of live cellular spheroids with light-sheet-based fluorescence microscopy *Cell and Tissue Research* **352** 161–77

Ren L, Chen Y, Li P, Mao Z, Huang P-H, Rufo J, Guo F, Wang L, McCoy J P, Levine S J and Huang T J 2015 A high-throughput acoustic cell sorter *Lab on a Chip* **15** 3870–9

Richardson D S and Lichtman J W 2015 Clarifying Tissue Clearing *Cell* **162** 246–57

Robinson M, Marks H and Coté G L 2016 Comparison of production methods of a spiral inertial microfluidic cell separation device SPIE BiOS ed G L Coté (San Francisco, California, United States) p 97151C Online: http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.2213894

Ruppen J, Wildhaber F D, Strub C, Hall S R R, Schmid R A, Geiser T and Guenat O T 2015 Towards personalized medicine: chemosensitivity assays of patient lung cancer cell spheroids

in a perfused microfluidic platform *Lab on a Chip* **15** 3076–85

Saengwimol D, Rojanaporn D, Chaitankar V, Chittavanich P, Aroonroch R, Boontawon T, Thammachote W, Jinawath N, Hongeng S and Kaewkhaw R 2018 A three-dimensional organoid model recapitulates tumorigenic aspects and drug responses of advanced human retinoblastoma *Scientific Reports* **8** Online: http://www.nature.com/articles/s41598-018-34037-y

Sanchez C G, Teixeira F K, Czech B, Preall J B, Zamparini A L, Seifert J R K, Malone C D, Hannon G J and Lehmann R 2016 Regulation of Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis Controls Germline Stem Cell Differentiation *Cell Stem Cell* **18** 276–90

Santi P A 2011 Light Sheet Fluorescence Microscopy: A Review *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **59** 129–38

Sato T, Vries R G, Snippert H J, van de Wetering M, Barker N, Stange D E, van Es J H, Abo A, Kujala P, Peters P J and Clevers H 2009 Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche *Nature* **459** 262–5

Scherer W F Epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix 21

Seo J and Lee L P 2004 Disposable integrated microfluidics with self-aligned planar microlenses *Sensors and Actuators B: Chemical* **99** 615–22

Shamir E R and Ewald A J 2014 Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15** 647–64

Shapiro H M 2003 *Practical flow cytometry* (New York: Wiley-Liss)

Sikorski P, Mo F, Skjåk-Bræk G and Stokke B T 2007 Evidence for Egg-Box-Compatible Interactions in Calcium−Alginate Gels from Fiber X-ray Diffraction *Biomacromolecules* **8** 2098–103

Silvestri L, Costantini I, Sacconi L and Pavone F S 2016 Clearing of fixed tissue: a review from a microscopist's perspective *Journal of Biomedical Optics* **21** 081205

Simian M and Bissell M J 2017 Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions *Journal of Cell Biology* **216** 31–40

Soe A K, Fielding M and Nahavandi S 2013 Lab-on-a-Chip Turns Soft: Computer-Aided, Software-Enabled Microfluidics Design 4

Souza A G, Silva I Beatriz B, Campos-Fernandez E, Barcelos L S, Souza J B, Marangoni K, Goulart L R and Alonso-Goulart V 2018 Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response *Current Pharmaceutical Design* **24** 1689–94

Souza G R, Molina J R, Raphael R M, Ozawa M G, Stark D J, Levin C S, Bronk L F, Ananta J S, Mandelin J, Georgescu M-M, Bankson J A, Gelovani J G, Killian T C, Arap W and Pasqualini R 2010 Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation *Nature Nanotechnology* **5** 291–6

Stiles T, Fallon R, Vestad T, Oakey J, Marr D W M, Squier J and Jimenez R 2005

Hydrodynamic focusing for vacuum-pumped microfluidics *Microfluidics and Nanofluidics* **1** 280–3

Sudarsan A P and Ugaz V M 2006 Multivortex micromixing *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103** 7228–33

Sutherland R 1988 Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model *Science* **240** 177–84

Sutherland R M, Inch W R, McCredie J A and Kruuv J 1970 A Multi-component Radiation Survival Curve Using an *in Vitro* Tumour Model *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* **18** 491–5

Tan A, Yildirimer L, Rajadas J, De La Peña H, Pastorin G and Seifalian A 2011 Quantum dots and carbon nanotubes in oncology: a review on emerging theranostic applications in nanomedicine *Nanomedicine* **6** 1101–14

Tanaka H, Matsumura M and Veliky I A 1984 Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads *Biotechnology and Bioengineering* **26** 53–8

Tung Y-C, Hsiao A Y, Allen S G, Torisawa Y, Ho M and Takayama S 2011 High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array *The Analyst* **136** 473–8

Turco G, Donati I, Grassi M, Marchioli G, Lapasin R and Paoletti S 2011 Mechanical Spectroscopy and Relaxometry on Alginate Hydrogels: A Comparative Analysis for Structural Characterization and Network Mesh Size Determination *Biomacromolecules* **12** 1272–82

Vamvakidou A P, Mondrinos M J, Petushi S P, Garcia F U, Lelkes P I and Tozeren A 2007 Heterogeneous Breast Tumoroids: An In Vitro Assay for Investigating Cellular Heterogeneity and Drug Delivery *Journal of Biomolecular Screening* **12** 13–20

Vermeer K A, Mo J, Weda J J A, Lemij H G and de Boer J F 2014 Depth-resolved model-based reconstruction of attenuation coefficients in optical coherence tomography *Biomedical Optics Express* **5** 322

Vidi P-A, Bissell M J and Lelièvre S A 2012 Three-Dimensional Culture of Human Breast Epithelial Cells: The How and the Why *Epithelial Cell Culture Protocols* Methods in Molecular Biology vol 945, ed S H Randell and M L Fulcher (Totowa, NJ: Humana Press) pp 193–219 Online: http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-125-7_13

Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Court W, Lomas C, Mendiola M, Hardisson D and Eccles S A 2012 Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation *BMC Biology* **10** 29

Wang X, Chen S, Kong M, Wang Z, Costa K D, Li R A and Sun D 2011 Enhanced cell sorting and manipulation with combined optical tweezer and microfluidic chip technologies *Lab on a Chip* **11** 3656

Whitesides G M and Tang S K Y 2006 Fluidic optics SPIE Optics + Photonics ed D Psaltis and Y Fainman (San Diego, California, USA) p 63290A Online: http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.681672

Wolfe D B, Conroy R S, Garstecki P, Mayers B T, Fischbach M A, Paul K E, Prentiss M and

Whitesides G M 2004 Dynamic control of liquid-core liquid-cladding optical waveguides 5

Wu T-H, Chen Y, Park S-Y, Hong J, Teslaa T, Zhong J F, Di Carlo D, Teitell M A and Chiou P-Y 2012 Pulsed laser triggered high speed microfluidic fluorescence activated cell sorter *Lab on a Chip* **12** 1378

Wu W, DeConinck A and Lewis J A 2011 Omnidirectional Printing of 3D Microvascular Networks *Advanced Materials* **23** H178–83

Xu C, Schmitt J M, Carlier S G and Virmani R 2008 Characterization of atherosclerosis plaques by measuring both backscattering and attenuation coefficients in optical coherence tomography *Journal of Biomedical Optics* **13** 034003

Yang S, Liu K, Yao L, Liu K, Weng G, Xu K and Li P 2019 Correlation of optical attenuation coefficient estimated using optical coherence tomography with changes in astrocytes and neurons in a chronic photothrombosis stroke model *Biomedical Optics Express* **10** 6258

Zaouk R, Park B Y and Madou M J 2005 Fabrication of Polydimethylsiloxane Microfluidics Using SU-8 Molds *Microfluidic Techniques* vol 321 (New Jersey: Humana Press) pp 17–22 Online: http://link.springer.com/10.1385/1-59259-997-4:17

Zhao G, Liu X, Zhu K and He X 2017 Hydrogel Encapsulation Facilitates Rapid-Cooling Cryopreservation of Stem Cell-Laden Core-Shell Microcapsules as Cell-Biomaterial Constructs *Advanced Healthcare Materials* **6** 1700988

Zhao Y, Lai H S S, Zhang G, Lee G-B and Li W J 2015a Measurement of single leukemia cell's density and mass using optically induced electric field in a microfluidics chip *Biomicrofluidics* **9** 022406

Zhao Y, Lai H S S, Zhang G, Lee G-B and Li W J 2015b Measurement of single leukemia cell's density and mass using optically induced electric field in a microfluidics chip *Biomicrofluidics* **9** 022406

Zhao Y, Lai H S S, Zhang G, Lee G-B and Li W J 2014a Rapid determination of cell mass and density using digitally controlled electric field in a microfluidic chip *Lab Chip* **14** 4426–34

Zhao Y, Lai H S S, Zhang G, Lee G-B and Li W J 2014b Rapid determination of cell mass and density using digitally controlled electric field in a microfluidic chip *Lab Chip* **14** 4426–34

Zhao Y, Li Q and Hu X 2018 Universally applicable three-dimensional hydrodynamic focusing in a single-layer channel for single cell analysis *Analytical Methods* **10** 3489–97

Chapitre 8

Annexes

8.1 Protocole de fixation des capsules cellulaires

Afin de pouvoir fixer les agrégats multicellulaires contenus dans les capsules, il a fallu adapter le protocole classique de fixation des cellules au paraformaldéhyde 4%. En effet, cette technique utilise du PBS (Tampon Phosphate Salin), qui dissout la capsule. Or, nous souhaitons conserver l'intégrité de cette dernière, notamment dans le cas d'agrégats aux temps cours de croissance.

Étape 1 : À l'aide d'une pipette 50 ml, passer la suspension de capsules prélevée dans une flasque de culture au travers d'un tamis de culture de maillage 40 µm (ClearLine Cell Strainer 141378C).

Étape 2 : Retourner le tamis au-dessus d'un tube Falcon 50 ml et écouler environ 5 ml de milieu de culture adapté, pour décrocher les capsules du tamis, en les faisant tomber au fond du Falcon. Attendre 2 à 3 minutes que les capsules sédimentent et forment un culot visible à l'œil nu au fond du Falcon.

Étape 3 : Venir délicatement aspirer à l'aide d'une pipette Pasteur stérile le surplus de milieu dans le Falcon, de façon à ne conserver que le culot de capsules.

Étape 4 : Ajouter 1 ml de paraformaldéhyde 16% (Alfa Aesar 43368), puis compléter avec du milieu de culture jusqu'à un volume total de 4 mL.

Étape 5 : Pipetter vigoureusement et transvaser le tout dans un Falcon 15 mL, que l'on fermera hérmétiquement à l'aide de parafilm.

Étape 6 : Conserver les échantillons entre 0°C et +4°C.

8.2 Protocole d'hydrophobisation de puces microfluidiques d'encapsulation cellulaire

Étape 1 : Sécher la pointe en verre et le corps de puce à l'aide d'une soufflette ou d'une bombe à air comprimé.

Étape 2 : Placer la puce au Plasma Cleaner (PDC 002 - Harrick Plasma) pendant 30 secondes, à puissance 18W et pression 600 mTorr.

Étape 3 : Sous une sorbonne de chimie, placer une goutte de 10 ml de (1H,1H,1H,2H-perfluorooctyltrimethoxysilane) (Merck, Silanes Gaz, 667420) au centre d'une boîte de Petri en verre.

Étape 4 : À l'aide d'un support, placer la puce microfluidique 1 cm au dessus de la goutte, pointe vers le bas, et laisser le silane s'évaporer et se déposer pendant 45 minutes, sorbonne fermée.

Étape 5 : Placer la puce au four (60°C), pendant 20 minutes.

Étape 6 : Vérifier l'hydrophobisation de la puce en déposant quelques gouttelettes d'eau mQ sur sa surface. Le mouillage doit être très réduit.

8.3 Protocole de décapsulation de capsules cellulaires

Étape 1 : Placer les capsules cellulaires dans une boîte de Petri ($\emptyset = 100\ mm$) et compléter le niveau jusqu'à 3 ml de milieu de culture.

Étape 2 : Compléter avec 2 ml de tampon phosphate salin (Dulbecco PBS), et contrôler simultanément sous microscope champ large ou loupe binoculaire la dissolution des coques d'alginate (temps de dissolution compris entre 1 et 3 minutes).

Étape 3 : Tamiser très délicatement le contenu de la boîte de Petri et placer les agrégats décapsulés dans un tube Falcon 15 ml contenant du milieu frais. Utiliser rapidement les échantillons de façon à éviter toute désagrégation ou impact extérieur.

8.4 Article en préparation

Stromal cells regulate malignant B-cell spatial organization, survival, and drug response in a novel 3D model mimicking lymphoma tumor niche

Claire Lamaison[1¥], Simon Latour [2,3¥‡], Nelson Hélaine[4 ¥], Valérie Le Morvan[2,3], Céline Monvoisin[1], Isabelle Mahouche[2,3], Christelle Dussert[2,3], Elise Dessauge[1], Céline Pangault[1,5] Léa Broca-Brisson[2,3], Kévin Alessandri[4‡], Pierre Soubeyran[2,3], Frederic Mourcin[1], Pierre Nassoy[4], Gaëlle Recher[4,**], Karin Tarte[1,5,**] and Laurence Bresson-Bepoldin[2,3,**‡]

[¥] : co-first authors
**: co-corresponding authors
[1]UMR S 1236, Univ Rennes, INSERM, Etablissement Français du sang, F-35000, Rennes, France.
[2]Univ. Bordeaux, INSERM, U1218 ACTION F-33076 Bordeaux, France
[3]Institut Bergonié, Comprehensive Cancer Centre, Bordeaux, France
[4]Univ. Bordeaux, CNRS, UMR 5298 LP2N, Laboratoire Photonique Numérique et Nanosciences, Institut d'Optique Graduate School, F-33400 Talence, France
[5]SITI, Pôle de Biologie, CHU Pontchaillou, F-35000, Rennes, France

**: Corresponding authors:
laurence.bresson-bepoldin@inserm.fr
karin.tarte@univ-rennes1.fr
gaelle.recher@institutoptique.fr
[‡] Present address: TreeFrog Therapeutics, 33600 Pessac, France

ABSTRACT

INTRODUCTION

Non-Hodgkin lymphoma (NHL) is a group of common hematological malignancies, the majority of which originate from B cells. Follicular lymphoma (FL) and diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL), the two most frequent B-cell NHL (Smith et al 2011, Teras LR et al 2016), result from the malignant transformation of germinal or post-germinal center B cells. FL are indolent lymphomas characterized by the occurrence of the t(14;18)(q32;q21) translocation combined with additional recurrent somatic alterations (Huet et al 2018). In the other hand, two major subtypes of aggressive DLBCL, germinal center B cell (GCB) and activated B cell (ABC)-DLBCL, have been identified using gene expression profiling, reflecting their putative cell of origin and molecular alterations (Alizadeh AA et al, 2000). Despite a better understanding of the pathophysiology of these tumors, frontline therapy remains based on a combination of conventional chemotherapies such as CHOP (Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicin,

Vincristine and Prednisone) and a monoclonal antibody against CD20. Nonetheless, 30–40% of DLBCL patients develop relapse or have refractory disease that cannot be cured with the standard immunochemotherapy. In addition, FL remains essentially an incurable disease and about 20% of patients progress or relapse in the first 2 years following treatment initiation with a dismal prognosis (Huet et al, 2018, REF DLBCL).

It is now accepted that tumors constitute a complex ecosystem composed of many cell types regulated by biological, structural, chemical, and mechanical cues, especially with regard to the effectiveness of therapeutic molecules (Bissell MJ 2001). The tumor microenvironment of B-cell lymphomas contains highly variable numbers of immune cells, stromal cells, blood vessels, and extracellular matrix (ECM) and the interplay between these elements produces a tumor niche specific to each lymphoma sub-types (Scott and Gascoyne, 2014; Verdière et al 2018). FL exhibits a high dependence on a GC-like microenvironment where immune and stromal cells support survival, proliferation, and migration of malignant B cells. In turn, FL cells modulate phenotype and function of their surrounding microenvironment. In particular, FL-infiltrating stromal cells are engaged in a bidirectional crosstalk with malignant B cells within infiltrated lymph nodes and bone marrow (Guilloton 2012, Pandey 2017). Conversely DLBCL have been proposed as less dependent on lymph node microenvironment but specific stromal signatures have been shown to impact DLBCL prognosis (Scott and Gascoyne 2014; Fowler et al 2016). Importantly, studies exploring functional interactions between lymphoma B cells and stromal cells have been essentially performed in 2D *in vitro* culture models whereas biomechanical forces and 3D organization emerged as key determinants of lymphoma pathogenesis and drug resistance.

In particular, 2D culture of cell lines is the model mainly used to screen new molecules. However, this constitutes an “ideal” model where nutrients, oxygen, and drugs reach freely all cells. In addition, these cell cultures do not consider the spatial architecture of tissues, lack microenvironment, and ECM identified as tumor safety guards from chemotherapies. In this context, multicellular spheroids or tumor organoids represent promising models allowing mixing of several cell types, ECM components and high-throughput screening of anti-cancer drugs. While 3D organoids are increasingly developed for solid cancer (Clevers H 2016), the achievements for modeling lymphoma are still scarce and include: i) multicellular aggregates of lymphoma cells obtained using hanging drop method, which are useful for testing drug efficacy but do not account for the effect of cell-cell and cell-ECM interactions (Gravelle 2014; Decaup 2013), ii) 3D lymphoma organoid models integrating lymphoid-like stromal cells or integrin-specific binding peptides to recapitulate more accurately lymphoma microenvironment, but difficult to handle and low throughput (Tian et al., 2015).

In the present study, we aim at providing a 3D lymphoma model that both integrates interactions between stromal cells and lymphoma B cells and is amenable to high throughput screening. Using a microfluidic method based on the encapsulation of cells inside permeable, elastic, and hollow alginate microspheres (Alessandri et al 2013), we develop a new tunable 3D model incorporating ECM and/or stromal cells. We show that lymphoma B cells and stromal cells form 3D spheroids whose internal architecture is driven by self-organization, thus initiating a bidirectional crosstalk and a co-evolution of these two cell types, recapitulating the heterogeneity of B-NHL subtype. . In addition, this approach makes it possible to assess in a relevant in vitro model drug efficacy in B-NHL.

RESULTS

1) B NHL cell lines form cohesive spheroids in scaffold-free alginate capsules

To produce spheroids from lymphoma B-cell lines, we used the cellular capsule technology, initially developed to generate spheroids from solid cancer cell types (Alessandri et al 2013-2016). Three B NHL cell lines have been encapsulated: SU-DHL-4 and HLY1 are GCB-like and ABC-like DLBCL derived cell lines respectively, and DOHH2 was used as a FL model. We generated capsules of 215.9 ± 1.3 µm in diameter containing 18.2 ± 0.8 cells/ capsule (Figure S1). During the first 11 days, SU-DHL-4 and HLY1 proliferate and aggregate to form spheroids. Alike the terminology used for 2D cultures, we name '3D confluence', the stage when cells fill up the capsule and reach the internal wall of the alginate shell.. Contrastingly, DOHH2 cells were not able to grow and form spheroids even after 17 days (Figure 1A) suggesting their requirement of a supportive element. Cell survival in SU-DHL-4 and HLY1 spheroids was evaluated at various culture time points using propidium iodide labelling. Upon spheroid dissociation and flow cytometry quantification, we found that the percentage of dead cells remained as low as 20-30% during the first week in culture and then increased to about 60% after 8 to 12 days in culture (Figure 1B). As a corollary, EdU staining revealed that the early stages of growth were characterized by a high proliferation rate while post-confluent stages exhibited a significant decrease in cell proliferation concomitant with cell death increase (Figure S2). To determine whether this survival decrease is associated with the formation and growth of a dead cellular core, as observed in solid tumor spheroids (ref), we performed immunostainings for proliferation (Ki67) and cell death (cleaved caspase 3); respectively. Besides indicating an increased cell death after confluence, there was no Ki67 and active caspase-3 regionalization at both prior and after 3D confluence (Figure 1C).

To check that the capsule contents were not only a confined cell suspension but formed truly cohesive spheroids, the alginate shell was dissolved in PBS containing 1 mM EGTA. As shown in figure 2A (movie ?), the integrity of the cellular aggregates observed after confluence was maintained upon capsule dissolution, suggesting that 3D culture may induce the secretion of ECM. We thus compared the expression of laminin, fibronectin, and collagen I, which are ECM components expressed in secondary lymphoid organs (doi: 10.1155/2012/853703, 10.1186/1471-2172-11-42), between cells cultured in suspension (2D) or in capsules (3D) by immunofluorescence. We observed that collagen 1 and laminin were expressed in basal 2D cultures of SU-DHL-4 and HLY1, respectively. However, laminin and fibronectin expression was increased in 3D SU-DHL-4 spheroids, whereas fibronectin and collagen I expression was enhanced in HLY1 spheroids (Figure 2B), confirming that the 3D culture of lymphoma cells in alginate capsules promoted ECM expression.

Altogether, these data show that the cellular capsule technology is a valuable approach to produce cohesive lymphoma spheroids from DLBCL despite increased cell death rate at late culture stages.

Since DLBCL, and even more FL, are or mixed aggregates of tumor cells and lymphoma-supportive non-malignant components including stromal and immune cells (Verdière 2019), we decided to aim for a more physiopathological model by introducing lymphoid stromal cells isolated from human tonsils (Tonsil Stromal Cells, TSC) (Amé-Thomas et al 2007) and ECM components.

2) B NHL and stromal cell co-encapsulation and 3D self-organization promote spheroid growth

To determine the impact of stromal cells in spheroid growth and organization, lymphoma B cells were co-encapsulated with TSC in the presence of Matrigel. Lymphoma cell growth was monitored by B-cell counting. We observed that B-NHL cell growth was differentially regulated by the presence of ECM and stromal cells. Indeed, while the presence of stromal cells had no significant effect on HLY1 spheroid growth, they significantly increased the growth kinetic of SU-DHL-4 spheroids, and they even promoted DOHH2-derived spheroid formation and growth, which were not obtained in the absence of TSC (Figure 3A). These results suggest that our 3D model recapitulates the high TSC-dependence of FL B cells whereas DLBCL exhibit a more variable dependence (REF cf comm).

We next sought to decipher how stromal cells play a supportive role on DOHH2 spheroid formation. DOHH2 cells were co-encapsulated with TSC cells in the presence or absence of a layer of Matrigel anchored to the inner wall of the capsules (ref Alessandri Lab on Chip 2016). In the absence of Matrigel, the capsule walls remained cell-repellent and stromal cells formed clusters inside the capsules but were unable to induce DOHH2 spheroid growth (Figure 3B and C). In contrast, in the presence of Matrigel, TSC spread onto ECM, leading to the formation of a ramified 3D network of stromal cells, that subsequently support B cell proliferation (Figure 3D + movie 1) (movie 2).

We then monitored the dynamics of stromal cells network by imaging capsules after 2, 24, 48, 72, and 96h of culture using confocal microscopy (Figure 4A). By solely focusing on stromal cells, we performed 3D+time image analysis and measured sphericity and branchness that characterized the evolution of the stromal cell network complexity. High sphericity indices indicated a compact morphology of the stromal network, thus offering a limited surface of interaction with B cells. Conversely, high branchness indices were associated to a ramified network that increases the probability of B cell-stromal cell physical contacts. We observe that stromal cell morphology was significantly altered as early as 24h after encapsulation, as revealed by the opposite variations of the sphericity and branchness indices (Figure 4B and C). In addition, after a rapid initial change, both parameters underwent a slower but continuous evolution in time in the same correlated manner, indicating that the increased branching architecture of the stromal network was not a disorganized and randomly observed feature but was sustained by a self-organization process(Figure 4D).

3) Microencapsulated 3D co-cultures recapitulate phenotypic features of B lymphomas

We decided to focus on the 3D TSC-DOHH2 co-culture to investigate the stromal-B-NHL cells bidirectional crosstalk. Previously, we have demonstrated that FL B cells could contribute to the commitment of mesenchymal precursors to lymphoid-like differentiation (at least partly through the secretion of TNFα (TNF)) (Amé-Thomas, 2007 ;Guilloton 2012). Interestingly, we revealed that 3D cell co-cultures induced a stromal cell phenotype similar to that observed *in situ* in FL (Figure 5). More specifically DOHH2 induced podoplanin (PDPN) expression in stromal cells while this was not the case in 2D co-cultures in which only the treatment of TSC

cells with a combination of TNF and lymphotoxin $\alpha 1\beta 2$ (LT), the two factors involved in lymphoid stroma differentiation, was able to trigger stromal PDPN expression (Figure 5 and Figure S3). Within spheroids, stromal cells thus acquired characteristics mimicking those observed *in situ*, suggesting that 3D spatial organization is an added value to recapitulate the pathophysiology of lymphoma tissue.

We next studied by RT-qPCR the gene expression profile (GEP) of DOHH2 cells cultured for 10 days either in monoculture in 2D (noted 2D), or in coculture with TSC in 2D or 3D (respectively noted 2D + TSC and 3D + TSC). Data were then acompared with the GEP of FL B cells and normal tonsil centrocytes (CC). Expression of 40? genes, involved in several transduction pathways including NF-kB cascade, migration signaling, cell cycle/quiescence, and apoptotic pathways, was studied (Supplemental Table 1). Analyses revealed a shift in GEP of B cells cultured in 3D compared to cells cultured in 2D with or without TSC cells (Figure 6 A). In particular, we observed that the expression of *CDKN1A* and *CDKN1B,* two regulators of cell quiescence (REF), was similarly up regulated in 3D vs 2D co-cultures and in FL-B cells vs GC B-cells (Figure 6B). Similarly, *BCL2* was upregulated in DOHH2 after the 3D co-culture (Figure 6D)..

The hypoxic tumor milieu has been often reproduced in 3D tumor in vitro models (REF). We confirmed this observation in our lymphoma 3D model, since both the upstream HIF1A transduction pathway regulator (*EGLN1*) and some HIF1A target genes (*VEGF, CXCR4*) were upregulated compared with 2D co-culture condition, reflecting, at least in part, the expression pattern obtained in FL B cells compared with normal GC (Figure 6E and F).

FL is a disseminated disease and we thus sought to determine the impact of 3D architecture on the expression of genes involved in cell confinement or cell migration. Interestingly, *RGS13*, known to limit GC size and GC B-cell number by interfering with CXCL12 and CXCL13 signals (Hwang et al 2013), was specifically downregulated in 3D co-cultures and FL B cells (Figure 6F). Conversely, *CXCR4* expression was similarly upregulated in FL-spheroids and FL B cells (Figure 6F).

Activation of the NF-kB pathway has been extensively described in B NHL (Kennedy and Klein, 2018), leading us to investigate the expression of this pathway in our 3D model. Our analyses revealed an upregulation of the noncanonical (*RELB*) NF-kB pathway in spheroids compared to 2D co-cultures. Concomitantly, the expression of *TNFAIP3,* a negative regulator or the canonical NF-kB pathway, as well as that of *BCL21A* and *CFLAR*, two target genes of NF-kB, were increased in 3D compared to 2D co-cultures (Figure 6G). These results suggest that a functional non-canonical NF-kB pathway is activated in FL-spheroids.

Collectively, these results suggest that the co-culture of DOHH2 with TSC in 3D exhibits high degree of similarity with FL biopsies and partly mimics the lymphoma niche.

4) B NHL spheroid sensitivity to chemotherapy in 3D vs 2D cell culture

We wondered whether the 3D architecture could alter the response of B lymphoma cells to drugs. For that purpose, we evaluated the effect of doxorubicin, one of the components of the polychemotherapy used in B NHL (CHOP), on cell death in various cell lines cultured in 2D or 3D in the absence or presence of stromal cells. As shown in Figure 7A, we observed that the induction of apoptosis by doxorubicin tested at a concentration corresponding to its EC50 for the different cell lines (Figure S4), was abolished or significantly decreased in cells

cultured in 3D compared to 2D, regardless of the presence or not of stromal cells. On the basis of our results showing that *BCL2* expression was upregulated in FL spheroids, we then tested the effects of BCL2 inhibitors on DOHH2 cell death in 2D or 3D culture conditions. We found that ABT-199 induced massive cell death in DOHH2 co-cultured in 2D with or without stromal cells, as well as in 3D co-cultures, suggesting that malignant B cells retained their dependence on BCL2 expression for survival (Figure 7B). Altogether, these results reveal that the lymphoma models that we have developed may be useful to perform selective drug screening.

DISCUSSION

Lymphomas develop as complex cell structures including tumor cells and their microenvironment within mechanically constraint LN. Previous lymphoma spheroid models incorporating only malignant B cells (Decaup, 2013 ; Gravelle et al, 2014) have already suggested that the 3D cell architecture is a key feature for the regulation of lymphoma growth and therapeutic response. LN are highly dynamic structures expanding and becoming mechanically stiff under immune cell recruitment and proliferation, whereas immune response resolution is associated with LN contraction and return to a baseline of mechanical softness. LN mechanical properties rely on several determinants including the external constraint of the capsule and the internal tension created by the LSC network of specialized myofibroblasts able to produce and contract ECM. Moreover, mechanosensing has been recently demonstrated to control T-cell activation and metabolismtogether with mechanical forces are involved in TCR and BCR signaling . Mouse models of FL and DLBCL cannot entirely recapitulate the biology of these tumors (Ramezani-Rad and Rickert 2017) and, due to their inherent complexity and cost, they are not suitable to study specific cellular interactions contributing to the organization of lymphoma cell niche or to perform drug screening. The development of 3D lymphoma models including mechanical constraints is therefore of particular relevance to advance the understanding and treatment of these neoplasias. In the present work, we adapted a microfluidic approach to recapitulate the lymphoma microenvironment in hollow, permeable alginate shells, forming high-throughput (~5000/s), size-controlled, and easy to handle spheroids (Alessandri 2013). Such strategy is ideally suited for drug testing and the versatility of the technique allows generating 3D monocultures (i.e. from tumor B cells only), or cocultures with human stromal cells, and to evaluate the impact of ECM.

First, the proliferation of malignant B cells alone within spheroids results in cohesive multicellular aggregates promoted by the over-secretion of ECM in 3D compared to 2D cultures. Although expression and secretion of ECM have been mainly described in stromal cells, we demonstrated here that lymphoma B cells display a similar ability, as already proposed for normal plasmablats and plasma cells (Tancred et al, 2009), or leukemic B cells (Mikaelsson et al 2005). How ECM expression in these cells is regulated remains unclear. We could however hypothesize that it may originate from the activation of a mechanotransduction pathway as already described in other cell types (He Y et al, 2009; Coplen DE et al, 2003). Remarkably, alginate caspules are elastic, meaning that cell growth past confluence dilates the capsule, which conversely applies a compressive force onto the spheroid (Alessandri 2013). Although not investigated in depth, we qualitatively observed that the cohesion of

spheroids was stronger for post-confluent capsules, which would support this mechanotransduction hypothesis.

Second, as previously reported using other 3D models, some B cell lines, including DOHH2, were unable to grow and form spheroids when maintained alone in capsules, reproducing the strong dependency of FL on their niche for survival and growth. Guided by our previous studies showing that lymphoid-like stromal cells have a supportive effect on FL B cells (Amé Thomas et al, Gallouet al, Guilloton et al), we added TSC to generate hybrid stroma-tumor 3D lymphoma models. Interestingly, our 3D model reproduced the different levels of NHL microenvironment dependency, mimicking the biology of aggressive versus indolent lymphomas (Gascoyne et al, 2014). By contrast with other 3D culture approaches, that consist in embedding cells in an ECM scaffold (Sabhachandani et al, 2019 ; Purwada et al, 2015 ; Tian et al, 2015, Gravelle 2014), our alginate spheroid model allows cell motion and interactions, leading to an early self-organization of a stroma-tumor B cell network that could organize localized 3D niches promoting cell interactions within the spheroids. Besides favoring or allowing malignant B-cell growth, the 3D coculture was also associated with coevolution of stromal cells. In particular, TSC displayed increased podoplanin expression in 3D, mimicking the phenotype of FL-infiltrating stromal cells, whereas such induction was not observed in 2D coculture. Podoplanin is a transmembrane glycoprotein known to mediate the lymphoid stromal cell contractile function within LN. It is thus tempting to speculate that podoplanin upregulation could contribute to the regulation of spheroid mechanical constraints. Production of TNF by malignant B cells has been proposed as a key mechanism of their dynamic interaction with stromal cells, leading to the upregulation of podoplanin, CCL2, and IL-8 in 2D culture conditions in vitro . However, neither TNF nor LT were found upregulated in DOHH2 maintained in 3D culture (data not shown), confirming a recent work performed on composite hydrogel-based lymphoma spheroids, suggesting that other soluble factors, but also 3D architecture and spatial constraints could contribute to the reprogramming of stromal cells.

Overall, the analysis of B-cell gene expression profile within spheroids revealed a profound shift associated with the transition form a 2D to a 3D context, mimicking the phenotype of primary FL B cells. The drop of B-cell proliferation that took place when cells filled the capsule was associated with an upregulation of quiescence genes also strongly expressed by FL B cells in agreement with their indolent phenotype. Even in the absence of a necrotic core within spheroids, the increase of EGLN1 and VEGF expression could reflect a response to hypoxia, a process associated with a limitation of energy consumption through reduction of cell proliferation and DNA repair (Koshiji M EMBO J 2004 ; Goda N 2003). Such association of response to hypoxia and quiescence has been previously described in a 3D model where spheroids were generated by the hanging drop method with lymphoma B cells alone. Interestingly, BCL2 was found upregulated in 3D spheroids and has been previously shown to display anti-proliferative effects in normal and malignant B cells, suggesting that it could contribute to the decrease of cell proliferation. Even if the t(14;18) is the main driver of BCL2 deregulation in FL, BCL2 expression shows a high level of inter- and intra-tumoral heterogeneity and is correlated with IgH expression and NF-kB activation . Accordingly, we highlighted an upregulation of RELB and NF-kB target genes in 3D cocultures, indicating that the NF-kB pathway was activated in lymphoma spheroids. Of note a recent study revealed that fluid shear stress upregulates BCR expression and signaling in ABC-DLBCL, suggesting that

engagement of BCR/NF-kB/BCL2 loop by biophysical forces could be a general feature of B-cell lymphomas. Finally, we described in our 3D model an upregulation of CXCR4, previously associated with FL B-cell migration, adhesion, and survival. Together with the reduction of RGS13 involved in the organization of GC into dark and light zones and the limitation of GC size (Shi GX et al, 2002 ; Hwang et al, 2013), this could reproduce some of the factors sustaining FL dissemination and will require further investigations.

BCL2 expression is a key determinant of response to therapy in FL patients. Moreover, the 3D-induced drug resistance has been already reported in solid cancers and hematological malignancies (Gravelle, Tian, Fukino et al 2016). We confirmed here that the sensitivity to doxorubicin dramatically dropped when cells were cultured in 3D compared to 2D in all investigated B NHL cell lines. By contrast, the pro-apoptotic activity of ABT-199, mediating the dissociation of BCL2 with the proapoptotic BH3 only proteins, was maintained in 3D co-cultures despite BCL2 upregulation suggesting that ABT-199 might be considered as a good alternative for FL patient treatment. More generally, the cellular capsule technology adapted for lymphoma 3D culture seems a useful tool to screen new therapeutic approaches.

In summary, we report the development of a new lymphoma 3D model, including stromal cells and ECM, and recapitulating the dynamic crosstalk between tumor cells and their supportive microenvironment. The versatility of this high-throughput platform makes it possible to evaluate the role of various ECM components, stromal cell subtypes, and soluble factors on the spatial organization and function of the lymphoma niche. Moreover this approach is particularly suitable for the testing of new therapeutic agents in NHL.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies

Alginic acid sodium salt from brown algae, D-Sorbitol and $CaCl_2$ hexahydrate, EGTA were supplied by Merck (France). Matrigel was provided by Corning (UGAP, France). Propidium iodide and Phalloidin-Alexa 594 were from Thermo Fisher Scientific (France). Hoechst 33258 and ABT-199 were purchased from Tocris Bioscience (France). The comprehensive cancer center pharmacy department of the Institut Bergonié kindly provided doxorubicin. APC Annexin V was from BD Biosciences (France).

Rabbit polyclonal anti-laminin, rabbit polyclonal anti-fibronectin, rabbit monoclonal anti-human collagen I and chicken polyclonal anti-GFP antibodies were supplied by Abcam (Paris, France). Mouse anti-human CD20 APC-H7 and mouse anti-human CD73 PE were from e-Bioscience (Thermo Fisher Scientific). Monoclonal mouse anti-human Ki67 clone MIB-1 was from Dako Agilent Technologies (Les Ulis, France) and rabbit polyclonal anti-cleaved caspase 3 antibody was provided by Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint Cyr l'école, France. All Alexa-conjugated secondary antibodies were purchased from Thermo Fisher Scientific.

Encapsulation procedure

Cell encapsulation was performed by adapting the protocols from (Alessandri 2016), (Domejean LOC 2017) (Truschko 2020). Briefly, it includes the fabrication of the device, the preparation of the solutions and the operation itself for cellular capsules formation. First, the microfluidic device was printed with EnvisionTEC Micro Hi-Res Plus 3D printer (Arketyp3D, France) using the resin HTM140V2 (EnvisionTEC), with the following printing parameters: burn-in range thickness 400um, base plate of 300um, and exposure time 3000ms. The printed device was washed using propanol and air dried. In parallel, a glass capillary was pulled using a micropipette puller (P30, Sutter Instrument), then cut and polished with micro-abrasive films (1µm grain, 3M) to reach the desired tip diameter (typically between 130 and 180 µm). This glass tip, which serves as a nozzle for the encapsulation device, was hydrophobized (1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltrimethoxysillane, ABCR) following standard protocols (ref) and glued to the exit of the microfluidic plastic device with epoxyglue EA M-31CL (Loctite).

To run an encapsulation, the microfluidic device is connected to three syringes (10MDR-LL-GT SGE, Analytical Science) mounted on pumps (Nemesys) for flow rate control. Three different solutions are injected into the three coaxial cones of the device. The outermost cone contains the alginate solution, which isprepared by dissolving 2% wt/vol sodium alginate (Protanal LF200S; FMC) in water and by adding 0.5mM SDS surfactant (VWR International). The solution was filtered at 1µm (glass filters, Pall Life Science) and stored at 4 °C. The intermediate cone contains a 300 mM sorbitol (Merck) solution. The innermost cone contains cellssuspended in a sorbitol solution or cells/Matrigel/sorbitol solution (when ECM is needed) in a ratio of 2:1:2 (v/v). Lymphoma B cells lines were taken from cell suspension routinely cultured while adherent stromal cells were detached from the culture flask with trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific). After rinse, cells were centrifuged and counted. For encapsulation of lymphoma cells or stromal cells only (mono-culture), 2×106 cells were resuspended in culture DMEM (Thermo Fisher Scientific). When adherent and lymphoma B cells were co-

encapsulated, 2×106 cells of each cell type were used. The cell suspension is injected into a cooling part to maintain Matrigel liquid (Alessandri 2016). The flow rates are set to 45mL/h, 45mL/h and 30mL/h for the alginate, sorbitol and cell suspension respectively. The device is positioned 40-50 cm above a petri dish containing 100mM CaCl2 solution for capsule gelling and collection. To improve capsule shape and monodispersity an alginate charging part and copper ring (21mm OD, RadioSpare), both connected to a high voltage (2 kV) generator (Stanford Research PS350, Acal BFI, France) are introduced, as described in (Truschko 2020). The charged formed droplets passing through the copper ring under electrical tension get deflected as they cross the ring, creating a splay-like jet that prevents capsule coalescence. Once formed inside the calcium bath, capsules are washed with DMEM and transferred to cell culture medium.

Cell lines, suspension, monolayer and encapsulated cell culture

Stromal cells (TSC) were isolated as previously described (Ame-Thomas 2007; Guilloton 2012) from human tonsils collected from children undergoing routine tonsillectomy, considered as chirurgical wastes. TSC-expressing GFP cells were established after transduction with lentivirus carrying the pUltra (gift from Malcolm Moore (Addgene plasmid # 24129; http://n2t.net/addgene:24129; RRID: Addgene_24129), which contained the enhanced GFP gene under the control of Ubc promoter and produced as previously described (Wu C, Lu Y., Cell Mol Biol, 2007 May 15;53(4):67-74). TSC were transduced in RPMI supplemented with 2% FBS containing pUltra concentrated lentiviral supernatant with MOI of 4. On the next day, the medium was replaced with standard culture medium. After one week, TSC eGFP^{high} cells were isolated using a cell sorter (FACS Aria, Becton Dickinson). For all the experiments reported in the present work, TSC were used from P9 to P13. DLBCL SU-DHL-4 and FL DOHH2 cell lines were obtained from the DMSZ cell collection (Braunschweig, Germany). HLY-1 cell line was kindly provided by Dr F. Meggetto (CRCT, Toulouse, France). Cells were routinely cultured in RPMI medium (Thermo Fisher Scientific), supplemented with 10% FBS (Dutscher, France) under humid atmosphere containing 5% CO_2, with medium changed 3 times a week. One day prior to encapsulation, cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS. Once cellular capsules were formed following the protocol described above, they were cultured in 75 cm^2 flasks in in DMEM supplemented with 10% FBS under humid atmosphere containing 5% CO_2, with medium changed 2 times a week. Depending on the type of experiments, capsules were sampled and transferred to dedicated culture supports, e.g. for imaging, or treated in bulk conditions and subsequently analyzed, e.g. for FACS.

Spheroid growth measurement

At various post-encapsulation culture times, we selected about 200 capsules. Capsules were dissolved by incubation in PBS containing 1 mM EGTA and the spheroids were mechanically dissociated by pipetting. When spheroids were too cohesive, trypsin-EDTA was added to improve cell dissociation. The cell suspension was centrifuged and re-suspended in 200 µl of PBS and 50 µl of Precision Count Beads (BioLegend, Ozyme). The number of cells was then

determined in a given cell suspension volume of 100 µl using flow cytometry (FACS Calibur, BD biosciences) according to the manufacturer's instructions. To evaluate the cell death in spheroids, propidium iodide (PI) (10 µg/ml) was added to the cell suspension and PI fluorescence was analyzed by flow cytometry.

Immunofluorescence staining of spheroids

In capsule staining

Capsules were fixed in DMEM w/o phenol red (Pan Biotech, Dutscher), containing 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature (RT). After rinsing, capsules were incubated for 30 min in DMEM w/o phenol red/ 0.1% triton X-100. Following a step of saturation with a solution containing DMEM w/o phenol red/ BSA 1% /FBS 2% for 1h at RT, capsules were incubated with primary antibody overnight at 4°C under shaking. Primary antibody was revealed by incubation of capsules with secondary Alexa-coupled antibody for 2h at RT. Nuclei were stained by incubation of capsules with Hoechst 33258 for 30 min at RT.

FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) staining

To analyze protein expression inside spheroids, immunofluorescence on FFPE spheroids sections (3-5 µm thick) were performed. Alginate shells were dissolved and spheroids were fixed as described above. Spheroids were then pre-embedded in 2% agarose and further embedded in a paraffin block. Immunofluorescence staining was then performed as previously described (REF). Images were acquired using a Zeiss LSM 510 meta confocal microscope (Zeiss, Göttingen, Germany) with a 25x objective (N.A 0.7). Then images obtained were processed using Fiji.

Imaging 3D cellular organization of encapsulated spheroids

Capsules were fixed at various post-encapsulation culture times and each capsule was placed in an agarose well of the Universlide microscopy chamber (Alessandri 2017), which allowed immobilization of the capsules as required for stable z-stack acquisition and medium throughput 3D imaging. Cell nuclei were stained with Hoechst 33258 and stromal cells were visualized by the GFP expression. Images were acquired using a Leica SP8 confocal microsocpe with a 20X dry objective (NA 0.7). To measure the evolution of TSC cell complexity over time two parameters were measured: the sphericity and the branchness defined as $\frac{Volume\ of\ particule\ convex\ hull}{Volume\ of\ particule}$. To obtain these values, we applied a a locally adjusted threshold to the green signal, performed 3D segmentation (3D suite plugin,Fiji (doi.org/10.1093/bioinformatics/btt276)). For the two parameters, the values of all "particles" contained in one capsule were averaged. Thus, each capsule is characterized by one mean value for sphericity and branchness. 10-18 capsules were analyzed per time point. 3D rendering was obtained using UCSF Chimera software (RBVI, San Francisco, USA).

To determine the role of Matrigel in the stromal network establishment, *in capsulo* immunofluorescence staining, using a rabbit anti-human pan Laminin antibody revealed by goat anti rabbit Alexa 633 secondary antibody, was performed to visualize Matrigel, stromal cells were GFP positive and nuclei was stained with Hoechst 33258. Z-stacks were acquired using a Zeiss LSM 510 meta confocal microscope with a 25x objective (N.A 0.7).

Multiplex fluorescence microscopy

Three FFPE samples of human tonsil, DLBCL lymph node and grade 1-2 follicular lymphoma lymph node were selected according to the World Health Organization criteria. For lymph node samples, the consent of patients was obtained and tonsil samples were considered chirurgical wastes.

Four-micrometer-thick whole-slide sections, obtained with a microtome from FFPE tissue or spheroids blocks, were transferred onto plus-charged slides, followed by multiplex immunofluorescence staining with a U DISCOVERY 5 plex immunofluorescence (Roche Diagnostics, Meylan, France). Three sequential rounds of staining were performed each including heat deactivation step, followed by incubation with primary antibody and corresponding HRP secondary antibody. Hence, rat anti-podoplanin (Thermo Fisher Scientific NZ-1.3), mouse Anti-PAX5 antibody (Abcam ab224660), and sheep anti-transglutaminase (R&D AF4376) expressions were visualized on the same section. HRP enzyme mediated deposition of the tyramide fluorophore that covalently binds to the tissue at the site of the reaction. After 3 sequential reactions, sections were counterstained with DAPI and coverslipped using fluoromount (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA).

Visualization was performed with the Nanozoomer (Hamamatsu Photonics, Massy, France) equipped with the multicolor fluorescence module.

Cell co-coculture and cell sorting:

2D co-cultures were performed over 3 days. 3×10^5DOHH2 (1.5×10^5/ml) were plated on 5×10^4 TSC /cm^2 in 6 well plates. For cell sorting, cells were trypsinized for 12 min at 37 °C and washed with medium DMEM 10% FBS. 3D co-cultures were performed over 10 days. For cell sorting, after dissolution of the alginate shells, cells were rinsed with DMEM 10% FBS and centrifuged for 7 min at 1700 rpm, incubated with trypsin at 37 °C for 15 min, and rinsed with medium DMEM 10% FBS.

Cells were stained for 20 min on ice with mouse anti-human CD20 APC-H7 and mouse anti-human CD73 PE. After DAPI staining, cell sorting was processed by the FACSAria II (BD Biosciences).

RT q-PCR arrays

After cell sorting, RNA extraction from DOHH2 co-cultured in 2D or 3D with TSC cells was done using Nucleospin RNA XS Micro kit (PN 740902) from Macherey Nagel (France). cDNA was synthesized using reverse transcription master mix (Fluidigm, USA, PN 100-6297), followed by gene expression preamplification with Fluidigm Preamp Master mix (PN 100-5744) and Taq Man assays and followed by RT-QPCR. Assay-on-demand primers, probes, and TaqMan gene expression Master Mix were obtained from Thermo Fisher Scientific (France) . Gene expression was measured using 96.96 Dynamic Array™ IFCs and the BioMark™ HD System from Fluidigm, based on ΔCt calculation method. A tonsil pool was used as appropriate DOHH2 expression external control. For each sample, the Ct value for the gene of interest was determined and normalized to its respective mean value of housekeeping genes (*ABL1* and *GAPDH*).

Data gene expression in Tonsil and FL node

Patient samples for gene expression profiling

Tissues aspirates came from subjects recruited under written informed consent recovery according to the Principles of the Declaration of Helsinki and the French National Cancer Institute (INCa) ethic committee recommendations. They were collected, anonymized and cryopreserved as viable cells in the local hematology biobank (CRB-Santé CHU Rennes) before diagnosis and/or staging evaluation. LN samples were obtained from primarily diagnosed or non-treated FL patients; patients with grade 3b FL or with disease in relapse after treatment and transformed FL were excluded from this study. Normal B (CC) were obtained from non-tumor tonsils (TONS) collected from children undergoing routine tonsillectomy issued from patients undergoing cardiac surgery. Fresh tissues of lymph nodes or tonsils were mechanically dissociated and flushed with syringe and needle. Cell suspensions were filtered, washed and subsequently sorted using FACSARIA (BD Biosciences) as $CD20^{hi}CD44^{lo}CD38^{pos}IgD^{neg}CD138^{neg}$ cells for gene-expression profiling of FL LN (n=10) and $CD19^{pos}CD38^{hi}CD10^{pos}IgD^{neg}CXCR4^{neg}$ for normal CC (n=6).

Gene expression profiling

Total RNAs were extracted using Qiazol (Qiagen) reagent, including DNAse treatment, as recommended by the manufacturer. The gene expression profiles were determined on Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 microarrays by the CIT platform (www.cit.ligue-cancer.net). Raw data were first normalized by the Robust Multichip Averaging algorithm using GC content (GC-RMA) and Log2 transformation (GSE85233 for FL and GSE136249 for normal CC).

Chemotherapeutic toxicity measurement

To compare the drug toxicities between lymphoma cells cultured in suspension and in spheroids, 0.5×10^6 cells/well co-cultured or not with 5×10^4 /cm^2 TSC or 100 confluent spheroids were distributed in 6-well plates and treated or not with doxorubicin for 24h. Then, cell death was assessed by flow cytometry after Annexin V-APC labelling according to the manufacturer's instructions.

Statistical analyses

All data were expressed as means ± SEM. The significance of differences was calculated using the non-parametric U-Mann and Whitney or Wilcoxon tests, as appropriate. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8 software.

Figure 1

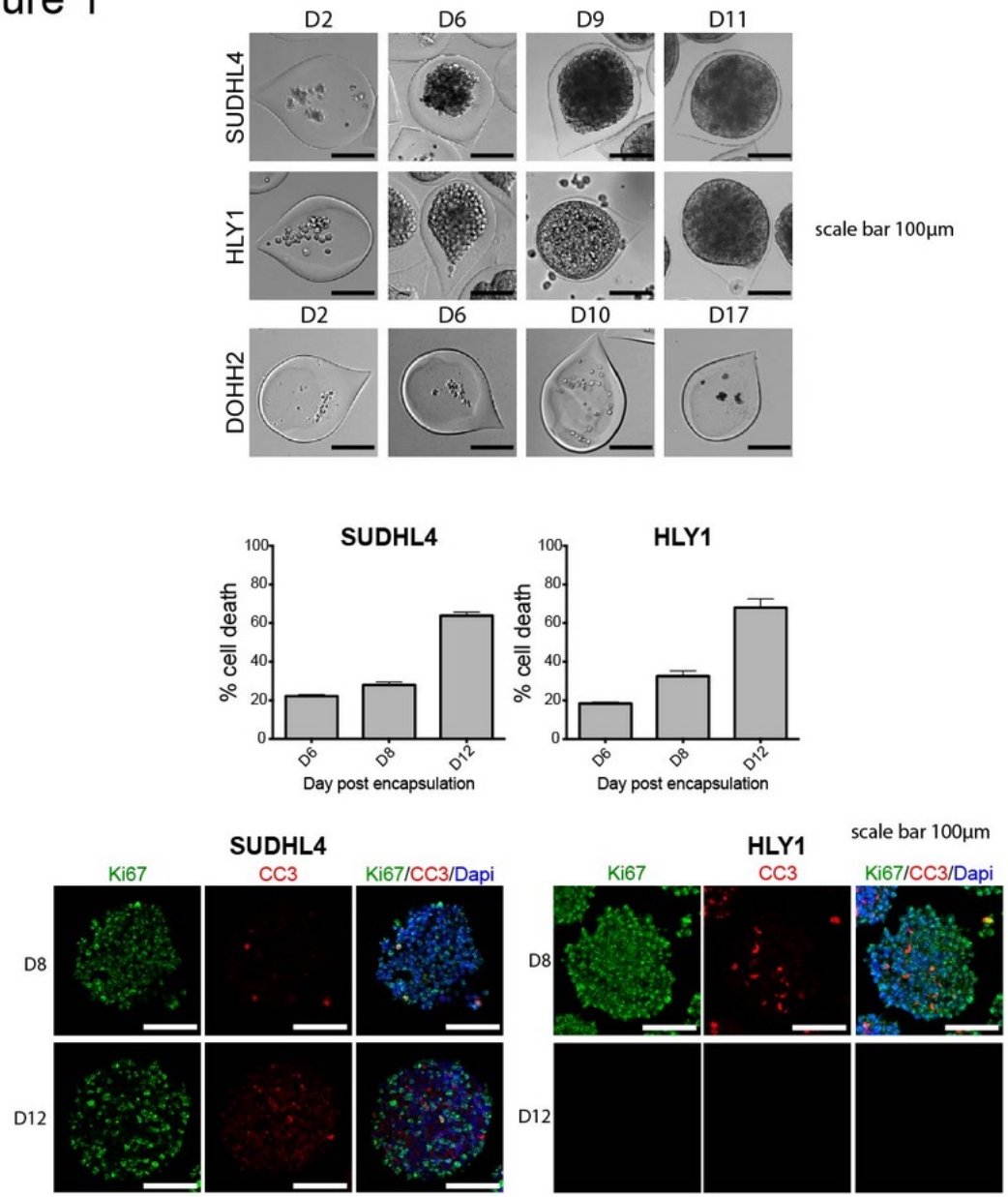

D2
D6
D9
D11
SUDHL4
HLY1
scale bar 100µm
D2
D6
D10
D17
DOHH2
SUDHL4
HLY1
% cell death
Day post encapsulation
D6
D8
D12
SUDHL4
HLY1
scale bar 100µm
Ki67
CC3
Ki67/CC3/Dapi
D8
D12

Figure 2

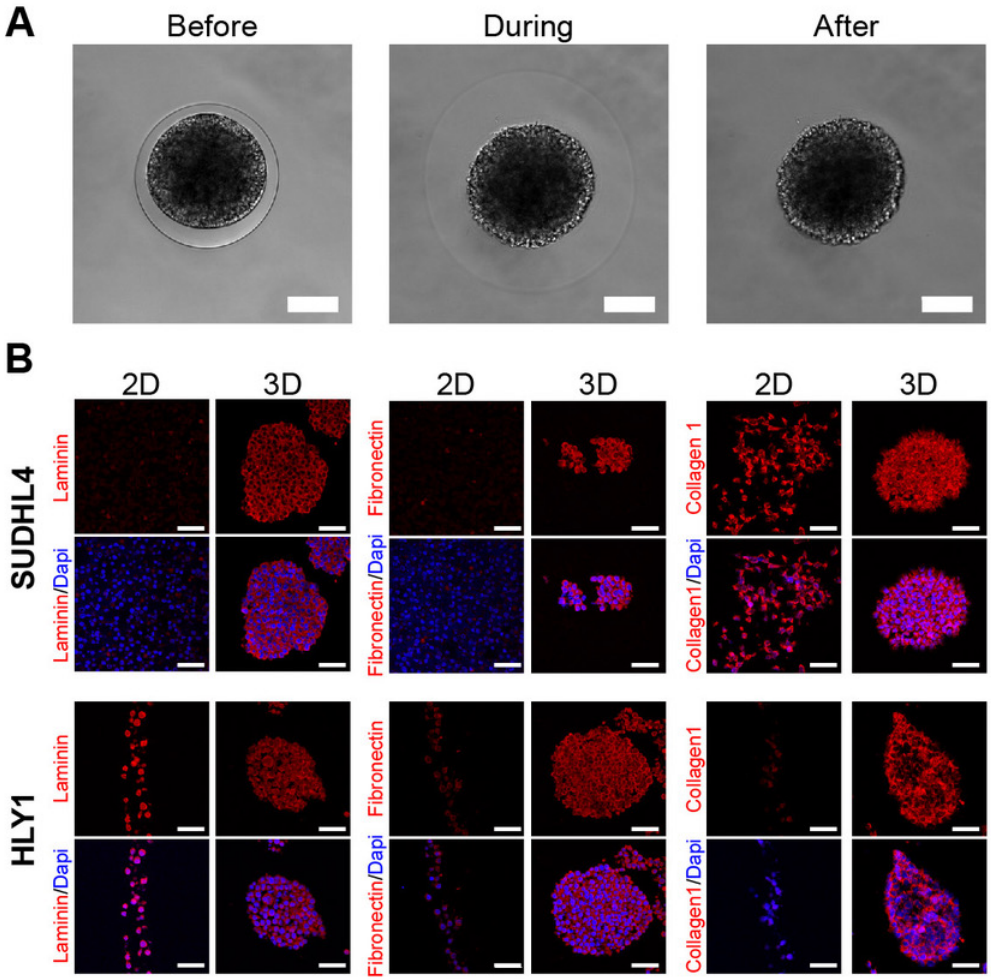

A
Before
During
After
B
2D
3D
2D
3D
2D
3D
SUDHL4
Laminin
Laminin/Dapi
Fibronectin
Fibronectin/Dapi
Collagen 1
Collagen1/Dapi
HLY1
Laminin
Laminin/Dapi
Fibronectin
Fibronectin/Dapi
Collagen1
Collagen1/Dapi

Figure 3

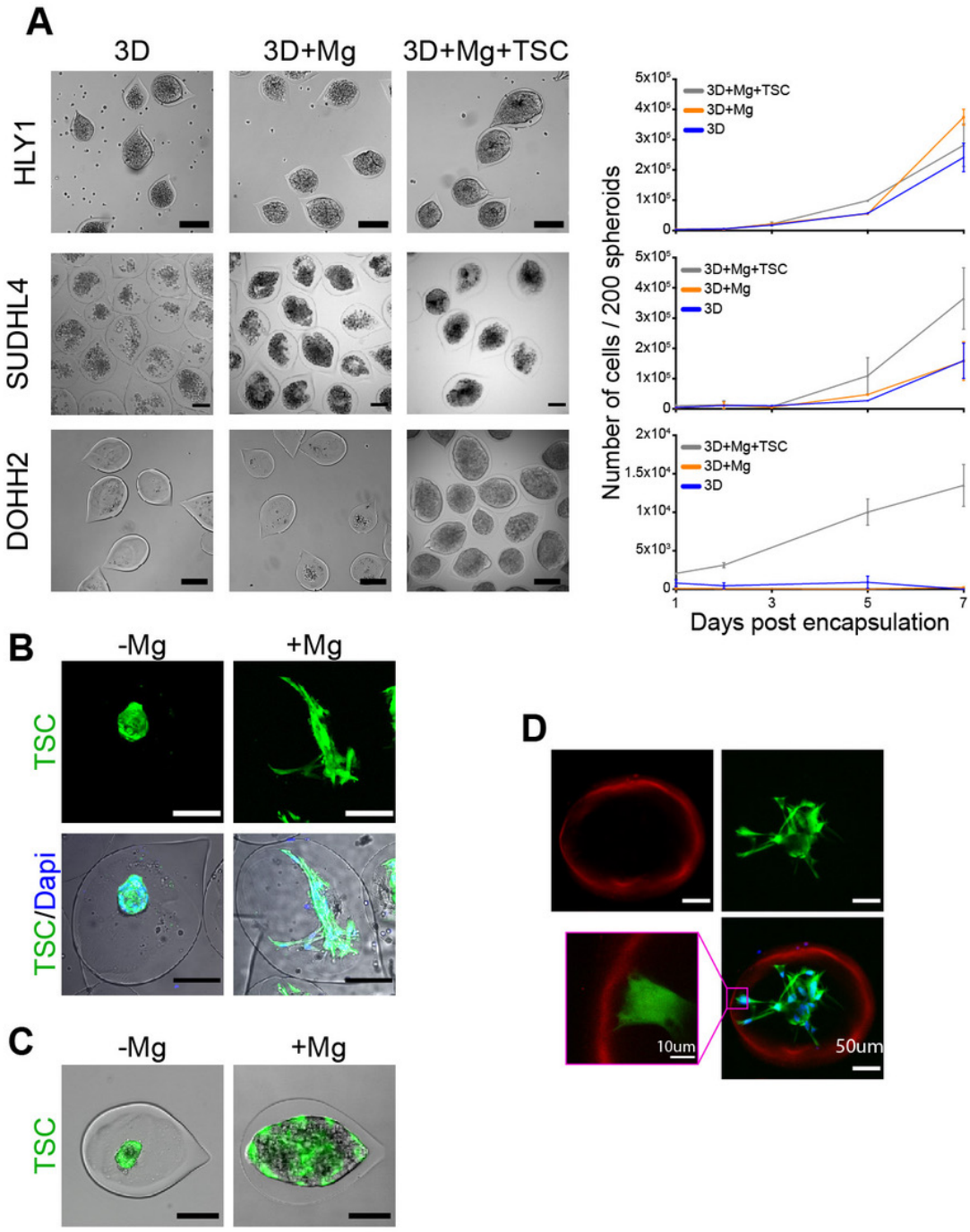

A
3D
3D+Mg
3D+Mg+TSC
HLY1
SUDHL4
DOHH2
Number of cells / 200 spheroids
3D+Mg+TSC
3D+Mg
3D
Days post encapsulation
B
-Mg
+Mg
TSC
TSC/Dapi
C
-Mg
+Mg
TSC
D
10um
50um

Figure 4

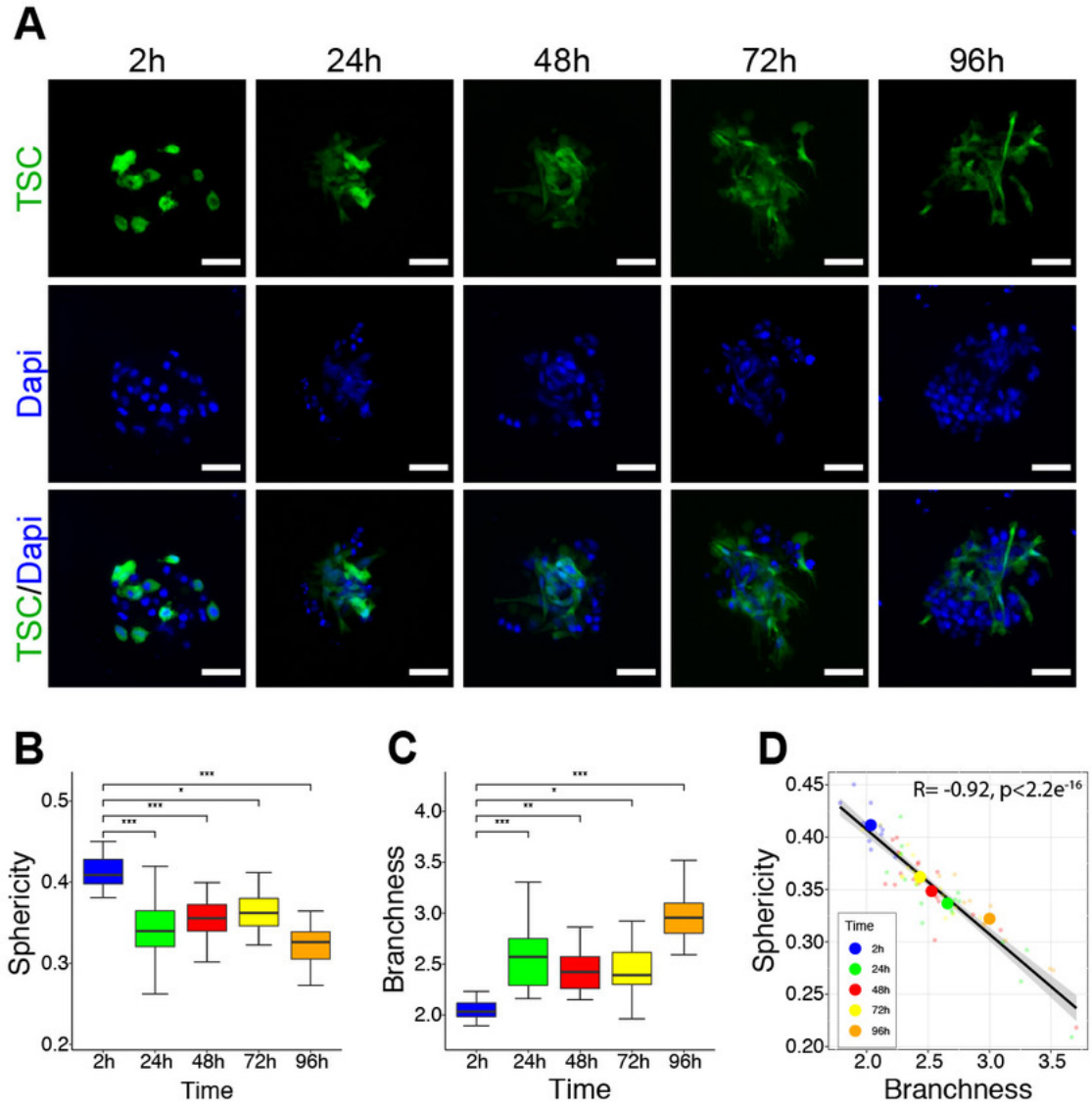
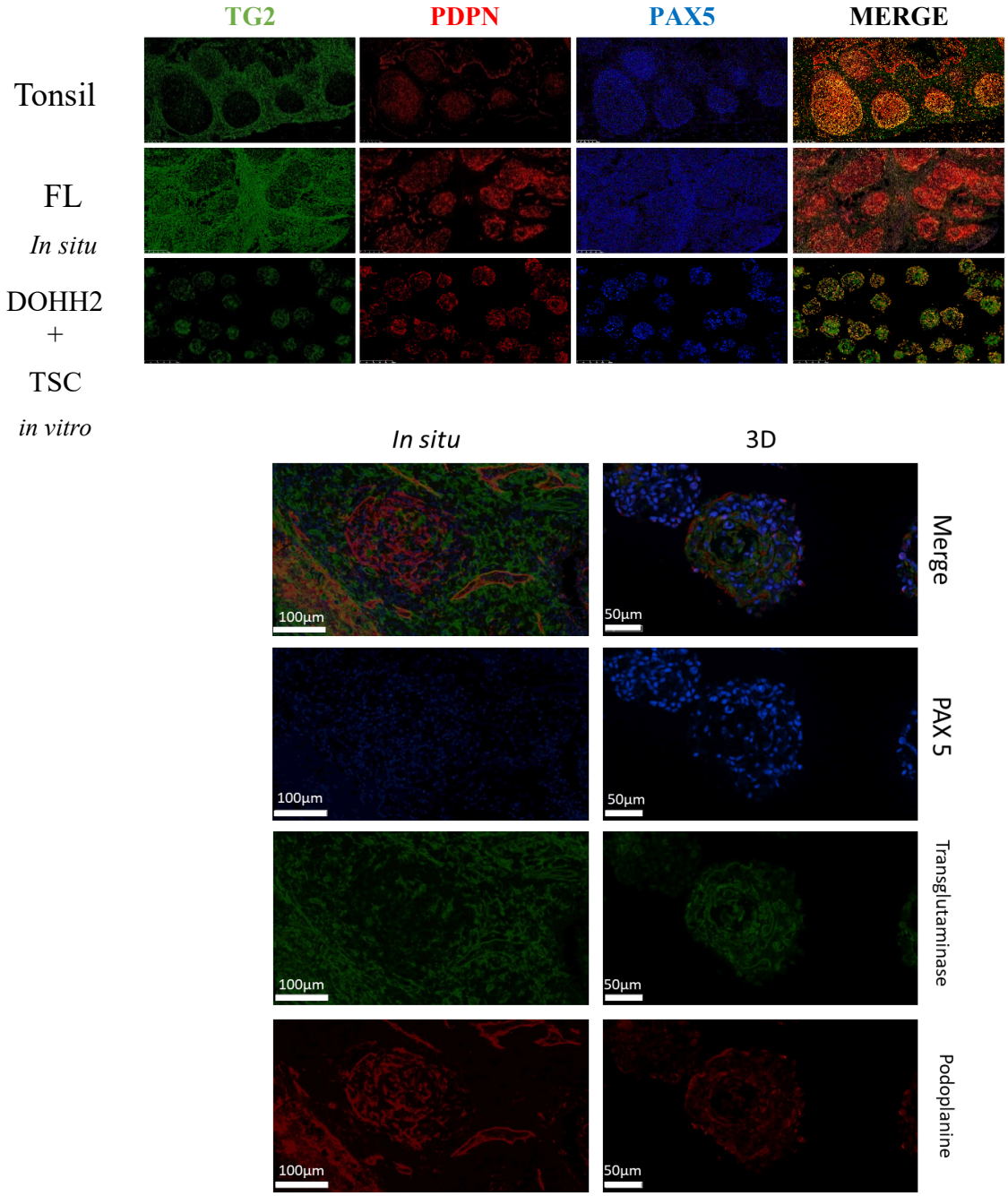

A
2h
24h
48h
72h
96h
TSC
Dapi
TSC/Dapi
B
Sphericity
Time
C
Branchness
Time
D
R= -0.92, p<2.2e-16
Sphericity
Branchness
Time
2h
24h
48h
72h
96h

FIGURE 5


TG2
PDPN
PAX5
MERGE
Tonsil
FL
In situ
DOHH2
+
TSC
in vitro
In situ
3D
Merge
PAX 5
Transglutaminase
Podoplanine
100µm
50µm

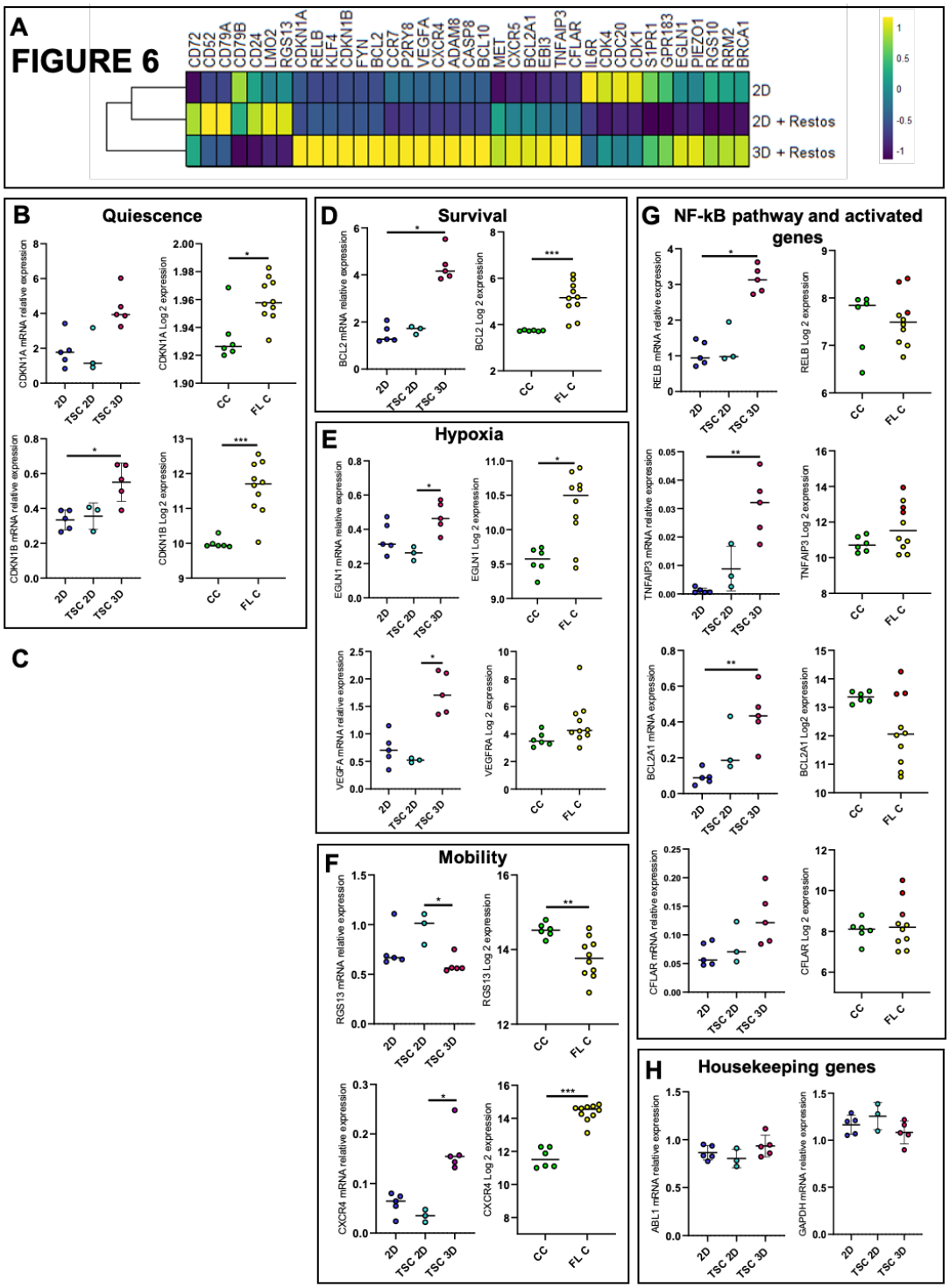

A
FIGURE 6
CD72
CD52
CD79A
CD79B
CD24
LMO2
RGS13
CDKN1A
RELB
KLF4
CDKN1B
FYN
BCL2
CCR7
P2RY8
VEGFA
CXCR4
ADAM8
CASP8
BCL10
MET
CXCR5
BCL2A1
EBI3
TNFAIP3
CFLAR
IL6R
CDK4
CDC20
CDK1
S1PR1
GPR183
EGLN1
PIEZO1
RGS10
RRM2
BRCA1
2D
2D + Restos
3D + Restos
B
Quiescence
CDKN1A mRNA relative expression
CDKN1A Log 2 expression
CDKN1B mRNA relative expression
CDKN1B Log 2 expression
2D
TSC 2D
TSC 3D
CC
FL C
C
D
Survival
BCL2 mRNA relative expression
BCL2 Log 2 expression
E
Hypoxia
EGLN1 mRNA relative expression
EGLN1 Log 2 expression
VEGFA mRNA relative expression
VEGFRA Log 2 expression
F
Mobility
RGS13 mRNA relative expression
RGS13 Log 2 expression
CXCR4 mRNA relative expression
CXCR4 Log 2 expression
G
NF-kB pathway and activated genes
RELB mRNA relative expression
RELB Log 2 expression
TNFAIP3 mRNA relative expression
TNFAIP3 Log 2 expression
BCL2A1 mRNA expression
BCL2A1 Log2 expression
CFLAR mRNA relative expression
CFLAR Log 2 expression
H
Housekeeping genes
ABL1 mRNA relative expression
GAPDH mRNA relative expression

Figure 7

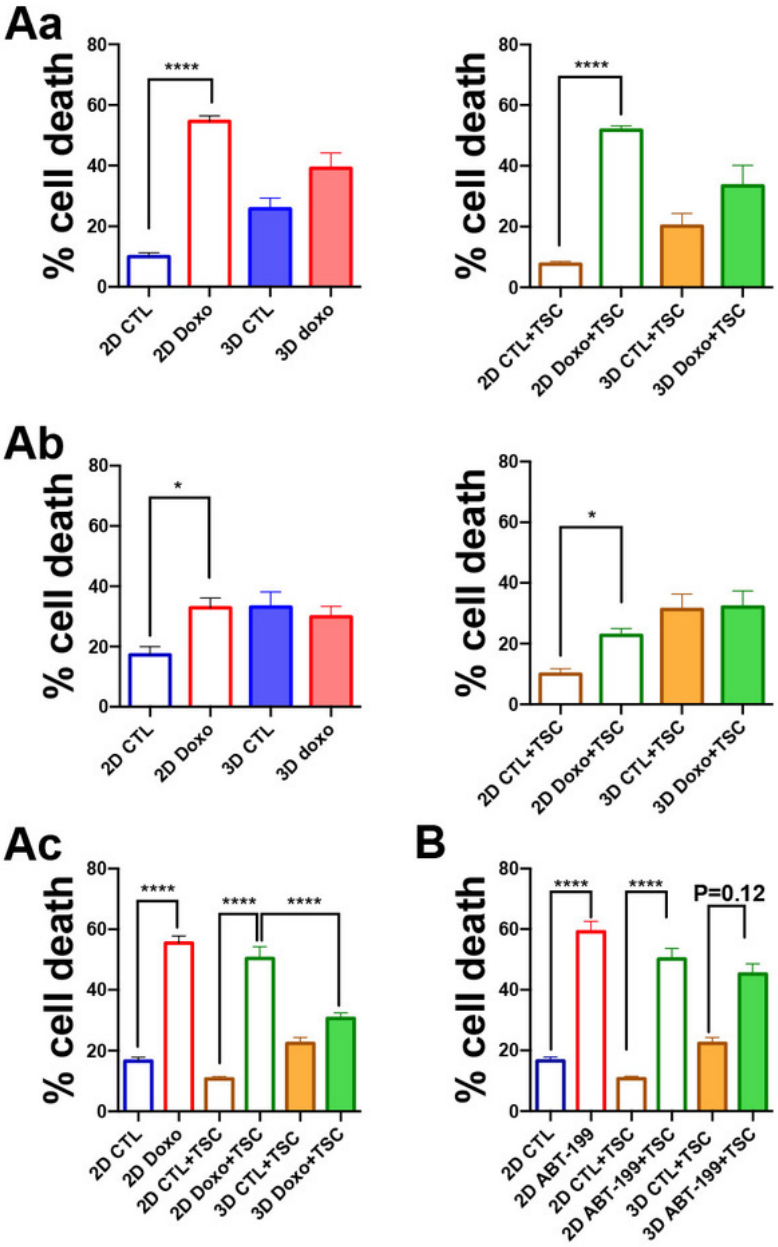

Aa
% cell death
80
60
40
20
0
****
2D CTL
2D Doxo
3D CTL
3D doxo
2D CTL+TSC
2D Doxo+TSC
3D CTL+TSC
3D Doxo+TSC
Ab
*
Ac
B
P=0.12
2D ABT-199
2D ABT-199+TSC
3D ABT-199+TSC

FIGURE LEGENDS

Figure 1: B NHL spheroids obtained by using cellular capsule technology.

A: Representative images of cell growth in alginate capsule shells over time for the various cell lines. Cells were encapsulated in hollow alginate microspheres using a coextrusion microfluidic technology. Capsules were cultured in DMEM containing 10% FBS. At various time, capsules were imaged in bright field with a Leica DMI 8 microscope using a 25X objective. Scale bar:100 µm. **B:** Percentage of SU-DHL-4 and HLY1 cell death measured in capsules at various time in culture. 200 capsules were dissolved by incubation in PBS containing 1 mM EGTA and the spheroids were mechanically dissociated. To evaluate the cell death propidium iodide (PI) (10 µg/ml) was added to the cell suspension and PI fluorescence was analyzed by flow cytometry. (n=3). **C**: Immunostaining showing the repartition of proliferating and apoptotic cells in SU-DHL-4- and HLY1-derived spheroids. Spheroids were fixed, at day 8 or 12, and embedded in 2% agarose and then in paraffin. Five micrometers thick sections were stained with anti-Ki67 (Ki67) revealed by donkey anti-mouse Ab coupled to Alexa 488, and anti-cleaved caspase 3 (CC3) revealed by donkey anti-rabbit Ab coupled to Alexa 594, to identify proliferating and dead cells, respectively. Nuclei are depicted in blue. Images were acquired with a Zeiss LSM510 confocal microscope using a 20x objective. Scale bar: 100 µm.

Figure 2: B NHL spheroids are cohesive and express extracellular matrix.

A: Pictures showing the maintenance of SU-DHL-4 spheroids after the capsule dissolution by incubation in PBS containing 1 mM EGTA. Scale bar: 100µm. **B:** Immunostaining showing the expression of extracellular matrix in cells cultured in suspension (2D) or in spheroids (3D). After fixation, cell suspension was centrifuged and pellet was embedded in 2% agarose and then in paraffin, as performed for spheroids. The expression of the various extracellular matrix were visualized by rabbit polyclonal anti- human pan laminin, rabbit polyclonal anti- human fibronectin and rabbit monoclonal anti-human collagen I staining, revealed by donkey anti-rabbit Ab coupled to Alexa 594, on 5 µm thick sections. Nuclei are depicted in blue. Images were acquired with a Zeiss LSM510 confocal microscope using a 20x objective. Scale bar: 50 µm.

Figure 3: The establishment of a stromal network is necessary to reproduce stromal-dependent B NHL cell growth.

A: Effect of Matrigel (Mg) and TSC on spheroid growth. Left panel, representative images of spheroids obtained from B cells encapsulated with or without Mg and TSC at D7 (HLY1),D6 (SU-DHL-4) or D10 (DOHH2) of culture. Images were acquired in bright field with a Leica DMI 8 microscope using a 25X objective. Scale bar: 200 µm. Right panel, the cell number was evaluated at various time in culture in the different conditions. Two hundreds capsules were collected and after dissolution of the alginate shells, the number of cells was then determined on a fix cell suspension volume of 100 µl using flow cytometry (n=3). **B**: TSC network needs Mg to be established. *Left*, example of TSC encapsulated without Mg. *Right*, example of TSC encapsulated with Mg. TSC were visualized in green by stable expression of GFP and nuclei were stained in blue with Hoechst 33252. Capsules were imaged 3 days after encapsulation with a Zeiss LSM510 confocal microscope using a 20x objective. Images were maximum intensity projection from z-stacks. Scale bar: 100 µm. **C: D**: TSC/Mg interaction. TSC were

encapsulated in presence of Mg. After 3 days in culture, capsules were fixed and immunofluorescence was performed. Mg and TSC were visualized by staining with rabbit polyclonal anti-human pan laminin revealed by donkey anti-rabbit Ab coupled to Alexa 594 (red), and chicken polyclonal anti-GFP revealed by XX anti-chicken Ab coupled to Alexa 488 (green), respectively. Nuclei were stained in blue with Hoechst 33258. Images were acquired with a Zeiss LSM510 confocal microscope using a 20x objective. Images were maximum intensity projection from z-stacks. Scale bar: 50 µm. Yellow square is a crop showing the hanging of TSC on Mg coating. Scale bar: 10 µm .

Figure 4: Self-organization of stromal network.
A: Representatives images of capsules containing DOHH2 with Mg and TSC at different time of culture. After fixation with paraformaldehyde, 10 to 18 spheroids for each time point were placed in a Universlide (Alessandri et al 2016) and imaged on a SP8 Leica confocal microscope equipped with a x20 ? objective. Z-stack were acquired for each spheroid independently. Images shown are Z-projection. TSC are shown in green and all the analyses were performed on green signal exclusively. Scale bar: 50 µm (B) and (C) Measure of sphericity and branchness index of green particles contained in spheroids at different time after encapsulation, respectively. To obtain sphericity and branchness index, image were pre-processed and particles were segmented. Sphericity values were obtained using FIJI. Branchness index was calculated as described in M&M section. To determine significant differences, Anova was performed (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001). (D) Sphericity and branchness are correlated. For each time point: small dots represent individual spheroids whereas big dots represent the average values of all spheroids. Pearson correlation coefficient (R) was calculated using R software. The black line represent the regression line and the grey area represent the 95% confidence interval of the linear regression.

Figure 5: Spheroids reproduce the stromal cell characteristics of FL and DLBCL.

Figure 6: Comparison of DOHH2 and FL B cell gene transcriptional expression profile.
A: Heatmap of DOHH2 transcriptional gene expression studied by RT-qPCR, cultured: in 2D without (n=5) or with TSC (n=3) and in 3D with TSC (n=5).
Analysis of DOHH2 transcriptional gene expression level, studied by RT-qPCR, for **B:** *CDKN1A* and *CDKN1B*, **C: D:** *BCL2*, **E:** *EGLN1* and *VEGFA*, **F:** *RGS13* and *CXCR4*, **G:** *RELB*, *TNFAIP3*, *BCL2A1* and *CFLAR*. **H:** Expression level of housekeeping genes *ABL1* and *GAPDH*. DOHH2 were cultured in 2D with (n=5) or without TSC (n=3) and in 3D with TSC (n=5) for 10 days. Variation gene expression studied between tonsil centrocytes (n=6) and LF lymph nodes tumoral B cells (n=10) using micro-array analysis (Pangault C). Results represent the median of independent experiments. *p<0.05

Figure 7: Impact of 3D culture on drug response in B NHL.
A: Comparison of cell death induced by doxorubicin in SU-DHL-4 (**a**), HLY1 (**b**) and DOHH2 (**c**) cultured in 2D or in 3D alone or with TSC cells (2D+TSC or 3D+TSC). For 2D culture, B cells were plated alone or in presence of TSC cells previously seeded. For 3D culture, 100

capsules, at day 10, containing B cells alone or B cells with TSC cells in presence of Matrigel, were seeded. 2D and 3D cultures were exposed to doxorubicin at concentration corresponding to EC50, as determined for each cell line in supplemental figure 4, for 24h. Then, the cells were stained with Annexin V-APC and the percentage of cell death was measured by flow cytometry. **B:** Comparison of cell death induced by ABT-199 (1µM) in DOHH2 cells cultured in 2D or in 3D with TSC cells and Matrigel, for 24h. Cell death was determined as described in A. The data represent mean ± SE of, at least, three independent experiments (Wilcoxon test. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001).

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1: Distribution of the size of alginate microcapsules **(A)** and the number of cells in capsules immediately after encapsulation **(B).**

Figure S2: Evaluation of cell proliferation and cell death in spheroids at various time in culture.

Figure S3: Expression of lymphoid stromal markers in TSC cells cultured in 2D.

Figure S4: Determination of the EC50 of various cell lines for doxorubicin.

FIGURE S1

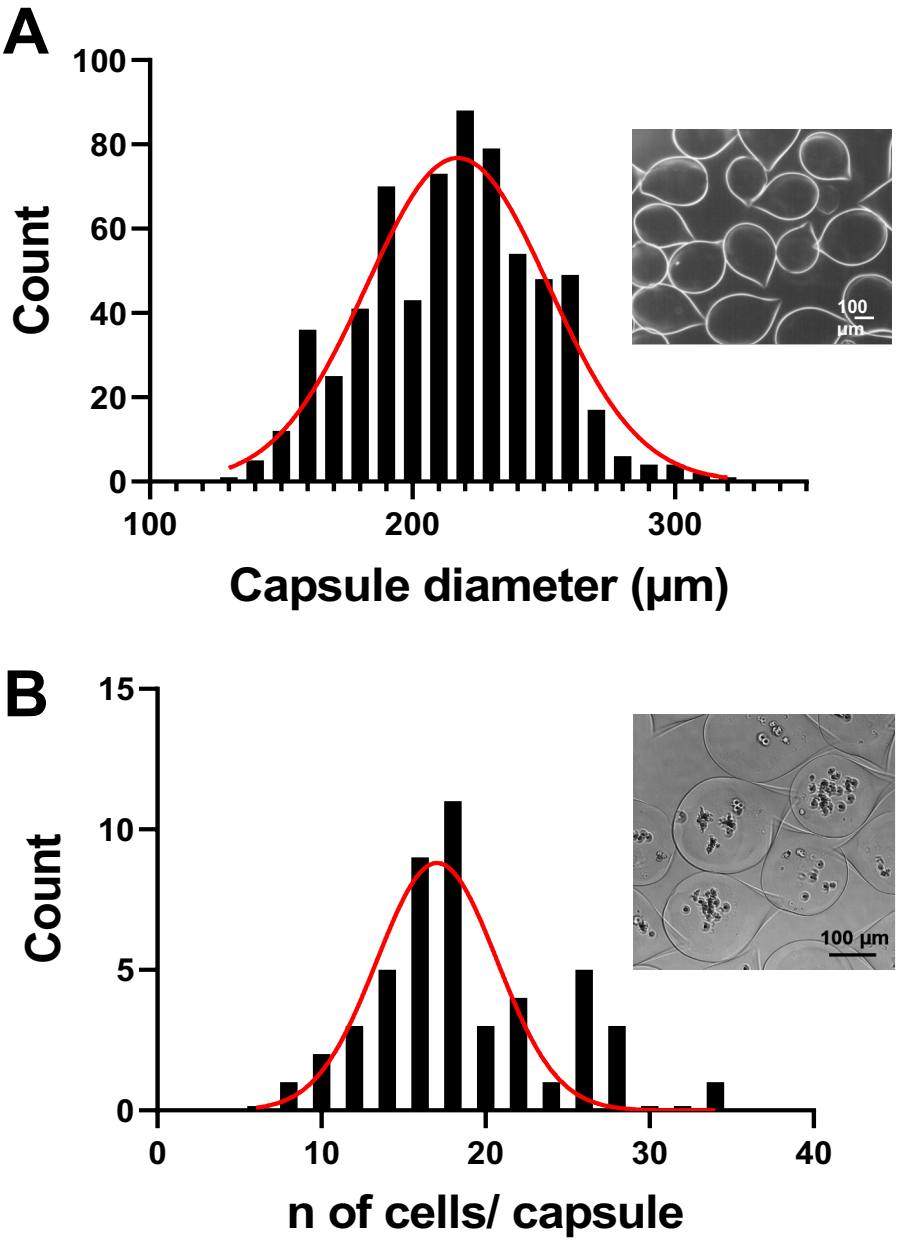
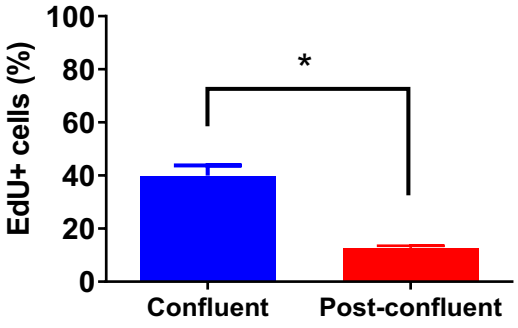

A
Count
100
80
60
40
20
0
100
200
300
Capsule diameter (µm)
100 µm
B
Count
15
10
5
0
0
10
20
30
40
n of cells/ capsule
100 µm

FIGURE S2


100
80
60
40
20
0
EdU+ cells (%)
*
Confluent
Post-confluent

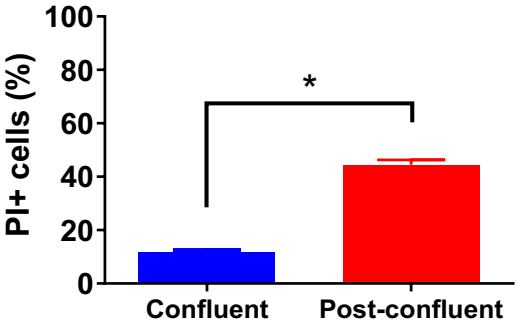

100
80
60
40
20
0
PI+ cells (%)
*
Confluent
Post-confluent

FIGURE S3

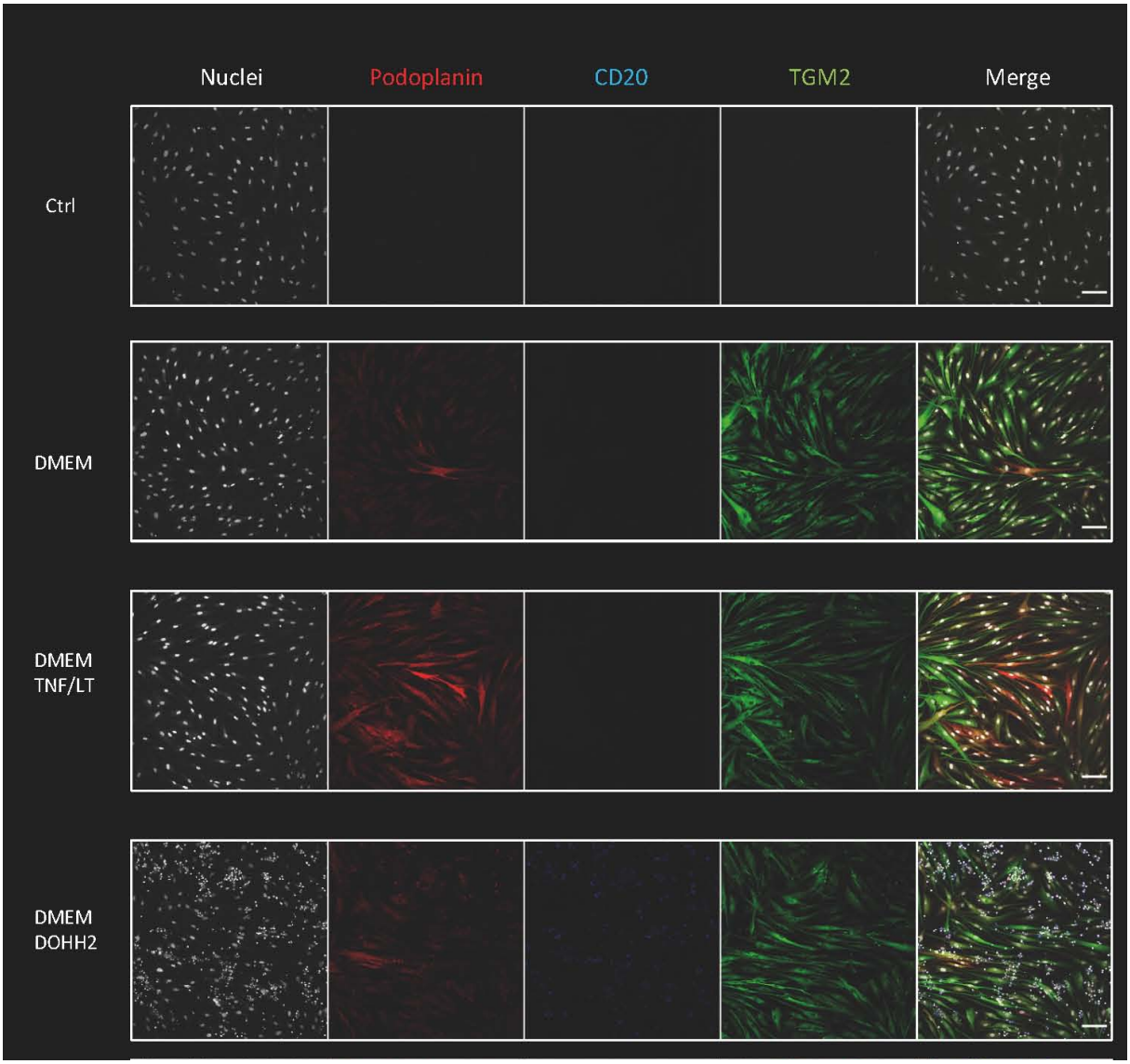
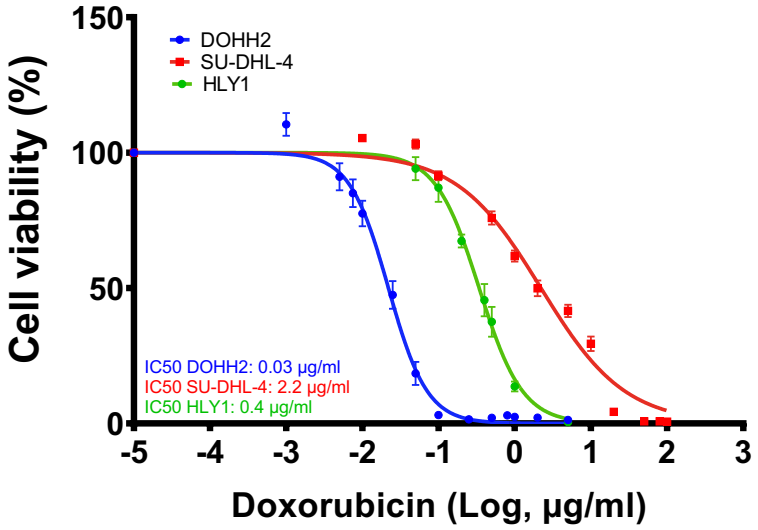

Nuclei
Podoplanin
CD20
TGM2
Merge
Ctrl
DMEM
DMEM
TNF/LT
DMEM
DOHH2

FIGURE S4


150
100
50
0
Cell viability (%)
DOHH2
SU-DHL-4
HLY1
IC50 DOHH2: 0.03 µg/ml
IC50 SU-DHL-4: 2.2 µg/ml
IC50 HLY1: 0.4 µg/ml
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
Doxorubicin (Log, µg/ml)

ACKNOWLEDGMENTS
Ligue comités de Gironde, Charentes et Landes, ARC, SIRIC BRIO.
Remerciements : Stéphanie Durand-Pantheix (production des cherry), Marine Seffals (marquages multiplex)
Emergence GSO Gaelle

8.5 Script de simulation

8.5.1 Fonction principale de déplacement de l'objet dans le faisceau

```
function
res_tot=ProfileIntensiteEllipso(omega0,R1,R2,I0,xo,yo,beta,size_x,size_y,Ns
ampling)
x=linspace(-size_x/2,size_x/2,Nsampling); %bornes d'int√©gration
y=linspace(-size_y/2,size_y/2,Nsampling);
[X,Y]=meshgrid(x,y);
cmap = jet(length(beta)); % colormap pour graphe
cmap2 = copper(length(yo));
res_mult = []; % Matrice 3D selon ((xo,Itransmis),R)
cell_res_mult = {};
cell_minAbs = {[]}; % Tableau minimums d'absorption
minAbs=[];
minMat=[];
betaTab = [];
minMatTab = [];
fwhmTab = [];

cell_HFWHM = {}; % Tableau FWHM
HFWHM=[];
figure; % on appelle la figure 1
for iiii=1:length(beta)
    disp(beta(iiii));
for iii=1:length(R1)
    disp(R1(iii));
    tic
    for tt=1:length(yo)
        for ii=1:length(xo) % d√©placement sph√©roide
            SignalIntegral(ii)                                          =
SignalAbsEllipso(omega0,R1(iii),R2(iii),I0,xo(ii),yo(tt),beta(iiii),X,Y);
        end
        plot(xo-2,SignalIntegral/max(SignalIntegral),'.-
','LineWidth',1,'Color',cmap2(tt,:)) %plot du passage du sph√©roide
        hold on % on retient les plots pour tracer √† la fin de la boucle
        res_tot =[xo; SignalIntegral]; % r√©sultat pour un sph√©roide de
rayon d√©fini

        %size(res_tot)
        res_mult = cat(3,res_mult,res_tot); % stockage pour un R dans la
matrice 3D selon R
        %size(res_mult)
    end
    toc
end
for jjj=1:size(res_mult,3) %on parcourt la matrice 3D selon R
```

```
    minAbs = [minAbs ; min(res_mult(2,:,jjj)./max(res_mult(2,:,jjj)))]; % on
cherche le minimum et on le stocke dans un tableau
    FWHMpos = 0.5*(max(res_mult(2,:,jjj))+min(res_mult(2,:,jjj))); % valeur
de I associ√©e √† la FWHM
    indexFWHM = find(res_mult(2,:,jjj)<FWHMpos); % recherche des indices
correspondants aux valeurs les plus proches
    xo
    FWHM1 = xo(indexFWHM(length(indexFWHM))+1);
    FWHM2 = xo(indexFWHM(length(indexFWHM))-1);
    HFWHM = [HFWHM ; abs(FWHM1+FWHM2)./2]; % calcul de la FWHM et stockage
dans un tableau
end
%disp(minAbs);
cell_minAbs{iiii} = minAbs; % on cherche le minimum et on le stocke dans un
tableau
%disp(cell2mat(cell_minAbs));
%disp(minAbs);
cell_HFWHM{iiii} = HFWHM; % calcul de la FWHM et stockage dans un tableau
%disp(cell2mat(cell_HFWHM));
%disp(HFWHM);
res_mult = [];
minMat(iiii) = min(minAbs(:,:));
minAbs = [];
HFWHM=[];
minAbsCell={};
end
hold off
for iiii=1:length(beta)
plot(R1, cell_minAbs{iiii}, 'o-','LineWidth',1,'Color',cmap2(iiii,:)) % on
trace la donn√©e minAbs vs R
hold on
end
grid on
xlabel('R (¬µm)')
ylabel('Transmittance (norm.)')
hold off
figure(10)
subplot(1,2,1)
yyaxis left
plot(yo,cell_minAbs{iiii}, 'o-','LineWidth',1) % on trace la donn√©e minAbs
vs R
hold on
yyaxis right
plot(yo,(cell_minAbs{iiii}-min(cell_minAbs{iiii}))/(1-
min(cell_minAbs{iiii}))*100, 'o-','LineWidth',1)
subplot(1,2,2)
yyaxis left
plot(yo,smooth(cell_HFWHM{iiii},50), 'o-','LineWidth',1) % on trace la
donn√©e minAbs vs R
hold on
```

```
yyaxis right
plot(yo,smooth((max(cell_HFWHM{iiii})-
cell_HFWHM{iiii})/(max(cell_HFWHM{iiii}))*100,50), 'o-','LineWidth',1)
figure(3);
for iiii=1:length(beta)
plot(R1, 2*cell_HFWHM{iiii}, 'o-','LineWidth',1,'Color',cmap2(iiii,:)) % on
trace la donn√©e minAbs vs R
hold on
end
grid on
xlabel('R (¬µm)')
ylabel('FWHM (¬µm)')
hold off
figure(4);
for iiii=1:length(beta)
    betaTab = [betaTab beta(iiii)];
    fwhmTab = [fwhmTab 2*cell_HFWHM{iiii}];
end
%plot(betaTab, fwhmTab, 'o-','LineWidth',1,'Color','red') % on trace la
donn√©e minAbs vs R
hold on
grid on
xlabel('\beta (cm^{-1})')
ylabel('FWHM (¬µm)')
hold off
%save('HWHMR_inf_2000/HWHM0_001.dat','HFWHM','-ascii');
%disp(minMat);
figure(5);
%miniMat=cell2mat(cell_minAbs{1});
%disp(miniMat);
for iiii=1:length(R1)
%assignin('base',minAbsCell,cell_minAbs);

%if mod(iiii,2)==0
    %betaTab = [betaTab beta(iiii)];
%minMatTab = [minMatTab minMat(iiii)];
%end

end
%disp(size(minMatTab));
%disp(size(betaTab));
%plot(R1, minMatTab, 'o-','LineWidth',1,'Color','red') % on trace la donn√©e
minAbs vs R
hold on
grid on
xlabel('\beta (cm^{-1})')
ylabel('Transmittance (norm.)')
hold off
abacusMin = [];
abacusMin = cell2mat(cell_minAbs);
```

```
abacusHFWHM = cell2mat(cell_HFWHM);
abacusMin = abacusMin';
abacusHFWHM = abacusHFWHM';

disp(abacusMin);
disp(abacusHFWHM);
%disp(cell_minAbs);
%disp(cell_HFWHM);
save('abacusMinR25_5_150_beta_20_10_40fev20.dat','abacusMin','-ascii');
save('abacusHFWHMR25_5_150_beta_20_10_40fevv20.dat','abacusHFWHM','-
ascii');
```

8.5.2 Modulation de l'intensité du faisceau par une particule

```
function SignalIntegral = SignalAbsEllipso(omega0,R1,R2,Io,xo,yo,beta,X,Y)
Faisceau = Io*exp(-2*(X.^2+Y.^2)/(omega0.^2));
bille = ParticuleAbsEllipso(xo,yo,beta,R1,R2,X,Y);
BilleFaisceau =Faisceau.*bille;
dx=X(1,2)-X(1,1);
dy=Y(2,1)-Y(1,1);
%imagesc(BilleFaisceau);
SignalIntegral = sum(sum(BilleFaisceau*dx*dy));
```

8.5.3 Calcul de l'absorption d'une particule sphérique ou elliptique

```
function res=ParticuleAbsEllipso(xo,yo,beta,R1,R2,X,Y)
masque_particule = R2.^2*(1-(X-xo).^2./R1.^2-(Y-yo).^2./R2.^2)>0;
res            =            exp(-2*beta.*sqrt(R2.^2*(1-(X-xo).^2./R1.^2-(Y-
yo).^2./R2.^2)).*masque_particule);
%imagesc(res)
```

8.6 Script de reconnaissance de pics et comparaison aux abaques

```
%-----------------------------------------------------------------------
% C A P S U L A    A N A L Y S I S    S C R I P T
%Coded by Nelson H√©laine in 2019 - Laboratory of Physics, Numerics and
%Nanoscience, University of Bordeaux - nelsonhelaine@protonmail.com
%-----------------------------------------------------------------------
clear all
close all


%VARIABLE DECLARATION SECTION
```

```
filesDetect = dir('*.txt'); %list of the data files in parent directory
dataDetect = []; %main data matrix declaration
beamsSpacing = 706.26;%beams spacing in ¬µm declaration
minTimeBetwPeaks = 0.001;%minimum time between two peaks in seconds
declaration
minPeakDepth = 0.1;
zeroPeak2 = 0.321; %peak 2 zero value measured previously to data processing
declaration
zeroTrigger = 0.602;%trigger peak value measured previously to data
processing declaration
totalIntensity = zeroPeak2+zeroTrigger;%total signal level calculation (2
beams summed)
zeroPeak2Norm = zeroPeak2/totalIntensity;
smoothparam = 20;%parametre de smoothing
zeroTriggerNorm = zeroTrigger/totalIntensity;
Nsampling = 1000;%multiplicative coefficient for getting index from time
values
spheroVelo = []; %spheroid velocity array declaration
finalFile = []; %final measurement array declaration
caps = 0; %peak counter declaration
realCaps = 0;
deltaTime=[];
j=0;

%DATA IMPORT SECTION

%%Abacus import :
abacusFWHM                                                                =
importdata('abacus/abacusHFWHMR25_5_150_beta_50_10_250janv20.dat'); %import
of FWHM abacus
abacusMin                                                                 =
importdata('abacus/abacusMinR25_5_150_beta_50_10_250janv20.dat'); %import of
Minimum abacus

%%Experimental data import :
for i=1:length(filesDetect)
    tic
    eval(['load ' filesDetect(i).name ' -ascii']);
    toc
    dataLoading = toc;
    totalTimeLoading = dataLoading*length(filesDetect);
    waitingTime1 = totalTimeLoading-i*dataLoading;
    disp('Waiting Time 1');
    disp(waitingTime1);
end
for i=1:length(filesDetect)
    tic
    dataDetect(:,:,i) = importdata(filesDetect(i).name);
    toc
```

```
    dataStorage = toc;
    totalTimeStorage = dataStorage*length(filesDetect);
    waitingTime2 = totalTimeStorage-i*dataStorage;
    disp('Waiting Time 2');
    disp(waitingTime2);
end

%PRINCIPAL LOOP ON THE DATA ARRAY (3D ARRAY)

for i=1:size(dataDetect,3) %loop on  each data files
    tic %duration calculation
    ii=0;%looping variable declaration
    %disp('File #')%ID file prompting
    %disp(filesDetect(i).name)% name prompting
    sizeFile=size(dataDetect(: ,:,i)); %facultatif
    subDataDetect=dataDetect(:,:,i); %extraction of the data of a unique file
    subDataDetect(:,2)=subDataDetect(:,2)./max(subDataDetect(:,2));
%normalization of the data

YsubDataDetect=smooth(subDataDetect(:,1),subDataDetect(:,2),smoothparam);
%smoothing
    %YsubDataDetect=subDataDetect(:,2);%uncomment to process without
    %smoothing
    y = YsubDataDetect(:,1);%storage in a vector y of signal values
    t = subDataDetect(:,1);%storage in a vector t of temporal values
    %figure(i+10000)
    %findpeaks(-
y,t,'MinPeakDistance',minTimeBetwPeaks,'MinPeakProminence',0.05,'Annotate',
'extents')
    %pn : depth of the peaks ln : temporal location width : half width
    [pn            ln            width]            =            findpeaks(-
y,t,'MinPeakDistance',minTimeBetwPeaks,'MinPeakProminence',minPeakDepth);  %
recherche des pics et leur loca avec une distance minimale de 300 ms entre
chaque
    %pn(pn<-0.8)=NaN;  %manipulation  matrice  pour  ne  garder  que  les  pics
rentrant dans les crit√®res de seuil
    peakData = [-pn ln width]; %storage of peaks properties
    peakData(any(isnan(peakData), 2), :) = []; %manip matrice pour remplacer
les valeurs NaN par des cases vides
    k=2;
    while k<=size(peakData,1)%loop on each peak of the file
        %findpeaks(-
y,t,'MinPeakDistance',minTimeBetwPeaks,'MinPeakProminence',0.3,'Annotate','
extents')

            if       (1==1)%peakData(k-1,1)>zeroTriggerNorm)              &&
(peakData(k,1)>zeroPeak2Norm)    &&    (peakData(k-1,1)>peakData(k,1))    &&
(peakData(k,1)<0.85)%si le pic est inf√©rieur au z√©ro du trigger, c'est un
pic √† analyser et non pas un trigger
```

```
                %disp(peakData(:,2))

                caps = caps+1;%on augmente le compteur de capsule
                idxMinPeak2  =  find(subDataDetect(:,1)==peakData(k,2));  %on
trouve l'indice correspondant au minimum du pic √† analyser
                %disp(idxMinPeak2)
                windowDetect      =      10e3*[peakData(k,2)-4*peakData(k,3)
peakData(k,2)+4*peakData(k,3)];
                if (windowDetect(1)<0)
                    windowDetect(1) = 1;
                end
                if (1==1) % condition sur la fen√™tre de d√©tection pour
√©viter les effets de bord et m√™mes condition que pour le min
                    ii = ii +1;

                    %disp('perfect case');
                    deltaMin = peakData(k,2)-peakData(k-1,2);%on calcule le
delta t entre le pic trigger et le pic qu'on analyse
                    peak2                                                   =
subDataDetect(round(windowDetect(1)):round(windowDetect(2)),1:2);        %on
d√©finit une fen√™tre de donn√©es autour du minimum pour retrouver la HWHM
                    peak2(:,2)                                              =
YsubDataDetect(round(windowDetect(1)):round(windowDetect(2)));
                    %disp(peak2);
                    [minMaxPeak2(:,caps)]                                   =
statelevels(peak2(:,2),1000,'mode');
                    sizePeak2A                                              =
size(pulsewidth(peak2(:,2),peak2(:,1),'Polarity','Negative','Tolerance',2,'
StateLevels',(minMaxPeak2(:,caps)).'),1);
                    sizePeak2B                                              =
size(pulsewidth(peak2(:,2),peak2(:,1),'Polarity','Negative','Tolerance',2,'
StateLevels',(minMaxPeak2(:,caps)).'),2);
                    if (sizePeak2A~=0) && (sizePeak2A<2) && (sizePeak2B~=0)
&& (sizePeak2B<2)

                        j=j+1;

[W(ii,i),InitCross(ii,i),FinalCross(ii,i),MeadVal(ii,i)]=pulsewidth(peak2(:
,2),peak2(:,1),'Polarity','Negative','Tolerance',2,'StateLevels',(minMaxPea
k2(:,caps)).');
                        %figure((i*100)+k)

%pulsewidth(peak2(:,2),peak2(:,1),'Polarity','Negative','Tolerance',2,'Stat
eLevels',(minMaxPeak2(:,caps)).');
                        timePeak2    =    InitCross(ii,i)+((FinalCross(ii,i)-
InitCross(ii,i))/2);
                        timePeakTrigger = peakData(k-1,2);
                        deltaTime(j) = timePeak2-timePeakTrigger;
```

```
                        spheroVelo(caps,i) = beamsSpacing/deltaTime(j); %on
calcule la vitesse de la capsule analys√©e
                        if          (1==1)%spheroVelo(caps,i)>0          &&
((spheroVelo(caps,i))<40000)    &&    (W(ii,i)*spheroVelo(caps,i)<600)    &&
(W(ii,i)*spheroVelo(caps,i)>50)
                            disp(i);
                            minPeak2(caps,i)=(minMaxPeak2(1,caps)-
zeroPeak2Norm)/(1-zeroPeak2Norm); % on le stocke
                            HWHM(caps,i)=W(ii,i)*spheroVelo(caps,i);
                            %figure((i*100)+k)
                            %findpeaks(-
y,t,'MinPeakDistance',minTimeBetwPeaks,'MinPeakProminence',0.02
,'Annotate','extents')
                            figure(111111111)
                            if (min(peak2(:,2))>0.7)
                                idxMin=find(peak2(:,2)==min(peak2(:,2)));
                                plot((peak2(:,1)-
peak2(idxMin(1),1))*spheroVelo(caps,i),smooth(peak2(:,2)),'-
','Color','red','Marker','.')
                                hold on
                            elseif (min(peak2(:,2))<0.6)
                                idxMin=find(peak2(:,2)==min(peak2(:,2)));
                                plot((peak2(:,1)-
peak2(idxMin(1),1))*spheroVelo(caps,i),peak2(:,2),'-
','Color','blue','Marker','.')
                                xlim([-300 300])

                                hold on
                            else
                            end
                            realCaps =  realCaps+1;
                        else
                            minPeak2(caps,i)=NaN; % on le stocke
                            HWHM(caps,i)=NaN;
                            spheroVelo(caps,i)=NaN;
                        end
                    else
                        HWHM(caps,i)=NaN;
                        minPeak2(caps,i)=NaN;
                        spheroVelo(caps,i) = NaN; %on calcule la vitesse de
la capsule analys√©e
                    end
                    windowDetect = [];
                else
                    HWHM(caps,i)=NaN;
                    minPeak2(caps,i) = NaN; %sinon on ne stocke que du vide
                    spheroVelo(caps,i) = NaN;
                end
                minPeak2(minPeak2==0)=NaN;
                HWHM(HWHM==0)=NaN;
```

```
                spheroVelo(spheroVelo==0)=NaN;
                %finalFile                                                  =
[finalFile;spheroVelo(caps,i),minPeak2(caps,i),HWHM(caps,i)];   %on   stocke
tout dans un fichier de donn√©es final

        end
        k = k+2;
    end
    peakData = [];
    filename = ['datatest', num2str(i)];
    savefig(filename);
    toc

end
%disp(finalFile);

%RAW DATA PLOTTING SECTION

binCount = round(1+3.22*log(realCaps));%Sturge's rule for bin count
%binCount = 50;
histoFilesName = ['Chip T ,150/450 ¬µl/mn, 2 identical beams - 874 ¬µm
separation - N = ',num2str(realCaps)];
%on trace les distributions
figure()
m=spheroVelo;
m = (m(~isnan(m)));
histogram(m,binCount);
grid on
ax = gca;
ax.FontSize = 14;
title(histoFilesName,'FontSize',14)
xlabel('Spheroids velocity (¬µm/s)','FontSize',14)
ylabel('Counts','FontSize',14);
figure()
m=minPeak2;
m = (m(~isnan(m)));
%disp('Moyenne Minimum : ')
%disp(mean(m))
%disp('Variance Minimum')
%disp(std(m)/sqrt(realCaps))
histogram(m,binCount);
grid on
ax = gca;
ax.FontSize = 14;
title(histoFilesName,'FontSize',14)
xlabel('Minimum voltage detected (V)','FontSize',14);
ylabel('Counts','FontSize',14);
figure()
m=HWHM;
```

```
m = (m(~isnan(m)));
%disp('Moyenne HWHM : ')
%disp(mean(m))
%disp('Variance HWHM')
%disp(std(m)/sqrt(realCaps))
histogram(m,binCount);
grid on
ax = gca;
ax.FontSize = 14;
title(histoFilesName,'FontSize',14)
xlabel('HWHM (¬µm)','FontSize',14)
ylabel('Counts','FontSize',14);



% ABACUS ANALYSIS SECTION
%import
abacusFWHM1 = ...
    importdata('abacus/abacusHFWHMR25_5_150_beta_20_10_40fev20.dat');
abacusMin1 = ...
    importdata('abacus/abacusMinR25_5_150_beta_20_10_40fev20.dat');
abacusFWHM2 = ...
    importdata('abacus/abacusHFWHMR25_5_150_beta_50_10_250janv20.dat');
abacusMin2 = ...
    importdata('abacus/abacusMinR25_5_150_beta_50_10_250janv20.dat');
%concatenation
abacusFWHM = vertcat(abacusFWHM1,abacusFWHM2);
abacusMin = vertcat(abacusMin1,abacusMin2);





%measurements import

HWHM = (HWHM(~isnan(HWHM)));
mini = minPeak2;
mini = (mini(~isnan(mini)));
%matrix declaration
idx_fwhm = [];%tableau indices fwhm
idx_min = [];%tableau indices min
couplesHWHMmin=horzcat(HWHM,mini);
finalCoupleArray = [];
finalCoupleArray2 = [];
% research in abacus
for i=1:length(couplesHWHMmin)
    [row1,col1]=...
```

```
        find((abs(abacusFWHM-
couplesHWHMmin(i,1)))<(couplesHWHMmin(i,1)*10/100));
    idx_fwhm = horzcat(row1,col1);
    %research in Minimum abacus

    [row2,col2]=...
        find((abs(abacusMin-
couplesHWHMmin(i,2)))<(couplesHWHMmin(i,2)*10/100));
    %[row2,col2]=find(abacusFWHM==couplesHWHMmin(i,2));
    idx_min = horzcat(row2,col2);
    %data treatment idx->realvalues
    R_fwhm = (idx_fwhm(:,2)*5)+20;
    beta_fwhm = ((idx_fwhm(:,1)*10)+10);

    R_min = (idx_min(:,2)*5)+20;
    beta_min = ((idx_min(:,1)*10)+10);
    %concatenation
    couples_from_fwhm_abacus = horzcat(R_fwhm,beta_fwhm);
    couples_from_min_abacus = horzcat(R_min,beta_min);

    %comparison
    finalCouple = [];

    distances        =        pdist2(couples_from_fwhm_abacus(:,        1:2),
couples_from_min_abacus(:, 1:2));%calculate the distance between 2 datasets
    minDistance = min(distances(:));%find the minimum value of distance
    [rowOfHWHM, rowOfMin] = find(distances == minDistance);
    Min_coord_closest=couples_from_min_abacus(rowOfMin,:);
    HWHM_coord_closest=couples_from_fwhm_abacus(rowOfHWHM,:);

    %reconnaissance par rapport au couple fwhm
    finalCouple(:,1) = mean(Min_coord_closest(:,1));
    finalCouple(:,2) = mean(HWHM_coord_closest(:,2));
    finalCoupleArray = vertcat(finalCoupleArray,finalCouple);



%meanRint=(couples_from_fwhm_abacus(BestIndexinFWHM,1)+couples_from_min_aba
cus(BestIndexinMin,1))/2;

%meanMinInt=(couples_from_fwhm_abacus(BestIndexinFWHM,2)+couples_from_min_a
bacus(BestIndexinMin,2))/2;
%     coupleFinal(i,1)= meanRint;
%     coupleFinal(i,2)= meanMinInt;
%     BestIndexinMin=[];
%     BestIndexinFWHM=[];
%     couples_from_fwhm_abacus = [];
%     couples_from_min_abacus = [];
end
```

```
figure(12000)
subplot(1,2,1)
histogram(finalCoupleArray(:,1))
fitdist(finalCoupleArray(:,1),'Normal')
subplot(1,2,2)
fitdist(finalCoupleArray(:,2),'Normal')
histogram(finalCoupleArray(:,2))
```