



**HAL**  
open science

# Différenciation induite mécaniquement de cellules souches à trois dimensions : étude par imagerie optique quantitative.

Amaël Mombereau

## ► To cite this version:

Amaël Mombereau. Différenciation induite mécaniquement de cellules souches à trois dimensions : étude par imagerie optique quantitative.. Physique [physics]. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0064 . tel-04061942

**HAL Id: tel-04061942**

**<https://theses.hal.science/tel-04061942v1>**

Submitted on 7 Apr 2023

**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.

# Différenciation induite mécaniquement de cellules souches à trois dimensions: étude par imagerie optique quantitative

**Thèse de doctorat en Sciences Physiques et de l'Ingénieur**  
pour obtenir le grade de docteur délivré par

**l'Université de Bordeaux**

École doctorale: 209

AMAËL MOMBÉREAU

15 Mars 2022

Devant le jury composé de :

CUVELIER Damien	Maître de conférences, <i>Sorbonne Université</i>	Rapporteur
FURLAN Alessandro	Maître de conférences, <i>Université de Lille</i>	Rapporteur
FERRAND Audrey	Chargée de recherche Inserm, <i>Université de Toulouse III</i>	Examinatrice
LOUNIS Brahim	Professeur des Universités, <i>Université de Bordeaux</i>	Président du jury
NICOLAS Alice	Directrice de recherche CNRS, <i>Université de Grenoble</i>	Examinatrice
STUDER Vincent	Directeur de recherche CNRS, <i>Université de Bordeaux</i>	Examineur
NASSOY Pierre	Directeur de recherche CNRS, <i>Université de Bordeaux</i>	Directeur de thèse
RECHER Gaëlle	Chargée de recherche CNRS, <i>Université de Bordeaux</i>	Co-Directrice de thèse

# Remerciements

---

Je remercie tout d'abord Mesdames et Messieurs Cuvelier, Furlan, Ferrand, Lounis, Nicolas, et Studer, les rapporteurs et examinateurs qui composent le jury, pour avoir bien voulu lire et évaluer mon travail.

Un grand merci à mes directeurs de thèse Pierre Nassoy et Gaëlle Recher, pour m'avoir permis de vivre cette aventure au sein de leur équipe et de m'avoir partagé cet amour inconditionnel pour la biophysique. Merci, pour tout le temps que vous avez su m'accorder, et ce, quelles que soient les circonstances.

Un grand merci également à toute l'équipe BiOf et les autres personnels du LP2N.

Merci à Kevin Alessandri et Maxime Feyeux pour m'avoir épaulé sur cette première année de thèse. Ce fût un véritable plaisir de travailler en votre compagnie. A Nelson Hélaine pour ces fous rires et tes bons conseils. A Naveen mekhileri pour ces discussions enrichissantes et ta bonne humeur, merci également pour toute l'aide que tu as pu m'apporter.

A Adeline Boyreau pour ta bonne humeur et ton aide précieuse en cette fin de thèse. Je ne m'en serais pas sorti sans toi. A Amaury Badon pour ton aide sur l'analyse d'image. A Jean-Baptiste Trebbia, pour ces discussions et tes bons conseils sur MATLAB. A Pierre Bon pour ta bonne humeur et tes fabuleux T-shirts. A Jordan Swietlicki pour l'impression 3D, et ces parties d'échecs et de tennis.

Merci à Alberto Aguilar, Siddharatha Thakur, Jeanne Linarès-Loyez, Noémie Danné, Camille Malrieux, Antonine Rochet, Karen Caiced et Guillaume Maucort pour tous ces bons moments partagés.

Je remercie également à l'équipe du LAMC, en particulier Laëtitia Andrique et Nadège Pujol pour avoir su m'aider et me conseiller dès que j'en avais besoin.

Je remercie tous nos collaborateurs de l'IPMC et Cell adhesion and Mechanics pour leur bons conseils et d'avoir pris le temps de m'accueillir quelques jours au sein de leur équipe.

Un grand merci à ma famille et mes amis pour leur soutien inconditionnel.

Ces derniers mots pour ma fiancée, Florine Giraudet, sans qui ce travail n'aurait certainement jamais abouti. Tu m'as toujours soutenu, et ce malgré les difficultés qu'ont pu apporter la thèse sur notre vie de couple. Merci pour tout !

# Résumé

---

Une cellule souche est une cellule qui a la capacité de s'auto-renouveler, de se multiplier à l'infini et de se différencier en des cellules spécialisées. Placée dans son microenvironnement, elle est soumise à une myriade de signaux chimiques et physiques qui régulent son destin cellulaire. De nombreuses études, conduites in vitro sur des cellules souches isolées ou en monocouche, ont mis en évidence le rôle crucial des forces extérieures ou des propriétés mécaniques des substrats dans le déclenchement et l'orientation de la différenciation cellulaire via des processus de mécanotransduction ou mécanosensation dont certains acteurs moléculaires ont été élucidés. La validation ou infirmation de ces mécanismes dans un environnement tridimensionnel (3D), qui récapitule plus fidèlement l'architecture des tissus biologiques, exige cependant le développement de nouvelles approches. En effet, il n'y a plus de substrat proprement dit, et comment appliquer ces forces pendant une durée suffisante pour influencer la différenciation.

Notre stratégie est de générer des organoïdes encapsulés dans des coques d'hydrogel transparentes, perméables et élastiques. Ce système de culture cellulaire à 3D nous permet d'étudier par microscopie optique la croissance de l'organoïde en conditions de croissance libre ou confinée élastiquement. Pour permettre le suivi en temps réel de la différenciation, nous avons choisi comme système cellulaire d'étude des cellules souches adipeuses (ou pré-adipocytes) qui ont la particularité de subir une forte augmentation de volume (hypertrophie) due à l'apparition et l'accumulation de gouttelettes lipidiques au cours de leur différenciation en adipocytes. Ainsi, la croissance de l'organoïde est a priori déterminée par la combinaison de deux effets : l'augmentation du nombre de cellules souches adipeuses par prolifération et l'augmentation du volume cellulaire des pré-adipocytes en cours de différenciation. Par une méthode tout-optique associant suivi morphométrique par microscopie à contraste de phase et suivi structural par microscopie de fluorescence à sectionnement optique, nous avons montré, en l'absence de signal chimique adipogénique, que la prolifération cellulaire est considérablement réduite à 3D par rapport à 2D et que le processus de différenciation des cellules souches adipeuses est déclenché par simple agrégation dès la formation de l'organoïde. Alors que cette différenciation « spontanée » n'apparaît à 2D qu'une fois la confluence atteinte et la prolifération complètement arrêtée, la formation d'un organoïde place intrinsèquement les cellules dans un contexte de confluence. En bref, par le développement d'une pipeline méthodologique d'analyse d'organoïdes en cours de différenciation, nous apportons, sur une étude de cas, une preuve nouvelle de l'influence cruciale de la dimensionalité sur le destin cellulaire. Enfin, ce travail se termine par une partie exploratoire indépendante autour de nouvelles méthodes d'encapsulation visant à concevoir des capsules d'hydrogel présentant une plus grande variété de propriétés physico-chimiques.

**Mots clés :** *Organoïdes, Préadipocytes, Mécanotransduction, Hydrogel, Confinement*

# Abstract

---

A stem cell is a cell that has the ability to self-renew and differentiate into specialised cells. Placed in its microenvironment, a stem cell is exposed to a myriad of chemical and physical cues that regulate its cellular fate. Numerous studies, performed in vitro on individual cells or cell monolayers, have highlighted the crucial role of external forces or mechanical properties of substrates in triggering and guiding cell differentiation via mechanotransduction or mechanosensation processes, some of whose molecular players have been elucidated. The validation or disproof of these mechanisms in a three-dimensional (3D) environment, which more faithfully recapitulates the architecture of biological tissues, requires however the development of new approaches. Indeed, there is no longer a substrate as such, and the question arises as how to apply these forces for a sufficient duration to influence differentiation.

Our strategy is to generate organoids encapsulated in transparent, permeable and elastic hydrogel shells. This 3D cell culture system allows to study organoid growth under free or elastically confined growth conditions by optical microscopy. To perform real-time monitoring of differentiation, we selected adipose stem cells (or pre-adipocytes), which have the peculiarity of drastically increasing in volume (hypertrophy) because of the appearance and accumulation of lipid droplets during their differentiation into adipocytes. Thus, the growth of the organoid is a priori determined by the combination of two effects: the increase in the number of adipose stem cells by proliferation and the increase in cell volume of the differentiating pre-adipocytes. Using an all-optical method combining morphometric monitoring by phase contrast microscopy and structural monitoring by fluorescence optical sectioning microscopy, we have shown, in the absence of a chemical adipogenic cue, that cell proliferation is considerably reduced in 3D compared to 2D and that the differentiation process of adipose stem cells is solely triggered by aggregation upon organoid formation. Whereas this "spontaneous" differentiation only occurs in 2D once confluence is reached and proliferation has stopped completely, organoid formation intrinsically places the cells in a confluent context. In conclusion, through the development of a methodological pipeline for the analysis of differentiating organoids, we provide new evidence for the crucial influence of dimensionality on cell fate in a case study. Finally, this thesis work ends with an independent exploratory part around new encapsulation methods aiming at designing hydrogel capsules with a wider variety of physicochemical properties.

***Keywords : Organoid, Adipocyte stem cell, Mechanotransduction, Hydrogel, Confinement.***

# Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>12</b>
1.1	Cellules souches et différenciation.....	13
1.1.1	Définitions et propriétés générales des cellules souches .....	13
1.1.2	Facteurs de la différenciation cellulaire.....	14
1.2	Mécanotransduction, mécanosensation et différenciation induite mécaniquement .....	15
1.2.1	Définitions.....	15
1.2.2	Origine microscopique/moléculaire .....	16
1.2.3	Méthodes d'étude à l'échelle de la cellule individuelle.....	18
1.2.4	Méthodes expérimentales à l'échelle de l'assemblée multicellulaire .....	18
1.3	Obésité et mécanotransduction.....	22
1.3.1	Adipogénèse chimiquement-induite .....	23
1.3.2	Rôle des forces mécaniques dans l'adipogénèse .....	24
1.4	Cultures cellulaires tridimensionnelles.....	26
1.4.1	Définitions : distinction entre sphéroïde et organoïde .....	26
1.4.2	Méthodes de préparation d'organoïdes « à la Clevers » .....	28
	Méthodes de préparation de sphéroïdes.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.5	Echaffaudages (« scaffolds ») et hydrogels pour la culture cellulaire.....	33
1.5.1	Hydrogels physiques .....	33
1.5.2	Hydrogels chimiques .....	35
1.5.3	Hydrogels hybrides.....	36
1.6	Contraintes liées à la microscopie d'objet biologique 3D.....	37
1.6.1	Microscopies « confocales ».....	38
1.6.2	Microscopie multiphotonique.....	39
1.6.3	Microscopies à feuille de lumière.....	40
1.6.4	Tomographie par cohérence optique .....	42
1.6.1	Transparisation d'objets biologiques.....	42
1.6.1	Coupes histologiques.....	43
1.7	Problématiques et objectifs de la thèse.....	43
<b>2</b>	<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>46</b>
2.1	Modèles cellulaires.....	47
2.1.1	Cellules de la Fraction Stromale Vasculaire du Tissu adipeux.....	47
2.1.2	Lignée cellulaire clonale : maintenance et différenciation .....	47
2.1.3	Construction FUCCI.....	47
2.1.4	Fixation, immunofluorescence et coupes histologiques .....	48
2.2	Caractérisation de la prolifération cellulaire à 2D.....	49
2.2.1	Modèles de croissance cellulaire .....	49
2.2.2	Imagerie holographique sans lentille.....	52
2.2.3	Microscopie à contraste de phase .....	54
2.3	Formation d'organoïdes de préadipocytes par la technologie des capsules cellulaire. ....	56
2.3.1	Principe de fonctionnement de la technique d'encapsulation et contraintes pratiques .....	56
2.3.2	Fabrication d'une puce microfluidique hybride.....	57

2.3.3	Module d'encapsulation électro-fluidique.....	60
2.3.4	Caractérisation morphométrique des capsules.....	64
2.3.5	Protocole d'encapsulation .....	66
2.3.6	Capsules à petit et grand cœur : modulation de l'épaisseur de la coque.....	68
2.3.7	Stratégie de formation d'agrégats cellulaires uniques par capsule .....	69
2.4	Microfabrication de micro-puits pour capsules.....	70
2.4.1	Sensibilité environnementale des préadipocytes .....	70
2.4.2	Moulage de micro-puits pour adressage des capsules .....	71
2.4.3	Protocole de transfert des capsules .....	74
2.5	Techniques de confinement de cellules à 2D .....	75
2.5.1	Photolithographie .....	75
2.5.2	Micro-impression d'ilots adhérents .....	76
2.5.3	Fabrication par gaufrage de motifs topographiés .....	78
2.6	Imagerie et Analyses d'images.....	79
2.6.1	Microscopie en fond clair et segmentation des agrégats multicellulaires.....	79
2.6.2	Microscopie de fluorescence et segmentation des gouttelettes lipidiques.....	81
<b>3</b>	<b>Résultats et Discussion</b>	<b>86</b>
3.1	Deux observations surprenantes.....	87
3.1.1	Croissance lente des organoïdes adipocytaires.....	87
3.1.2	Production précoce de gouttelettes lipidiques en milieu non-adipogénique.....	87
3.2	Croissance d'organoïdes de préadipocytes encapsulés .....	88
3.2.1	Comparaison de trois protocoles d'imagerie .....	88
3.2.2	Cinétiques de croissance.....	89
3.3	Différenciation d'organoïdes de préadipocytes encapsulés.....	92
3.3.1	Problématique liée à la géométrie 3D pour l'imagerie en profondeur.....	93
3.3.2	Principe de détermination de la répartition et du nombre de gouttelettes lipidiques à partir de coupes histologiques.....	94
3.3.3	Évolution de la distribution de taille des gouttelettes lipidiques .....	97
3.3.4	Quantification de la production de lipides au cours du temps.....	99
3.4	Monocouches de préadipocytes confinées spatialement à 2D.....	100
3.4.1	Problèmes d'échappement cellulaire sur des substrats à motifs imprimés .....	100
3.4.2	Cinétique de croissance à 2D sur motifs topographiés .....	101
3.4.3	Impact du confinement 2D sur le cycle et la prolifération cellulaire.....	104
3.5	Différenciation adipocytaire par confinement à 2D .....	107
3.5.1	En milieu enrichi en insuline.....	107
3.5.2	En milieu non-adipogénique.....	108
3.6	Discussion .....	110
<b>4</b>	<b>Variantes autour de la technique d'encapsulation</b>	<b>119</b>
4.1	Introduction .....	120
4.2	Doubles coques et coques composites : utilisation de plusieurs polymères répondant à des stimuli de réticulation différents.....	122
4.2.1	Formation de tubes et de capsules à paroi double couche .....	123
4.2.2	Formation de tubes et de capsules à paroi composite .....	124
4.3	Coques « bi-réticulées » : utilisation de polymères doublement réticulables.....	126
4.3.1	Formation de tubes à paroi mixte bi-réticulée .....	126
4.3.2	Formation de capsules à paroi mixte bi-réticulée .....	128
4.4	Formation de capsules multi-compartimentées .....	129

4.5	Récapitulatif .....	131
<b>5</b>	<b>Conclusion et Perspectives</b>	<b>133</b>

# Index des Figures

---

Figure 1.1: « L'arbre de la vie » des cellules souches. ....	14
Figure 1.2: Elasticité tissulaire et différenciation des MSCs.....	16
Figure 1.3 : Médiateurs de la mécanotransduction cellulaire.....	17
Figure 1.4: Formation de contacts focaux en réponse à l'application d'une force externe. ....	18
Figure 1.5: Méthodes expérimentales d'application et/ou de mesures de forces sur sphéroïdes adaptées des méthodes sur cellule unique.....	19
Figure 1.6: Nouvelles approches expérimentales d'applications et/ou de mesures de contraintes sur tissus.....	20
Figure 1.7 : Impact des contraintes spatiales que le devenir cellulaire. ....	22
Figure 1.8 : Séquence générale de « prolifération-différenciation » de pré-adipocytes. ....	22
Figure 1.9 : Aperçu des étapes de la différenciation des adipocytes.....	24
Figure 1.10 : Représentation schématique des différentes voies de signalisation de la mécanotransduction potentiellement impliquées dans la régulation de l'adipogenèse en fonction du stimulus mécanique. ....	25
Figure 1.11: Systèmes organoïdes humains associés au tissu d'origine. ....	27
Figure 1.12 : Culture d'organoïdes. ....	28
Figure 1.13: Récapitulatif des différentes méthodes de formation de sphéroïdes.....	29
Figure 1.14 : Réseau microfluidique de piliers et « pièges » pour la formation d'organoïdes de taille contrôlée. ....	30
Figure 1.15 : Formation de capsules cellulaires.....	32
Figure 1.16 : Encapsulation cellulaire par instabilité de Rayleigh dans l'air.....	32
Figure 1.17 : Schéma de fonctionnement d'une variante du dispositif d'encapsulation avec champ électrique... ..	33
Figure 1.18 : Structure chimique de l'alginate.....	34
Figure 1.19 : Réticulation physique d'un gel thermosensible.....	35
Figure 1.20 : Réticulation chimique induite par la lumière.....	36
Figure 1.21 : Réticulation du GelMA.....	36
Figure 1.22: Réticulation de l'AlgMA.....	37
Figure 1.23: Représentation schématique de la pyramide des paramètres d'acquisition en bioimagerie.....	38
Figure 1.24 : Illustrations des techniques SPIM et DSLM.....	41
Figure 1.25: Spécificités des différences techniques de microscopie à fluorescence linéaire et non-linéaire.....	41
Figure 2.1 : Caractérisation du cycle cellulaire à l'aide de la construction FUCCL. ....	48
Figure 2.2 : Microscopie holographique sans lentille. ....	53
Figure 2.3: Cytonote 1W.....	53
Figure 2.4: Détermination du taux de prolifération des pré-adipocytes 3T3-F442A avec le Cytonote.....	54
Figure 2.5 : Incucyte.....	55
Figure 2.6 : Détermination du taux de prolifération des pré-adipocytes 3T3-F442A avec l'Incucyte.....	56
Figure 2.7 : Principe de formation de coques d'alginate par jetting et instabilité de Rayleigh.....	57
Figure 2.8 : Différentes générations de puces de coextrusion développées au laboratoire avant 2016.....	58
Figure 2.9 : Imprimante 3D.....	59
Figure 2.10 : Puce hybride verre-plastique.....	60
Figure 2.11 : Dispositif d'encapsulation.....	61
Figure 2.12 : Schéma du dispositif d'encapsulation.....	62
Figure 2.13 : Différents régimes électrohydrodynamiques en fonction des paramètres $We$ et $Bo_e$ .....	64
Figure 2.14 : Images de capsules en fonction du champ électrique appliqué.....	65
Figure 2.15 : Histogramme du rayon équivalent des capsules en fonction de la tension appliquée.....	66
Figure 2.16 : Caractérisation morphométrique des capsules d'alginate en fonction de la tension appliquée.....	66
Figure 2.17: Encapsulation de pré-adipocytes : distribution des tailles de capsules et de leur sphéricité à 2kV .	67
Figure 2.18: Influence des débits sur le rapport d'aspect.....	68

Figure 2.19 : Effet de la centrifugation sur le nombre d'agrégats par capsule.....	70
Figure 2.20: Sensibilité des sphéroïdes adipeux (3T3 L1) à la surpopulation : effet de la production d'adiponectine par rapport à la culture 2D.....	71
Figure 2.21 : Croissance des agrégats de 3T3 F442 2A en fonction du nombre de capsules.....	71
Figure 2.22 : <i>UniverSlide</i> .....	73
Figure 2.23 : Nouveau tampon en résine imprimé en 3D.....	74
Figure 2.24 : illustration du transfert des capsules dans les puits d'agarose.....	75
Figure 2.25: Lithographie sans masque (SmartPrint).....	75
Figure 2.26: Fabrication d'un tampon en PDMS.....	76
Figure 2.27 : Protocole de fabrication de motif par dépôt de protéines.....	77
Figure 2.28 : Protocole de fabrication de motif par gaufrage.....	78
Figure 2.29 : Organigramme de la macro de segmentation.....	80
Figure 2.30: Exemples de segmentation d'agrégats cellulaires encapsulés et disposés dans les puits d'une <i>UniverSlide</i> .....	80
Figure 2.31: Exemple d'aberration de l'analyse automatique.....	81
Figure 2.32: Exemple de rupture de la coque d'alginate.....	81
Figure 3.1: Agrégat préadipocytaire 3T3F442A en régime non adipogénique dans des puits d'agarose.....	87
Figure 3.2 : Organoïde préadipocytaire 3T3F442A avec et sans milieu adipogénique.....	88
Figure 3.3: Croissance du rayon équivalent des organoïdes pré-adipocytaire avec et sans milieu adipogénique en fonction du protocole utilisé.....	90
Figure 3.4 : Croissance normalisée du rayon des agrégats 3T3F442A selon les protocoles 2 et 3, avec et sans milieu adipogénique.....	91
Figure 3.5 : Ajustement linéaire de la croissance des agrégats des protocoles 2 et 3 avant confluence.....	91
Figure 3.6 : Images en microscopie confocale d'agrégats de préadipocytes fixés en fonction du nombre de jours de culture dans un milieu adipogénique et non adipogénique.....	93
Figure 3.7 : Coupes optiques de différentes zones d'un organoïde de 3T3F442A en cours de différenciation. ...	94
Figure 3.8 : Coupes histologiques d'agrégats adipocytaires cultivés en milieu adipogénique ou non adipogénique.....	95
Figure 3.9 : Répartition radiale des noyaux au sein d'agrégat de 3T3-F442A.....	96
Figure 3.10 : Distributions normalisées, en milieux non-adipogénique et adipogénique, des aires de gouttelettes lipidiques avec ajustement log-normal.....	98
Figure 3.11 : Distributions, en milieux non-adipogénique et adipogénique, des aires de gouttelettes en échelle semi-logarithmique.....	99
Figure 3.12 : Évolution temporelle de la surface totale AGL des GLs à l'équateur et de la surface de la section équatoriale de l'agrégat, Ag, avec et sans milieu adipogénique.....	100
Figure 3.13 : Confinement cellulaire à 2D par micro-impression d'ilots adhérents et échappement cellulaire à long terme.....	101
Figure 3.14 : Croissance des pré adipocytes en 2D sur des patterns circulaires.....	102
Figure 3.15 : Courbes de croissance du nombre de cellules N sur patterns avec et sans milieu adipogénique... ..	102
Figure 3.16 : Croissance du nombre de cellules par pattern, avec et sans milieu adipogénique.....	104
Figure 3.17 : Images composites « champ clair/fluorescence » des préadipocytes FUCCI sur patterns 2D.....	105
Figure 3.18 : Nombre de cellules par pattern et fraction de cellules en phase G1 en fonction de t-Tp.....	105
Figure 3.19 : Fraction de cellules en phase G1 aux temps courts.....	106
Figure 3.20 : Évolution temporelle du nombre $N_g$ , de l'aire totale projetée $A_t$ des gouttelettes lipidiques par pattern et de la fraction de cellules en G1, en milieu adipogénique.....	108
Figure 3.21 : Évolution temporelle du nombre $N_g$ , de l'aire totale projetée $A_t$ des gouttelettes lipidiques par pattern et de la fraction de cellules en G1, en milieu non-adipogénique.....	109
Figure 3.22 : Nombre et aire projetée totale des gouttelettes par pattern aux temps longs (Jour 14).....	109
Figure 3.23 : Évolution temporelle calculée du volume total $V_{GL}$ des GLs et du volume de l'agrégat $V_{ag}$ .....	112
Figure 3.24 : Validation de la méthode d'extrapolation pour l'estimation de l'aire totale $A_{GL}$ des GLs.....	113
Figure 3.25 : Ajustement de la croissance volumique des agrégats en régime de prolifération.....	115
Figure 3.26 : Variations volumiques des GLs et de l'agrégat à partir du jour 8.....	116
Figure 3.27 : Ajustement par loi de puissance des variations volumiques des GLs et des agrégats.....	117

Figure 4.1: Vesseloïdes - Auto-organisation d'une coculture de cellules musculaires lisses et cellules endothéliales en vaisseaux sanguins matures artificiels.....	120
Figure 4.2 : Systèmes d'encapsulation par irradiation UV.....	121
Figure 4.3 : Dessin du principe de fonctionnement des méthodes d'encapsulations par photo-réticulation. ....	123
Figure 4.4 : Tube à coque double couche.....	124
Figure 4.5 : Encapsulation à double réticulation avec coque composite Alginate/GelMA.....	125
Figure 4.6 : Capsules à coque composite Alginate/PEGDA/GelMA.....	126
Figure 4.7 : Tubes à coque composite AlgMA/GelMA adhérent.....	127
Figure 4.8 : Contrôle live/dead sur HUVECs dans un tube composite AlgMA/GelMA.....	127
Figure 4.9 : Capsules d'AlgMA à double réticulation. ....	128
Figure 4.10 : Dégradation par agent chélatant d'une capsule doublement réticulée. ....	129
Figure 4.11 : Capsule à coque composite algMA/GelMA doublement réticulée.....	129
Figure 4.12 : Dessin du principe de formation de capsules multi-compartmentées.....	130
Figure 4.13 : Capsules multi-compartmentées.....	131

# Notations et abréviations

---

<b>AFM:</b> Atomic Force Microscopy	<b>A<sub>ag</sub>:</b> Aire de l'agrégat
<b>AlgMA:</b> Alginate Méthacrylate	<b>A<sub>GL</sub>:</b> Aire des GLs
<b>ASC:</b> Cellules Souches Adipeuses	<b>A<sub>c</sub>:</b> Aire moyen des GLs
<b>CLSM:</b> Confocal Laser Scanning Microscopy	<b>N<sub>nd</sub>:</b> Nombre de cellules non-différenciées
<b>CMOS:</b> Complementary Metal Oxide Semiconductor	<b>N<sub>d</sub>:</b> Nombre de cellules différenciées
<b>DSLMS:</b> Digitally Scanned Light-sheet Microscope	<b>T<sub>c</sub>:</b> Temps de confluence
<b>ECM:</b> Extracellulaire Cellule-Matrice	<b>T<sub>p</sub>:</b> Temps de pré-confluence
<b>FUCCI:</b> Fluorescence ubiquitination cell cycle indicator	<b>R<sub>ag</sub>:</b> Rayon de l'agrégat
<b>GelMA:</b> Gélatine Méthacrylate	<b>v<sub>0</sub>:</b> volume des cellules non-différenciées
<b>GLs:</b> Gouttelettes Lipidiques	<b>v<sub>d</sub>:</b> volume des cellules en cours de différenciation
<b>IPA:</b> Isopropanol	<b>V<sub>ag</sub>:</b> Volume de l'agrégat
<b>iPCS:</b> Cellules Souches induites à la Pluripotence	<b>V<sub>GL</sub>:</b> Volume des gouttelettes
<b>IR:</b> Infrarouge	<b>ρ<sub>n</sub>:</b> Densité surfacique des noyaux cellulaires
<b>LAP:</b> Lithium phenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl) phosphinate	<b>φ:</b> Fraction de GLs
<b>MSC:</b> Mesenchymal Stem Cells	
<b>OCT:</b> Tomographie par cohérence optique	
Optimal Cutting Temperature compound	
<b>PAA:</b> Poly(acide acrylique)	
<b>PBS:</b> Saline tamponnée au phosphate	
<b>PDMS:</b> Polydiméthylsiloxane	
<b>PEGDA:</b> Poly(éthylène glycol) diacrylate	
<b>PEG-4Mal:</b> Polyéthylène glycole maléimide à 4 bras	
<b>PFA:</b> Paraformaldéhyde	
<b>pHEMA:</b> Poly(2-hydroxyéthyle méthacrylate)	
<b>PMT:</b> Tube photomultiplicateur	
<b>PPAR-γ:</b> Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma	
<b>PVA:</b> Alcool polyvinylique	
<b>SDS:</b> Sodium dodecyl sulfate	
<b>SVF:</b> Fraction stromale vasculaire	
<b>TFM:</b> Traction Force Microscopy	

# 1

## Introduction

---

1.1	Cellules souches et différenciation.....	13
1.1.1	Définitions et propriétés générales des cellules souches .....	13
1.1.2	Facteurs de la différenciation cellulaire.....	14
1.2	Mécanotransduction, mécanosensation et différenciation induite mécaniquement .....	15
1.2.1	Définitions.....	15
1.2.2	Origine microscopique/moléculaire .....	16
1.2.3	Méthodes d'étude à l'échelle de la cellule individuelle.....	18
1.2.4	Méthodes expérimentales à l'échelle de l'assemblée multicellulaire .....	18
1.3	Obésité et mécanotransduction.....	22
1.3.1	Adipogénèse chimiquement-induite .....	23
1.3.2	Rôle des forces mécaniques dans l'adipogénèse .....	24
1.4	Cultures cellulaires tridimensionnelles.....	26
1.4.1	Définitions : distinction entre sphéroïde et organoïde .....	26
1.4.2	Méthodes de préparation d'organoïdes « à la Clevers » .....	28
	Méthodes de préparation de sphéroïdes.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.5	Echaffaudages (« scaffolds ») et hydrogels pour la culture cellulaire.....	33
1.5.1	Hydrogels physiques .....	33
1.5.2	Hydrogels chimiques.....	35
1.5.3	Hydrogels hybrides.....	36
1.6	Contraintes liées à la microscopie d'objet biologique 3D.....	37
1.6.1	Microscopies « confocales ».....	38
1.6.2	Microscopie multiphotonique.....	39
1.6.3	Microscopies à feuille de lumière.....	40
1.6.4	Tomographie par cohérence optique .....	42
1.6.1	Transparisation d'objets biologiques.....	42
1.6.1	Coupes histologiques.....	43
1.7	Problématiques et objectifs de la thèse.....	43

## 1.1 Cellules souches et différenciation

### 1.1.1 Définitions et propriétés générales des cellules souches

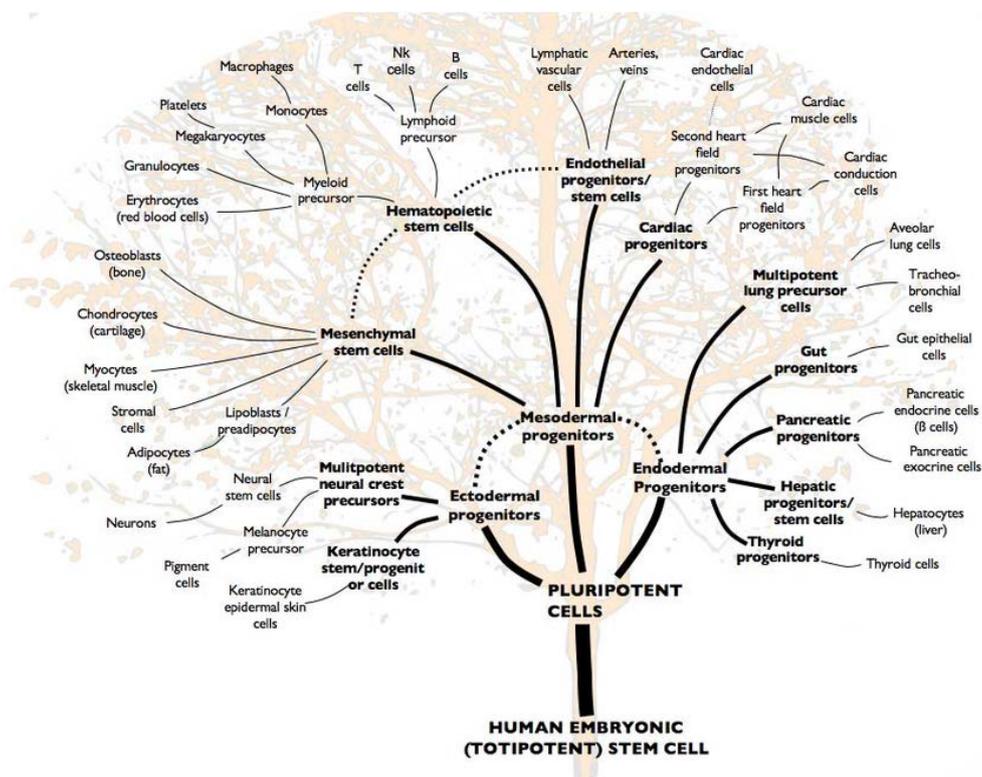
Les cellules souches (« stem cell ») sont un groupe de cellules non-spécialisées de notre corps ayant la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en divers types de cellules, permettant ainsi de construire des tissus et des organes. Il existe plusieurs types de cellules souches, qui diffèrent par leur degré de différenciation et leur capacité d'auto-renouvellement. La Figure 1.1 montre une version schématisée de l'arbre de la différenciation cellulaire. Les gamètes (ovules ou spermatozoïdes), après la fécondation, sont des cellules souches totipotentes qui se développeront en un corps entier avec différents tissus. Les cellules embryonnaires, dérivées de la partie d'un embryon (au stade du blastocyste) sont également dotées d'un plein potentiel de différenciation. Elles sont dites pluripotentes. L'auto-renouvellement d'une cellule souche correspond à une division cellulaire qui donne naissance à une progénitrice est un type de cellule intermédiaire formé avant qu'elle n'atteigne un état entièrement différencié. Elle est considérée comme engagée (« committed ») dans la différenciation. Les cellules progénitrices n'ont plus de capacité d'auto-renouvellement et sont dites oligopotentes (comme les cellules progénitrices pancréatiques qui peuvent être différenciées en cellules bêta productrices d'insuline ou en d'autres cellules pancréatiques endocrines et exocrines), voire unipotentes. Les lipoblastes, plus couramment appelés pre-adipocytes, sont un tel exemple de cellules unipotentes. Ce sont des cellules immatures du tissu adipeux qui ne peuvent se différencier qu'en adipocytes.

Enfin, sans chercher à vouloir être exhaustif, il existe deux autres grands types de cellules souches.

Il y a tout d'abord les cellules multipotentes. Bien que non étudiées dans le cadre de ce travail, il est utile de les mentionner, car elles englobent notamment les cellules souches mésenchymateuses (MSC ou "mesenchymal stem cells") sur lesquelles la plupart des expériences de biophysique et mécanotransduction ont été réalisées jusqu'à maintenant. Les cellules multipotentes font partie de la catégorie des cellules souches adultes qu'on trouve dans la plupart des tissus adultes (par exemple la moëlle épinière). Les cellules souches mésenchymateuses adipeuses (ADSC) sont une sous-famille et elles ont la capacité de se différencier en cellules mésenchymateuses, telles que les ostéoblastes (cellules osseuses), les myocytes (cellules musculaires), les chondrocytes (cellules du cartilage) ou les adipocytes (cellules grasses) sur lesquelles nous reviendrons plus en détails dès la section 1.3 de cette introduction.

Une autre catégorie de cellules souches est ce qui représente une des plus grandes avancées des 20 dernières années en biologie et peut-être en médecine, à savoir les cellules souches induites à la pluripotence (« iPSC »), qui sont dérivées artificiellement d'une cellule non pluripotente, généralement une cellule somatique adulte, en induisant une expression "forcée" de quelques facteurs de transcription (Oct3/4, Sox2, KLF4, et c-Myc). Cette re-différenciation (ou reprogrammation) de fibroblastes de souris en cellules pluripotentes ayant les marqueurs de cellules embryonnaires a été réalisé par Yamanaka (prix Nobel de Médecine 2012) en 2006 (Takahashi and Yamanaka, 2006), puis étendu à des cellules humaines en 2007 par le même groupe (Takahashi et al., 2007). Comme les iPSC peuvent se propager indéfiniment et se

différencier en n'importe quel type de cellule, elles constituent une source pratique et illimitée pour étudier d'un point de vue fondamental le développement d'un organisme, mais aussi pour remplacer des tissus endommagés ou malades (diabète, maladies neurodégénératives). Les iPSC évitent l'utilisation d'embryons ou fœtus, ce qui est plus évidemment favorable d'un point de vue éthique. Comme elles peuvent être reprogrammées à partir des propres cellules du patient, elles sont autologues et ne génèrent plus de risque de rejet immunitaire. Il « suffit » ensuite de déclencher la différenciation souhaitée. Ainsi, à partir de fibroblastes extraits de notre peau, on peut a priori générer des neurones dopaminergiques potentiellement utiles au traitement de la maladie de Parkinson (Doi et al., 2020; T. W. Kim et al., 2020; Osborn et al., 2020).



**Figure 1.1:** « L'arbre de la vie » des cellules souches. Les lignes plus épaisses indiquent les principales voies empruntées pour obtenir des types de cellules différenciées à partir de cellules souches embryonnaires humaines. Note : : toutes les lignées ne sont pas représentées. Extrait de (Winickoff et al., 2009)

### 1.1.2 Facteurs de la différenciation cellulaire

De manière générale, il existe plusieurs types de différenciation:

1. Transdifférenciation : conversion directe d'un type de cellule en un autre type de cellule différent ;
2. Dédifférenciation : une cellule souche unipotente ou progénitrice devient une cellule multipotente ;
3. Différenciation directe : un type spécifique de cellule pluri/multi/oligo/uni-potente se transforme en une cellule somatique en une ou plusieurs étapes.

Nous ne nous intéresserons qu'à la différenciation directe. Celle-ci implique une succession

d'altérations de la morphologie de la cellule, de la structure cellulaire, de l'activité métabolique et de la réactivité à certains signaux.

Le suivi de la différenciation, ou plus exactement la vérification que la différenciation a bien eu lieu et de manière complète, se fait classiquement par la détection de marqueurs caractéristiques, en se basant sur des tests d'expression de protéines, de séquençage d'ARNs. Certaines méthodes physiques ont été plus récemment développées pour permettre un suivi au cours du temps : entre autres exemples, des mesures d'impédance électrique (Park et al., 2011) ou de spectroscopie Raman en se basant sur les signatures spectrales de compartiments subcellulaires (Ravera et al., 2021).

Il a été démontré qu'un certain nombre de facteurs environnementaux jouent un rôle dans la différenciation des cellules souches. Les premiers et plus étudiés par le passé sont les signaux chimiques tels que les facteurs de croissance ou les cytokines. La formulation de milieux de culture et cocktails de différenciation optimisés fait encore l'objet de nombreuses publications (e.g. (Gantner et al., 2020; Pei et al., 2017; Yu et al., 2015) ). Mais, depuis environ deux décennies, les signaux physiques ont été révélés comme jouant aussi un rôle crucial. Parmi ceux-ci, les contacts entre cellules, les contacts cellule-matrice extracellulaire (« ECM ») et les forces physiques externes. De manière générale, cela définit le domaine de la mécanotransduction, c'est-à-dire la capacité d'une cellule à détecter, intégrer et convertir activement des stimuli physiques ou mécaniques en signaux biochimiques qui entraînent des changements intracellulaires et donc une réponse (e.g. par rapport à la division, migration, adhésion) altérée. Dans le contexte plus restreint des cellules souches, ces signaux mécaniques peuvent aussi influencer le devenir cellulaire, i.e. sa différenciation.

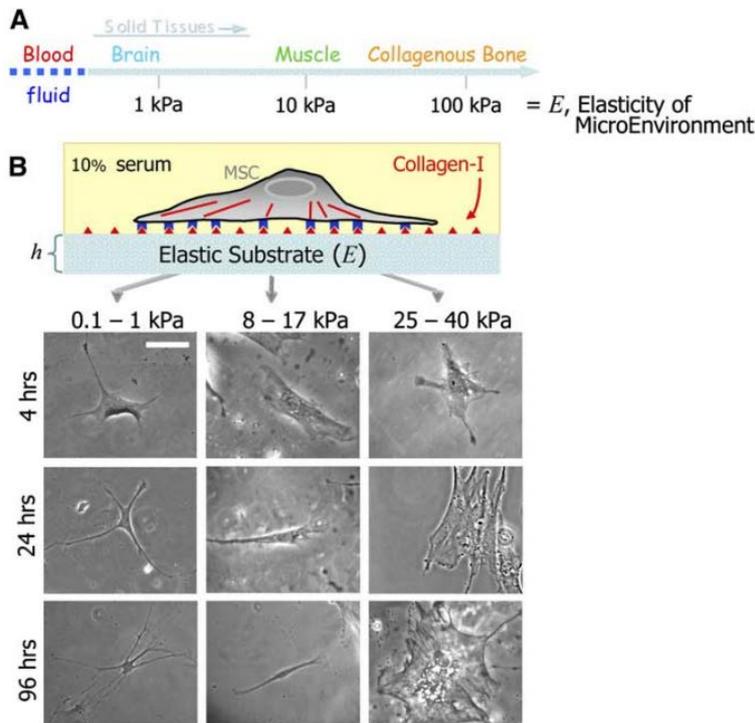
## 1.2 Mécanotransduction, mécanosensation et différenciation induite mécaniquement

### 1.2.1 Définitions

En suivant la terminologie de Wirtz et coll. (Kim et al., 2013), nous affinons la terminologie générale de mécanotransduction introduite dans le paragraphe précédent et nous distinguons la mécanosensation cellulaire de la mécanotransduction proprement dite.

- La mécanosensation (ou -sensibilité) est la capacité des cellules à reconnaître, à analyser et à répondre aux changements de la rigidité des substrats extracellulaires. Des études pionnières du groupe de D. Discher démontrent en effet que les cellules sont mécanosensibles (Discher et al., 2005) puis que la rigidité mécanique de la matrice extracellulaire est un régulateur important de l'orientation de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses (Engler et al., 2006). En effet, cultivées sur des matrices de rigidité contrôlée, des MSC se différencient, en l'absence de facteurs de croissance exogènes, à des neurones sur substrats mous ( $\sim 0,2\text{kPa}$ ), cellules musculaires sur substrats intermédiaires ( $\sim 10\text{kPa}$ ), et des ostéoblastes sur substrats encore plus rigides ( $\sim 40\text{kPa}$ ) (Figure 1.2). Quelques années plus tard, le message a été raffiné : la synergie des facteurs de croissance et des signaux mécaniques est nécessaire pour rendre la différenciation complète, c'est-à-dire parvenir jusqu'à des cellules différenciées matures (Discher et al., 2009): les deux facteurs pris séparément *in vitro* sont suffisants pour déclencher

la différenciation mais conduisent souvent à des états non matures. Par ailleurs, en plus de la rigidité du substrat, les contacts cellule-cellule sont des déterminants importants de la régulation de la différenciation. Par exemple, sur substrat rigide, l'ostéogénèse est améliorée si les MSCs ne sont pas isolées, mais plutôt agrégées par doublets ou triplets sur des micromotifs adhérents (Mao et al., 2016). De même, il a été montré que l'adhésion et la prolifération de cellules gliales est certes dépendante de la rigidité du substrat, mais cette sensibilité peut être inversée en modifiant la nature chimique des composants de l'ECM (Tomba et al., 2019).



- La mécanotransduction est le mécanisme par lequel les cellules répondent à des forces extérieures et les convertissent en signaux biochimiques. *In vivo*, les cellules sont soumises à des forces mécaniques variées, telles que les forces de compression ou de traction et des contraintes de cisaillement. Ces forces, qu'on essaie souvent de récapituler *in vitro*, sont en effet pertinentes dans de nombreuses situations physiologiques et pathologiques. On peut penser immédiatement au flux sanguin dans le système vasculaire et son rôle dans l'athérosclérose (Malek, 1999). Le manque d'activité physique et donc de stimuli mécaniques peut conduire à un affaiblissement des os et être une cause majeure de l'ostéoporose (Klein-Nulend et al., 2012). L'étirement intervient naturellement dans les cellules musculaires et peut impacter l'activation, la prolifération et la différenciation de cellules progénitrices myogéniques (Wang et al., 2020) de manière pas encore bien comprises. Ces forces peuvent générer des réponses qui affectent la structure du cytosquelette des cellules et leur contractilité, ce qui engendre également de nouvelles forces, mais cette fois internes à la cellule.

### 1.2.2 Origine microscopique/moléculaire

Au-delà de ces observations phénotypiques à l'échelle de la cellule ou du tissu, une grande

activité de recherche a constitué à identifier les structures subcellulaires, les molécules (protéines) et les cascades de signalisation à l'origine de ces processus de mécanosensation/transduction (Ruprecht et al., 2016). Sans pouvoir être exhaustif, les sites subcellulaires les mieux décrits comme participant à des mécanismes de mécanotransduction sont peut-être, comme résumé sur la figure 3, les cils primaires d'épithéliums (Wann et al., 2012), les canaux ioniques (tels que les canaux TRP ou Piezo1 et 2, qui ont valu le prix Nobel en 2021 à Ardem Patapoutian) (Coste et al., 2010; Resnick and Hopfer, 2007; Ridone et al., 2019) ou les cavéoles (Sinha et al., 2011) modulés par l'étirement de la membrane plasmique, le noyau (Dahl et al., 2008) via leurs principales protéines structurales, lamin A, B and C (Swift et al., 2013; Cho et al., 2017), les jonctions cellulaires via la alpha-caténine, protéine partenaire des cadhérines (Leckband and de Rooij, 2014; Ladoux et al., 2015; Bush et al., 2019; Mei et al., 2020) et les adhésions focales.

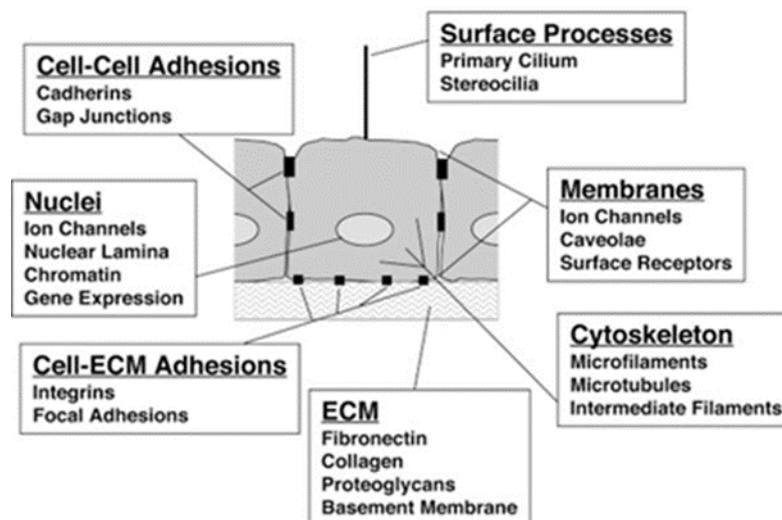
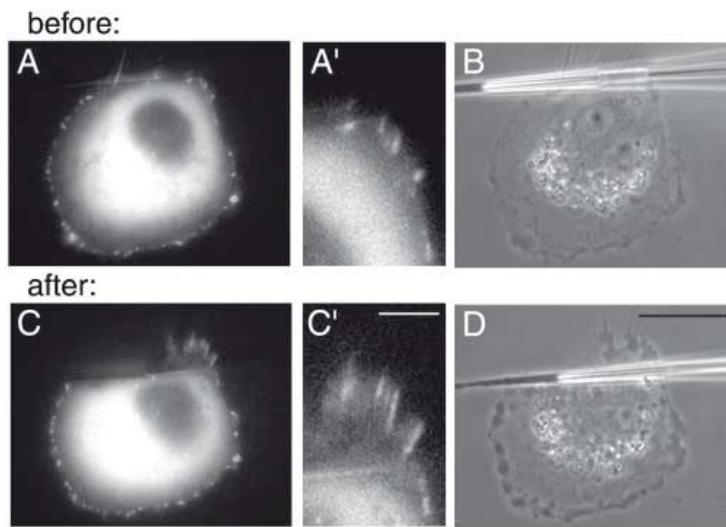


Figure 1.3 : Médiateurs de la mécanotransduction cellulaire. Adapté de (Ingber, 2006).

Les contacts focaux ont été les premiers à être étudiés par des expériences de biophysique quantitative et supportées par des modèles théoriques. Elles sont assez fascinantes dans le sens où, bien que les cellules soient des systèmes hors équilibre, le principe de Le Chatelier bien connu en thermodynamique, qui dit que lorsqu'un système chimique à l'équilibre est perturbé, il revient à l'équilibre en contrebalançant la perturbation, semble être respecté de manière triviale. En effet, les adhésions focales auraient tendance à se renforcer quand une perturbation vise à détacher une cellule. Cela a été d'abord montré, il y a plus de 20 ans par deux expériences pionnières : celle de D. Choquet dans le groupe de M. Sheetz à Columbia (Choquet et al., 1997), montrant le renforcement des liens intégrine-cytosquelette sous l'action d'une force appliquée à l'aide d'une bille couverte de ECM (fibronectine) piégée dans une pince optique. La deuxième, plus visuelle, a été conduite par D. Riveline dans le groupe de A. Bershadsky au Weizmann Institute (Riveline et al., 2001). Elle consiste à balayer une cellule adhérente avec un capillaire en verre. L'action de ce cisaillement sur la cellule provoque l'accroissement des adhésions focales, c'est-à-dire le renforcement de l'adhésion. A une échelle moléculaire, il a été montré plus tard que c'est la taline, partenaire de l'actine et des intégrines qui est le principal acteur dans cette réponse mécaniquement induite. En effet, sous l'action d'une force extérieure,

le dépliement partiel de la taline révèle des sites cryptiques de liaison à la vinculine qui permettent ensuite le recrutement d'actine et le renforcement des adhésions focales (Yan et al., 2015; Yao et al., 2016).



**Figure 1.4: Formation de contacts focaux en réponse à l'application d'une force externe.** (A-B) Cellule GFP-vinculine avant application d'une tentative d'arrachement à l'aide d'une micropipette. (C-B) Cellule après application de la force. (A, A', C, et C') images de fluorescence montrant la distribution de la vinculine ; (B et D) images de phase de la même cellule. (A') et (C') agrandissements des parties supérieures droites des images (A) et (C), respectivement montrant clairement l'allongement des contacts focaux après application de la force. Extrait de (Riveline et al., 2001)

### 1.2.3 Méthodes d'étude à l'échelle de la cellule individuelle

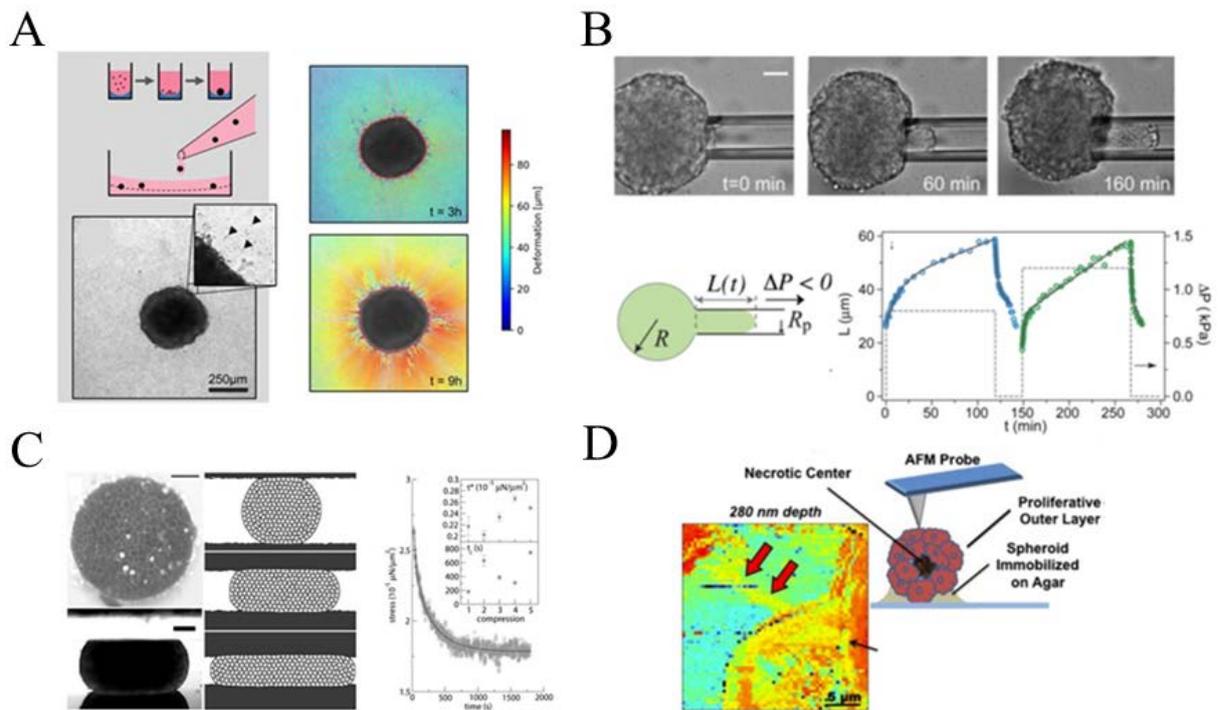
Un nombre toujours croissant de protéines, complexes protéiques ou structures subcellulaires a maintenant été identifié comme étant mécanosensibles. Cela a été rendu possible par la combinaison de l'utilisation de tests biochimiques et le développement de méthodes physique destinées à sonder les propriétés mécaniques des cellules individuelles, leur réponse contractile ou à exercer des forces extérieures sur celles-ci. L'« atomic force microscopy » (AFM), la technique des microplaques, les pinces optiques ou magnétiques sont particulièrement bien adaptées pour sonder la rhéologie cellulaire (Wu et al., 2018). L'avènement de la microfabrication et de la microfluidique appliquées au « micropatterning » (Lele et al., 2007), à la fabrication de chambre à flux microfluidiques (Morel et al., 2012; Zhang et al., 2014), d'étireurs de cellules (Fink et al., 2011) à la « Traction Force Microscopy » (TFM) (Munevar et al., 2001), à des méthodes basées sur des micropipettes (Evans, 2001) ou celle des micropilliers (Ladoux and Nicolas, 2012; Mohammed et al., 2019; Yang et al., 2007).

Accompagnant l'implémentation de ces méthodes biophysiques quantitatives, de nombreuses théories et modèles théoriques de la mécanotransduction à l'échelle cellulaire ou moléculaire ont été développées, partant de cas d'étude bien identifiés (e.g. (Nicolas et al., 2004; Wiggins and Phillips, 2004; Peng et al., 2017)) pour aller vers des descriptions plus génériques (Cheng et al., 2017).

### 1.2.4 Méthodes expérimentales à l'échelle de l'assemblée multicellulaire

Toutes ces approches théoriques et expérimentales ont cependant été validées et utilisées, pour la plupart, dans le cadre de l'étude de cellules individuelles. Ces méthodes expérimentales sont maintenant étendues à des assemblées de cellules à 2D ou 3D (Figure 1.5). Par exemple, les phénomènes de réparation de blessure et migration collective dans des monocouches peuvent être étudiés sur des substrats compliantes et fonctionnalisés par TFM (Brugués et al., 2014;

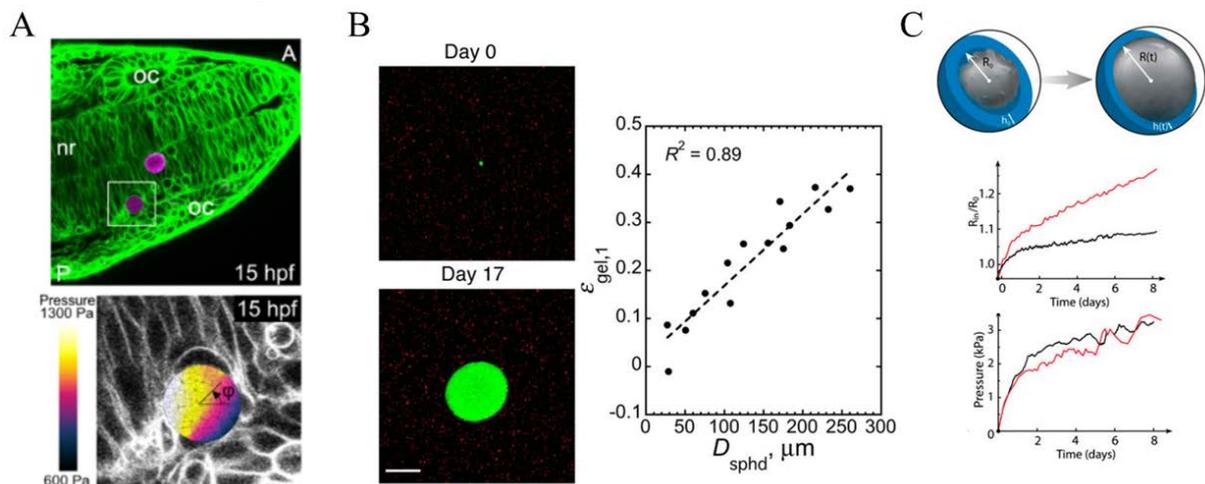
Versaevl et al., 2021). Sur des cultures 3D, une dérivation de la TFM dans des matrices de ECM enveloppant des sphéroïdes tumoraux a mis en évidence une dépendance de la contractilité des sphéroïdes avec la rigidité de la matrice (Mark et al., 2020); l'aspiration de sphéroïdes par une pipette a permis de montrer une augmentation de la tension de surface effective du sphéroïde après aspiration (Guevorkian et al., 2010); l'écrasement d'un sphéroïde entre deux plaques a mis en évidence des réorganisations cellulaires (de type T1) similaires à celles observées dans les mousses et a permis de suivre la relaxation de la contrainte et des effets plastiques dans un régime de grande déformation (Marmottant et al., 2009); la nano-indentation par AFM sonde la rigidité des cellules périphérique et de l'ECM avec une résolution subcellulaire (Vyas et al., 2019).



**Figure 1.5: Méthodes expérimentales d'application et/ou de mesures de forces sur sphéroïdes adaptées des méthodes sur cellule unique.** (A) Adaptation de la TFM sur sphéroïdes dans un gel 3D de collagène. Extrait de (Mark et al., 2020). (B) Aspiration par micropipette. Barre d'échelle 50  $\mu m$ . Extrait de (Guevorkian et al., 2010). (C) Méthode des microplaques. Barre d'échelle 125  $\mu m$ . Extrait de (Marmottant et al., 2009). (D) Nanoindentation par AFM. Extrait de (Vyas et al., 2019)

De nouvelles approches dédiées aux spécificités des systèmes cellulaires à 3D ont aussi été développées plus récemment (Figure 1.6). Une première difficulté est liée à la volonté de sonder non seulement la surface mais également l'intérieur des cultures cellulaires 3D. Pour étudier les forces intercellulaires au sein d'un embryon ou d'un agrégat *in vitro*, des sondes déformables (liquides ou élastiques) d'une taille cellulaire et fonctionnalisées ont été insérées (Campàs et al., 2013; Dolega et al., 2017; Lucio et al., 2017; Träber et al., 2019) (Figure 1.6A). Le suivi de leur forme au cours du temps permet de déduire les contraintes de cisaillement ou de compression générées. Une seconde particularité des systèmes 3D est liée à la volonté de suivre leur croissance par prolifération cellulaire. Cela suppose que les méthodes utilisées fonctionnent à une fréquence inférieure à la fréquence caractéristique d'évolution, soit  $1 \text{ jour}^{-1}$  (0.01 mHz). Ce ne sont pas les cas des expériences d'AFM ou de microplaques qui sondent plutôt les propriétés rhéologiques d'un microtissu sur des échelles de temps caractéristiques de

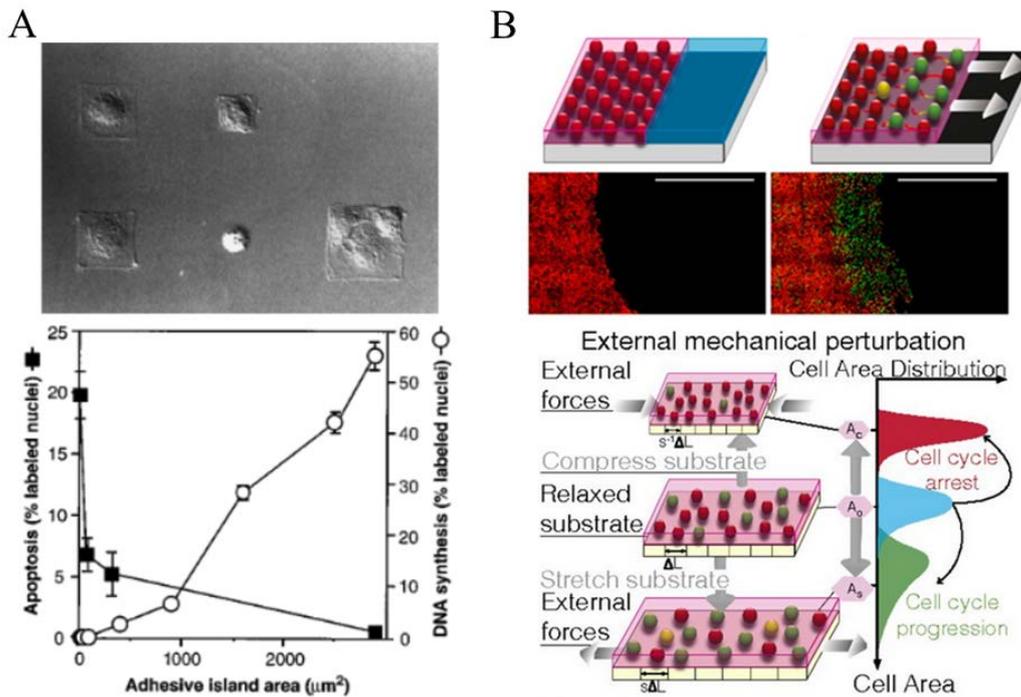
l'ordre de la milliseconde ou de l'heure. D'autres approches consistent à laisser proliférer des cellules au sein d'un gel ou enfouir un agrégat multicellulaire dans un gel (Figure 1.6B) et en déterminer un optimum de rigidité pour le maintien et la croissance de cellules souches cancéreuses (Jabbari et al., 2015), la contrainte solide inhibant la croissance d'un sphéroïde tumoral (Cheng et al., 2009) soit par une cartographie des déformations ou en utilisant équation constitutive empirique du gel. Mettre les agrégats dans un milieu chargé en polymères à longues chaînes qui ne s'infiltrent pas dans le tissu mais permettent d'appliquer une pression osmotique a également été validé avec succès (Montel et al., 2011a; Delarue et al., 2013, 2014) . Enfin, dans le groupe d'accueil a été développée la technique des Capsules Cellulaires que nous décrirons plus loin en détails et que nous utiliserons tout au long de ce travail. La formation de sphères creuses (ou coques) perméables et élastiques dans lesquelles des cellules sont encapsulées et peuvent proliférer, donne simplement une quantification de la pression moyenne appliquée sur l'agrégat cellulaire par la capsule qui se déforme (Alessandri et al., 2013) (Figure 1.6C). Cela a permis de montrer que des sphéroïdes de cellules cancéreuses de colon de souris comprimées pendant plus de 24h pouvaient acquérir un phénotype invasif, suggérant une contribution mécanique aux métastases.



**Figure 1.6: Nouvelles approches expérimentales d'applications et/ou de mesures de contraintes sur tissus.** (A) Utilisation de sondes de polyacrylamide dans le poisson zèbre permettant de mesurer les pressions exercées localement. Extrait de (Träber et al., 2019). (B) Enfouissement d'un sphéroïde (vert) dans un gel composé de microbilles (rouge). La croissance du sphéroïde déforme le gel. Barre d'échelle 100  $\mu m$ . Extrait de (Cheng et al., 2009). (C) Analyse mécanique de la croissance d'agrégats dans des capsules. Tracés temporels représentatifs de la déformation mesurée et pression calculée (pour différentes épaisseurs de coque, 8  $\mu m$  en rouge et 28  $\mu m$  en noir, donc différentes rigidités) au cours de la croissance du sphéroïde. Extrait de (Alessandri et al., 2013).

Notons qu'en plus de la différence d'échelle de temps entre l'approche « capsule élastique » (Alessandri et al., 2013) et celle des microplaques (Marmottant et al., 2009), une autre différence est que la compression est isotrope dans la capsule sphérique et uniaxiale pour les microplaques. Implicitement, l'agrégat cellulaire, qui se comporte au premier ordre comme un liquide viscoélastique peut donc fluer dans la direction perpendiculaire à la compression et relaxer la contrainte (sur des temps caractéristiques de l'ordre de l'heure). Cette absence de confinement dans une direction a également été approchée en réalisant des tubes creux élastiques par une adaptation de la technologie des Capsules Cellulaires. La possibilité pour le « cylindroïde » de s'allonger librement le long du tube conduit à une dynamique de croissance

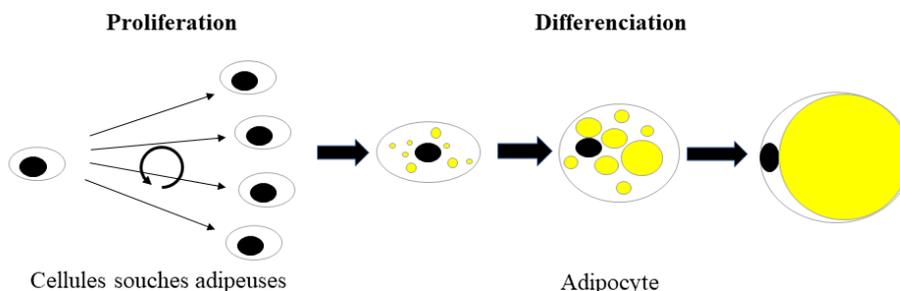
radicalement différente (Le Maout et al., 2020). Cette remarque nous amène à une question qui pourrait presque être considérée comme philosophique : y-a-t-il une différence en une compression et un confinement pour une assemblée de cellules ? D'un point de vue strict, la notion de compression fait référence à des forces tandis que le confinement indique une restriction spatiale. Toutefois, il est également connu qu'un confinement peut avoir des conséquences sur le comportement cellulaire, et donc être à l'origine de mécanismes « mécanosensibles ». Dans l'article pionnier « Geometric Control of cell life and death » (Chen et al., 1997), il s'agit bien d'un signal géométrique, à savoir la surface de la zone (« pattern » ou motif) sur laquelle l'adhésion des cellules est restreinte, qui peut déclencher l'apoptose en dessous d'un certain seuil (Figure 1.7A). Dans le même ordre d'idées, pour des MSC adhérentes sur des micromotifs en présence de cocktails de facteurs de croissance concurrents sélectionnés pour diriger une différenciation adipogénique ou ostéogénique, c'est la forme et la courbure du motif impose le destin cellulaire (Kilian et al., 2010). De même, le « cell confiner » développé dans le groupe de M. Piel à l'Institut Curie montre que confiner des cellules (dans la direction verticale entre deux surfaces peu adhésives induit une migration rapide de type amoéboïdal de cellules initialement de faible motilité dans un mode lamellipodial (Kilian et al., 2010; Liu et al., 2015). Plus récemment, le même groupe a montré que le noyau est une sorte de règle qui fournit une mesure précise des déformations cellulaires en situation de contrainte spatiale (ie. de confinement) (Lomakin et al., 2020). Enfin, nous souhaitons citer un dernier travail que nous apprécions beaucoup, par le groupe de L. Hufnagel, et qui s'intitule « Spatial constraints control cell proliferation in tissues » (Streichan et al., 2014). Dans cette expérience, en dépit de ce que semble indiquer le titre, il est montré qu'il existe un point de contrôle (« checkpoint ») dans le cycle cellulaire à la frontière entre les phases G1 et S qui contrôle la progression dans le cycle en réponse à des contraintes spatiales ou mécaniques. En effet, lorsque des cellules MDCK cultivées à 2D dans un compartiment que l'on peut agrandir soudainement en retirant une barrière, arrivent à confluence et sont donc dans un état d'inhibition de contact, elles réactivent leur cycle cellulaire dès que plus d'espace est disponible (Figure 1.7B). L'effet est le même si le substrat est étiré, ce qui a pour conséquence d'étirer les cellules (si on voit l'effet mécanique) ou de diminuer la densité cellulaire et de relâcher partiellement le confinement (si on voit l'effet sous l'aspect spatial).



**Figure 1.7 : Impact des contraintes spatiales sur le devenir cellulaire.** (A) La taille d'un micromotif sur lequel est confinée une cellule détermine son devenir cellulaire (apoptose versus survie, indiquée par la synthèse d'ADN. Adapté de (Chen et al., 1997). (B) Le confinement par une barrière d'une monocouche de cellules (MDCK) marquées Fucci conduit à une inhibition de contact et bloquage en phase G1/S. Le retrait de la barrière ou l'étirement du substrat permet une progression dans le cycle de division. Adapté de (Streichan et al., 2014).

### 1.3 Obésité et mécanotransduction

L'obésité, considérée comme un problème majeur de santé publique, se caractérise par une accumulation excessive de la masse du tissu adipeux. La croissance adipeuse en réponse à un régime riche en graisses est médiée par deux mécanismes distincts : l'hypertrophie (augmentation de la taille des cellules) et l'hyperplasie (augmentation du nombre de cellules) (Figure 1.8). Les adipocytes hypertrophiques se caractérisent par une capacité unique d'expansion du volume lors de l'accumulation de triglycérides dans des gouttelettes lipidiques intracellulaire, pouvant multiplier leur volume par plus de 30. Une population de cellules souches adipeuses (ASC) se situe autour des gros vaisseaux sanguins dans les dépôts adipeux (Y.-H. Lee et al., 2012; Tang et al., 2008). Les ASC ont une forte capacité de prolifération et la possibilité d'être engagées dans des pré-adipocytes qui se différencient ensuite en adipocytes matures.



**Figure 1.8 : Séquence générale de « prolifération-différenciation » de pré-adipocytes.**

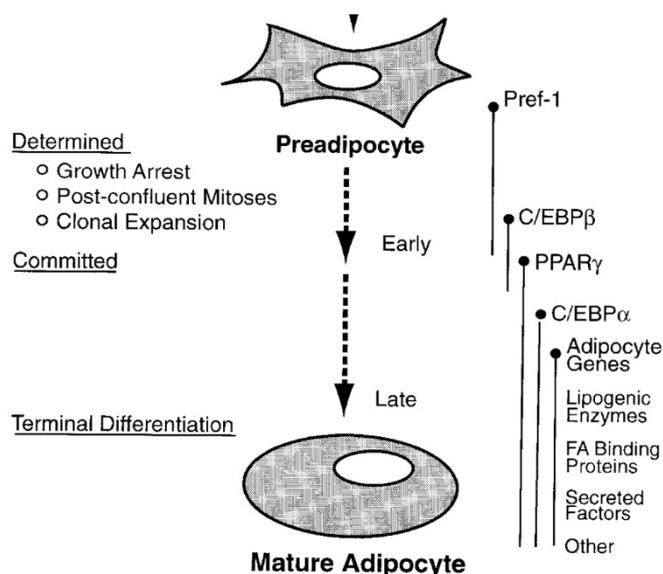
### 1.3.1 Adipogénèse chimiquement-induite

Presque tous les travaux de biologie sur l'adipogénèse ont utilisé soit des lignées cellulaires immortalisées, soit des cultures primaires de cellules souches stromales-vasculaires, qui ont été cultivées avec succès chez plusieurs espèces, y compris l'homme (Grégoire et al., 1990; Hauner et al., 1989; Nougues et al., 1988).

Les cultures primaires contiennent des cellules à différents stades de développement et ne peuvent pas être aussi bien contrôlées scientifiquement que les lignées, même si elles reflètent probablement plus précisément les conditions *in vivo*.

Les lignées cellulaires (Poulos et al., 2010) les plus fréquemment utilisées sont les 3T3-F442A et 3T3-L1. Celles-ci ont été isolées de manière clonale à partir de cellules Swiss 3T3 dérivées d'embryons de souris désagrégés (Green and Kehinde, 1975)(Green and Kehinde, 1976). Les 3T3-F442A sont généralement considérés comme un modèle dont l'engagement dans le processus de différenciation adipocytaire est plus avancé que celui des 3T3-L1 (Grégoire et al., 1998). Initialement, les pré-adipocytes présentent une morphologie similaire à celle des fibroblastes. L'induction de la différenciation se traduit par de profonds changements phénotypiques : les préadipocytes deviennent sphériques et remplis de gouttelettes lipidiques, présentant de nombreuses caractéristiques morphologiques et biochimiques des adipocytes différenciés *in vivo* ; même si souvent les gouttelettes lipidiques ne fusionnent pas toutes pour donner des adipocytes uniloculaires rencontrés *in vivo*. Ces lignées cellulaires ont donc été très utiles pour identifier les marqueurs moléculaires clés et les facteurs de transcription nécessaires à la différenciation des préadipocytes. Ils sont aussi souvent utilisés pour évaluer le potentiel adipogène de diverses espèces actives.

D'un point de vue pratique, les pré-adipocytes sont d'abord cultivés comme les autres lignées en milieu de prolifération. Une fois qu'ils ont atteint la confluence et l'inhibition de contact, une induction hormonale est effectuée en passant à un milieu dit de différenciation ou adipogénique contenant un cocktail de composés spécifiques de chaque lignée : par exemple un milieu DMEM additionné d'insuline suffit pour les 3T3-F442A tandis qu'un mélange de méthylisobutylxanthine, dexaméthasone et insuline doit être utilisé pour les 3T3-L1 (Poulos et al., 2010). Sous l'effet de cette induction, ils entrent à nouveau dans le cycle cellulaire et subissent quelques cycles de mitose, connus sous le nom d'expansion clonale. L'engagement adipocytaire a lieu ensuite dans les 24-36h qui suivent l'induction pour le 3T3-F442A et se caractérisent par l'apparition de gouttelettes lipidiques, avant de terminer la différenciation (Castro-Muñozledo et al., 2003). D'un point de vue moléculaire, l'expansion clonale qui se traduit par une synthèse d'ADN précède l'apparition de marqueurs ARNm. La séquence (complexe, entrelacée, dont la chronologie varie d'une lignée à l'autre) d'événement moléculaires est indiquée sur la Figure 1.9. Par exemple, Pref-1 (pre-adipocyte factor-1) maintient le phénotype pre-adipocyte. La diminution drastique de son expression marque le début de l'engagement vers un adipocyte mature (dans lequel il est totalement absent). Le facteur de croissance PPAR- $\gamma$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma) est critique pour l'arrêt de croissance et l'activation des gènes adipocytaires. Le rôle de l'insuline est assez complexe et encore débattu. Mais, en bref, elle agit sur le récepteur de IGF-1 (Insulin Growth Factor) qui, via une cascade de signalisation, contrôle l'expansion clonale et donc l'engagement adipocytaire précoce (Garten et al., 2012).



**Figure 1.9 : Aperçu des étapes de la différenciation des adipocytes.** A droite, les différents événements moléculaires sélectionnés. Avec : PPAR- $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  ; C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein ; pref-1, preadipocyte factor-1 ; ECM, matrice extracellulaire ; FA, acide gras. Extrait de (Gregoire et al., 1998)

### 1.3.2 Rôle des forces mécaniques dans l'adipogénèse

Il est bien connu, à l'échelle de l'être humain, que la position sédentaire inactive favorise l'obésité, c'est-à-dire le recrutement de nouveaux adipocytes différenciés à partir de pré-adipocytes, et qu'au contraire, l'exercice physique l'inhibe. Peut-on pour autant conclure à une échelle cellulaire que les mouvements entraînant des contractions ou étirements des tissus inhibent la différenciation adipocytaire ? Quel lien existe-t-il entre la mécanobiologie des pré-adipocytes et ce qui peut être appelé la mécanothérapie à l'échelle de l'organe ou de l'organisme (Yuan et al., 2015).

En tant que cellule souche (unipotente), la différenciation des pré-adipocytes est a priori affectée par les effets de rigidité de substrats et l'application de forces externes comme nous l'avons rapporté à la section précédente. La plupart des travaux dans ce domaine viennent du groupe de Amit Gefen (Tel Aviv) (Shoham and Gefen, 2012a, 2012b; Shoham et al., 2014, 2015, 2017; Katzengold et al., 2015). La revue « Mechanotransduction in adipocytes » résume de manière exhaustive les différentes expériences d'étirement ou de « charge mécanique » (mechanical loading, i.e. l'application d'un poids sur une culture 2D de pré-adipocytes). Les deux tableaux ci-dessous récapitulent les principaux résultats de ces études.

Cell type	Mechanical loading	Adipogenesis	Signaling pathway	Reference
3T3-L1 preadipocytes	15 or 45 h, cyclic uniaxial stretch of 130%, 1 Hz 45 h, cyclic uniaxial stretch of 120%, 1 Hz	↓	MAPK/ERK COX-2	Tanabe et al., 2004 Tanabe et al., 2008
3T3-L1 adipocytes	72 h, uniaxial static stretching of 120%	↑	Rho-Rho-kinase	Hara et al., 2011
Human umbilical cord perivascular cells	24 or 60 h, cyclic equibiaxial stretch of 10%, 0.5 Hz	↓	TGF $\beta$ 1/Smad	Turner et al., 2008
Bovine mesenchymal stem cells	2 weeks, 4000 $\mu$ c elongation, 1 Hz, 300 cycles/day		N.A	David et al., 2007
Mouse pluripotent mesenchymal stem cells (C3H10T1/2)	7 day, cyclic equibiaxial stretch of < 0.001% strain, 90 Hz, 40 min per day		$\beta$ -catenin	Sen et al., 2011
Marrow derived mesenchymal stem cells from C56/BL6 wild-type mice	5 day, cyclic equibiaxial stretch of 2%, 0.17 Hz, 6 h per day 4 day, cyclic equibiaxial stretch of 2%, 0.17 Hz, 6 h per day			Sen et al., 2008 Sen et al., 2009
Mouse adipose tissue stromal cells	5 day, cyclic equibiaxial stretch of 2%, 0.17 Hz, 6 h per day			Case et al., 2010
Human adipose tissue stromal cells	48 h, cyclic biaxial stretch of 10%, 0.5 Hz		N.A	Huang et al., 2010
	14 day, vibration of 100 Hz, 3 g peak acceleration, 3 h per day		N.A	Tirkkonen et al., 2011
Simpson-Golabi-Behmel syndrome cells	12 h, static compressive force of 226 Pa		COX-2	Hossain et al., 2010

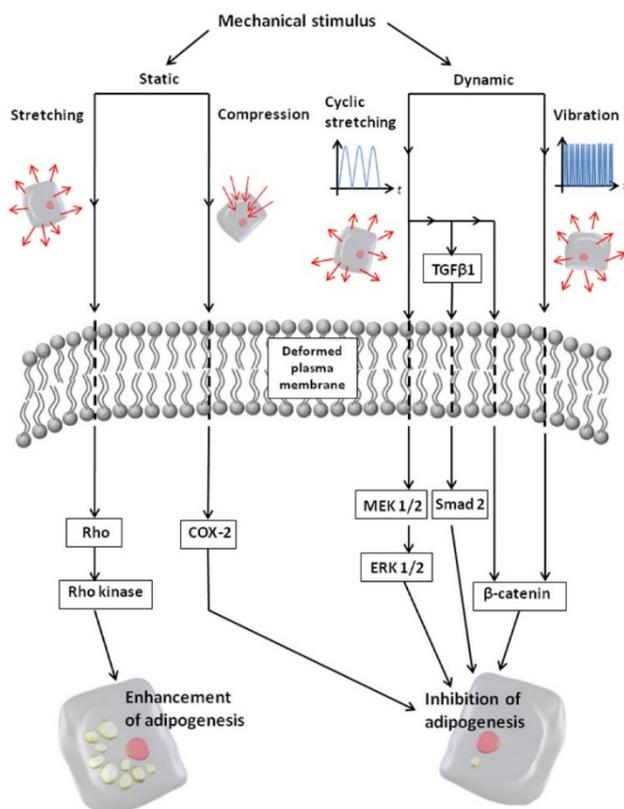
Model	Mechanical loading	Adipogenesis	Reference
C3H.B6-GT congenic mouse strain C57BL/6j mice	15 min per day, 90 Hz, 0.2 g peak acceleration, 9 weeks 15 min per day, 90 Hz, 0.2 g peak acceleration, 6 or 15 weeks 15 min per day, 90 Hz, 0.2 g peak acceleration, 6 or 14 weeks 15 min per day, 90 Hz, 0.2 g peak acceleration, 6 weeks	↓	Rubin et al., 2007 Luu et al., 2009 Ozcivici et al., 2010
Female 344 Fischer rats Blab/c nude mice	30 min per day, 30–50 Hz, 6 mm peak to peak, 5 day per week, 12 weeks. a static force of $1.64 \pm 0.26$ N, 4 weeks	↑	Maddalozzo et al., 2008 Kato et al., 2010

Model	Mechanical loading	Adipogenesis	Reference
Healthy women	A static 20 mmHg vacuum, 10 to 12 h a day, 10 week period	↑	Khouri et al., 2000
Young women with osteopenia	15 min per day, 90 Hz, 0.2 g peak acceleration, 5 day a weeks, 1 year	↓	Luu et al., 2009
Healthy women with cellulite	12 sessions, mechanical massage, thrice a week, 1 month		Monteux and Lafontan, 2008
Premenopausal healthy women	2 sessions per week, 30 min each, mechanical massage, 6 weeks.		Marques et al., 2011
Overweight/obese adults	30–60 s, 30–40 Hz, 10–22 times, 6 month		Visser et al., 2010

**Tableau 1 : Résumé des études expérimentales portant sur la mécanotransduction dans les cultures d'adipocytes et, les modèles animal et humain.** Extrait de (Shoham and Gefen, 2012b)

En bref, il apparaît que les étirements ou charges statiques semblent favoriser l'adipogenèse tandis que les étirements ou charges cycliques l'inhibent. Le message n'est cependant pas aussi tranché qu'il peut paraître, puisque l'effet de ces forces mécaniques sur le destin cellulaire dépend aussi du moment dans la séquence de différenciation où elles sont appliquées. Par exemple, une force de compression de 226 Pa appliquée pendant 12 h avant l'induction adipogénique à une lignée cellulaire pré-adipocytaire humaine inhibe l'adipogenèse. Alors que cette même force de compression immédiatement après l'induction adipogénique n'a pas affecté l'adipogenèse (Hossain et al., 2010). Malgré tout, sur la base de tous ces résultats, Gefen et coll. sont parvenus à une proposition de description mécanistique moléculaire résumée dans la Figure 1.10 extraite de (Shoham and Gefen, 2012b).



**Figure 1.10 : Représentation schématique des différentes voies de signalisation de la mécanotransduction potentiellement impliquées dans la régulation de l'adipogenèse en fonction du stimulus mécanique.**

Une autre voie attractive explorée par le groupe de Gefen est celui du rôle de la mécanosensation sur l'adipogenèse de pré-adipocytes. Comme mentionné à la section précédente, lorsque des ASCs sont cultivées sur des gels qui imitent la rigidité naturelle du tissu adipeux (~2 kPa), les marqueurs adipogéniques sont up-régulés, même en l'absence de facteurs de croissance adipogènes exogènes. En revanche, lorsque la rigidité du substrat augmente, les cellules s'étalent davantage et échouent à se différencier (Young et al., 2013). Gefen et coll. proposent que l'apparition de gouttelettes lipidiques rend les pré-adipocytes en cours de différenciation plus rigides localement, au niveau des gouttelettes lipidiques, comme ils l'ont démontré par AFM (Shoham et al., 2014). Leur hypothèse, supportée par des simulations, est que l'augmentation de cette rigidité structurelle impacte la déformation des cellules voisines et peut accélérer la production de gouttelettes lipidiques (Ben-Or Frank et al., 2015). Il existerait donc une boucle de rétroaction positive qui accélérerait la différenciation entamée (Shoham et al., 2015). Mais, dans ce cas, ce serait une proximité de « matériau » rigide qui favoriserait la différenciation.

### 1.4 Cultures cellulaires tridimensionnelles

Historiquement, la culture cellulaire a été réalisée en utilisant une monoculture bidimensionnelle qui se développe sur une surface en plastique dans un milieu de culture liquide. Au cours des dernières décennies, on a principalement utilisé des lignées cellulaires cancéreuses immortalisées, utiles pour étudier des mécanismes de biologie cellulaire ou des réponses à des traitements médicamenteux par exemple, mais ces cultures 2D sur boîte de plastique sont éloignées des conditions physiologiques ou pathologiques de leur tissu d'origine. Comme elles ne parviennent pas à récapituler l'architecture des tissus vivants, elles peuvent fausser la réponse cellulaire aux signaux externes ou intégrés à la cellule (Cukierman, 2001). Elles ont aussi souvent une faible capacité de prédiction de l'efficacité des médicaments *in vivo* (Longati et al., 2013). Dans ce contexte, les xénogreffes, obtenues par implantation directe de fragments de tissus tumoraux chez des souris restent des outils précieux pour évaluer les nouvelles stratégies thérapeutiques et les biomarqueurs en oncologie. Mais, du point de vue de l'éthique, il y a une forte tendance actuelle qui vise à réduire les essais sur les animaux, dans le cadre de la règle des 3R (Replace, Reduce, Refine) (<https://eurlex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>).

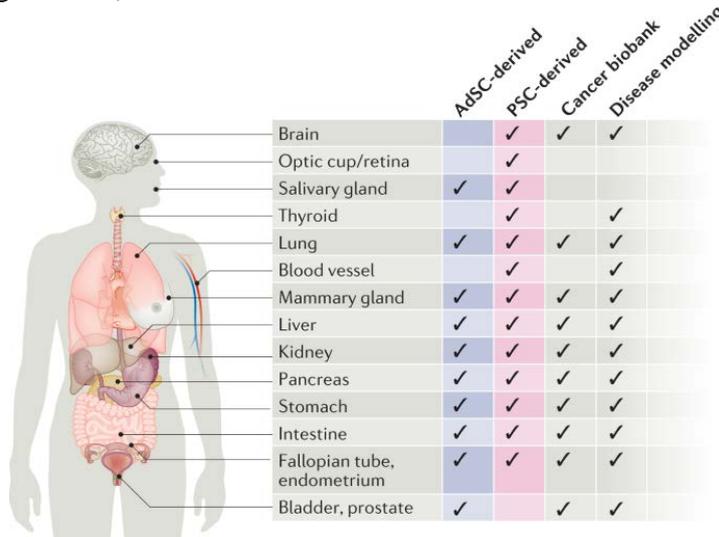
Il a donc un consensus pour créer des cultures cellulaires *in vitro* à 3D, de manière à respecter la règle des 3R tout en s'approchant de systèmes plus patho-/physio-logiques par la reconstitution de l'architecture 2D d'un tissu. Les deux grandes familles de cultures cellulaires correspondant à des agrégats multicellulaires 3D sont les sphéroïdes et les organoïdes. Nous souhaitons ici donner une définition précise de ces deux termes car de nombreux articles entretiennent une confusion basée sur le fait que les organoïdes sont beaucoup plus à la mode que les sphéroïdes. En effet, les organoïdes ont été élus « Méthode de l'année » par Nature Methods en 2017.

#### 1.4.1 Définitions : distinction entre sphéroïde et organoïde

Les sphéroïdes sont des agrégats multicellulaires composées de cellules issues de lignées

immortalisées. Ils ont été préparés, décrits et utilisés pour la première fois dans les années 1970 par R. Sutherland (Sutherland et al., 1970). Ils ont rapidement été considérés comme un bon modèle *in vitro* de tumeur (Sutherland, 1988), même si leur utilisation dans les laboratoires de biologie notamment a été très confidentielle pendant de nombreuses années, du fait, entre autres, de la difficulté de les préparer (voir Section 1.4.3) et de faire de l'imagerie à 3D avec une résolution cellulaire ou mieux (Pampaloni et al., 2007).

Les organoïdes, selon la définition couramment diffusée (dans Wikipedia par exemple), sont une version miniaturisée et simplifiée d'un organe produit *in vitro* 3D. Ils sont dérivés d'une ou de quelques cellules souches, progénitrices ou issues de fragments d'un tissu, qui peuvent s'auto-organiser dans une culture 3D, et sont capables de récapituler une fonction spécifique de l'organe (par exemple, contraction, activité neuronale, sécrétion endocrine, filtration, excrétion). Même si H. Clevers a introduit et popularisé le terme il y a un peu plus d'une dizaine d'années seulement, depuis la publication du premier « mini-gut » (Sato et al., 2009), il existe tout un historique des organoïdes, notamment avec les travaux précurseurs de M. Steinberg sur la DAH (Differential Adhesion Hypothesis) et l'auto-organisation cellulaire (Locke, 1964) ou de M. Bissell, qui montra que les cellules épithéliales du sein s'organisent en canaux et en ductules 3D lorsqu'ils lorsqu'elles sont cultivées sur un extrait d'ECM de tumeur (l'ancêtre du Matrigel) et sécrétant des protéines du lait (Aggeler et al., 1988; Li et al., 1987; Lo et al., 2012). Nous renvoyons ici à deux revues présentant une perspective historique des organoïdes (Kretzschmar and Clevers, 2016; Lancaster and Knoblich, 2014). Depuis 2009, de nombreux types d'organoïdes, « à la façon Clevers » ont été rapportés (Kretzschmar and Clevers, 2016) allant jusqu'à des « mini-brains » (Antonica et al., 2012; Eiraku et al., 2011; Lancaster et al., 2013; Sato et al., 2009) ou des organoïdes de voies respiratoires humaines (Elbadawi and Efferth, 2020; Zhou et al., 2020) ou d'autres organes (Simoneau and Ott, 2020) pour modéliser SARS-CoV-2. De manière générale, outre ce qu'ils peuvent apporter pour modéliser le développement (Kretzschmar and Clevers, 2016 ; (Huch and Koo, 2015; Kretzschmar and Clevers, 2016), les organoïdes ont aussi des applications en médecine (J. Kim et al., 2020; Rookmaaker et al., 2015) et pour modéliser des maladies telles que le cancer (Tuveson and Clevers, 2019) (Figure 1.11).

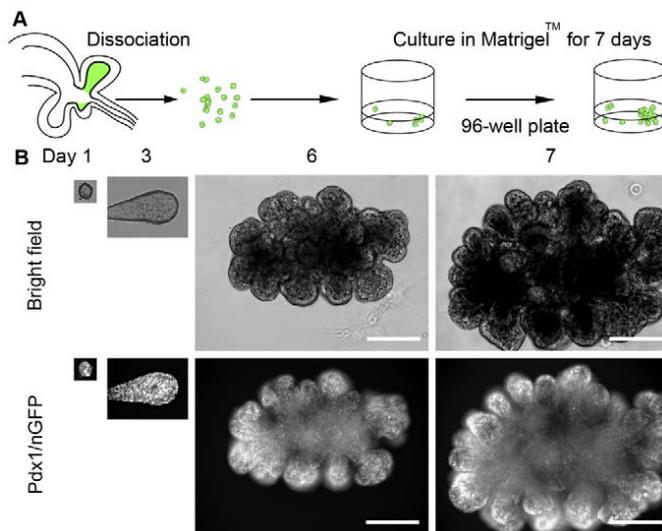


	AdSC-derived	PSC-derived	Cancer biobank	Disease modelling
Brain		✓	✓	✓
Optic cup/retina		✓		
Salivary gland	✓	✓		
Thyroid		✓		
Lung	✓	✓	✓	✓
Blood vessel		✓		✓
Mammary gland	✓	✓	✓	✓
Liver	✓	✓	✓	✓
Kidney	✓	✓	✓	✓
Pancreas	✓	✓	✓	✓
Stomach	✓	✓	✓	✓
Intestine	✓	✓	✓	✓
Fallopian tube, endometrium	✓	✓	✓	✓
Bladder, prostate	✓		✓	✓

Figure 1.11: Systèmes organoïdes humains associés au tissu d'origine. Extrait de (J. Kim et al., 2020)

### 1.4.2 Méthodes de préparation d'organoïdes « à la Clevers »

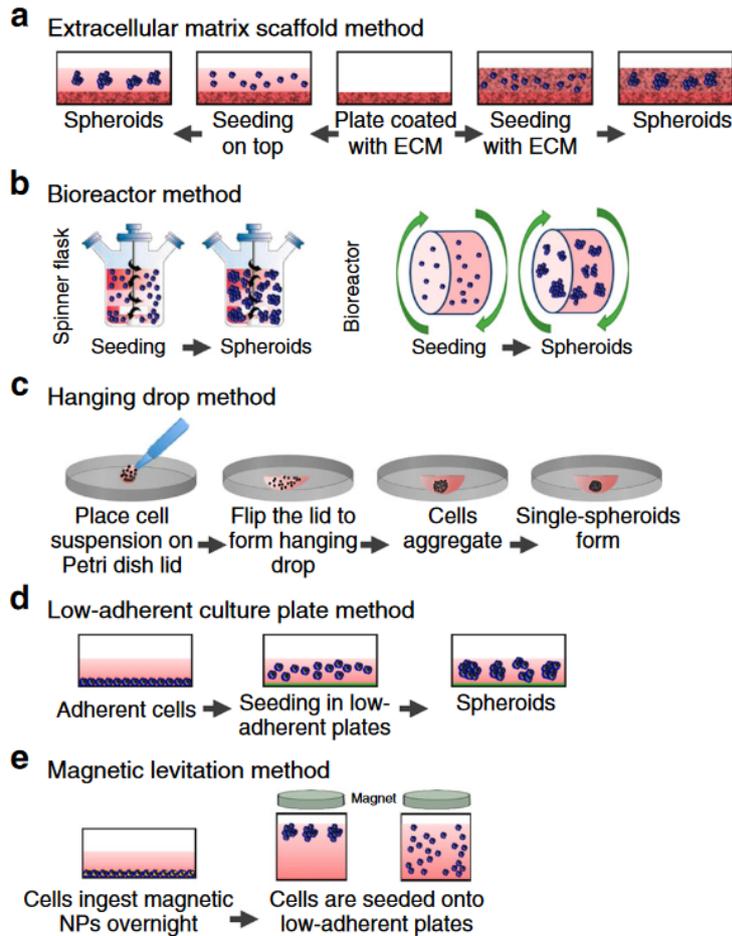
La procédure est très simple en apparence puisqu'il suffit de disperser des cellules de tissus dans une matrice de Matrigel (déplétée de facteurs de croissance) et de laisser les cellules souches ou progénitrices s'auto-organiser ou se différencier (Figure 1.12) pour le cas d'organoïdes pancréatiques). Ce qui n'apparaît pas ici est le choix des milieux de culture au cours des différentes étapes du protocole. Leur composition est la clé de la bonne formation d'organoïdes. Cela nécessite parfois l'utilisation de milieux conditionnés ou de milieux préparés sur mesure et organe-spécifiques (Pleguezuelos-Manzano et al., 2020).



**Figure 1.12 : Culture d'organoïdes. Cas du pancréas.** (A) Dissociation du tissu d'intérêt et ensemencement des progéniteurs E10.5 à faible densité dans du Matrigel appauvri en facteurs de croissance. (B) Images en contraste de phase et fluorescence (GFP) de l'évolution temporelle de l'expansion d'un petit amas à un organoïde ramifié de ~10 000 cellules dans un milieu d'organogénèse. Barres d'échelle : 200 µm (Greggio et al., 2013)

### 1.4.3 Méthodes de préparation de sphéroïdes

La Figure 1.13 récapitule les grandes familles de méthodes standard de préparation de sphéroïdes



**Figure 1.13: Récapitulatif des différentes méthodes de formation de sphéroïdes.** (A) suspension statique; (B) méthode de la goutte suspendue; (C) bioreacteur spinneur; (D) bioréacteur rotateur; (E) lévitation magnétique; (F) système microfluidique; et (G) inclusion dans un gel. (H) Image d'un sphéroïde tumorale en contraste de phase (scale bar, 100µm). Extrait de (Velasco et al., 2020)

### -Formation dans un gel

Ce procédé est très similaire à celui utilisé pour la fabrication d'organoïde. Il est basé sur l'ensemencement de cellules au sein de gels de polymères qui servent de support à la croissance cellulaire (Figure 1.13A). Ces gels miment l'ECM native des cellules. Ce procédé est simple à mettre en place pour des sphéroïdes mais ne permet pas de contrôler la taille et le nombre de sphéroïdes

### - Culture en suspension par rotation ou agitation dans un bioréacteur

Le principe consiste ici, en agitant les cellules, à augmenter leur probabilité de contact et donc à favoriser la formation d'agrégats (Figure 1.13B). L'agitation permet aussi de mieux uniformiser la concentration des divers nutriments et de l'oxygène. En revanche, la taille des agrégats produits reste souvent hétérogène et le suivi individuel des sphéroïdes est impossible. (Qian et al., 2018; Rodday et al., 2011)

### - Goutte pendante

Cette technique consiste à i) déposer des gouttes de suspensions cellulaires sur la face intérieure du couvercle d'une boîte de pétri ii) retourner le couvercle et le reposer sur la boîte de pétri (Kelm et al., 2003; Ohnuki and Kurosawa, 2013; Tung et al., 2011) (Figure 1.13C). Ainsi, par effet de la gravité, les cellules se regroupent et s'agrègent à l'apex de la goutte au niveau de l'interface liquide-air. C'est une méthode encore couramment utilisée, robuste, mais qui ne

permet pas de produire beaucoup de sphéroïdes à la fois.

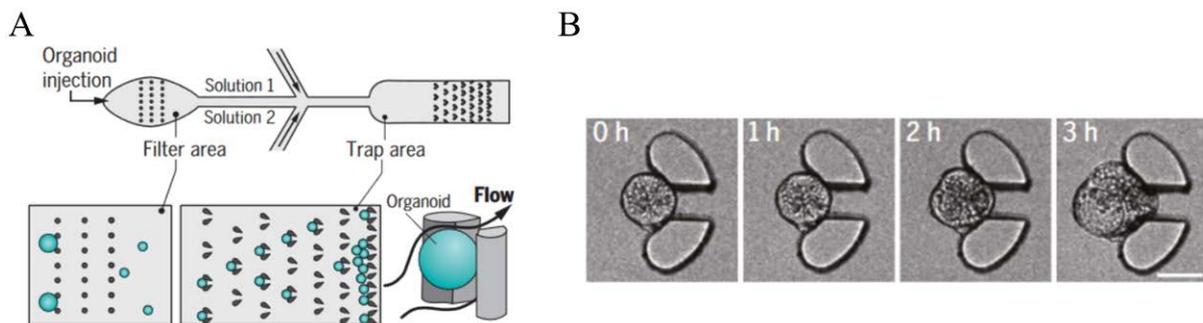
### -Coussin anti-adhésif ou plaque à faible attachement (« low attachment plate »)

Le principe ici est d'empêcher les cellules d'adhérer à la surface de la boîte de pétri et de les forcer ainsi à s'agréger. Elle a commencé à être développée dès 1969 (Costăchel et al., 1969), avant même les premières expériences de Sutherland. En pratique, on utilise généralement des puits coniques ou en U recouverts d'agarose (Gong et al., 2015; Li et al., 2021) ou d'autres polymères physisorbés (Lemmo et al., 2014). Cette technique est simple à mettre en oeuvre et reproductible. Mais, encore une fois, le nombre de sphéroïdes produit est relativement faible, typiquement moins d'une centaine (si on utilise une plaque de 96 puits).

### -Lévitation magnétique

L'emploi de particules et de champs magnétiques est utilisée ici (Perez et al., 2021; Souza et al., 2010) (Figure 1.13E). La suspension cellulaire est mélangée 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. On obtient donc des sphéroïdes « hybrides » chargés de nanoparticules magnétiques peuvent être toxiques pour les cellules.

Depuis l'avènement de la microfabrication (lithographie molle notamment), différentes méthodes de préparation de sphéroïdes reposant sur des dispositifs microfluidiques ont également été développés. Nous ne pouvons pas en faire un rapport exhaustif. Nous nous limitons à quelques références (Chen et al., 2015; Fu et al., 2014; Hsiao et al., 2009; K. Lee et al., 2012; Ong et al., 2008; Ota and Miki, 2011; Sabhachandani et al., 2018; Sart et al., 2017; Zhou et al., 2017), et la Figure 1.14 illustre un exemple.



**Figure 1.14 : Réseau microfluidique de piliers et « pièges » pour la formation d'organoïdes de taille contrôlée.** (A) Schéma du réseau microfluidique. (B) Image en lumière blanche de la croissance d'un organoïde. Barre d'échelle, 100  $\mu\text{m}$ . Extrait de (Jin et al., 2014)

Ces dispositifs en Polydiméthylsiloxane (PDMS), qui permettent un contrôle spatial des fluides dans des canaux de taille micrométrique, permettent la production d'une centaine de sphéroïdes en parallèle et offrent la possibilité d'un suivi individuel par microscopie. Cependant, ils nécessitent la mise en place de méthodes de perfusion pas toujours évidentes à mettre en place. Nous allons plutôt détailler davantage les techniques dites d'encapsulation cellulaire, qui sera notre méthode de choix au cours de ce travail de thèse.

### **-Technologie de capsules cellulaires**

Le principe est d'encapsuler des cellules dans un espace clos. Ces cellules sont donc maintenues à proximité, facilitant ainsi la formation d'un agrégat cellulaire. Il faut aussi que ce compartiment soit perméable aux nutriments et facteurs de croissance contenus dans le milieu de culture environnant pour permettre la prolifération et le développement normal des cellules. On choisit donc un gel polymère, qui a la particularité d'être sous forme liquide dans le dispositif microfluidique d'encapsulation et de réticuler sous l'action d'un stimulus externe. Dans cette section, la plupart des références données concernent des gels d'alginate, qui sont ceux que nous avons utilisés. A la section suivante, nous nous intéresserons à d'autres types de gels.

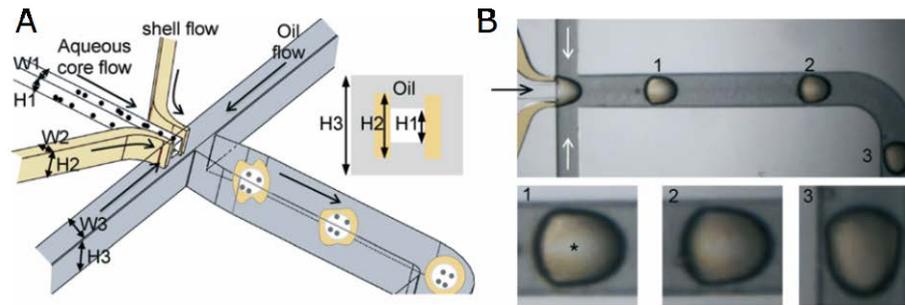
On distingue deux types d'encapsulation : les encapsulations de cellules dans des sphères creuses ou coques d'hydrogel (que l'on appellera « capsules » dans le reste du manuscrit) et celles dans des sphères pleines ou billes d'hydrogel (qui ont été souvent appelées abusivement capsules par le passé).

- Il est très facile de fabriquer des billes de gel. On trouve même des tutoriels sur internet. Ici, les cellules sont alors directement au contact de l'hydrogel, ce qui signifie qu'elles sont avant même la formation d'un agrégat multicellulaire, sous contrainte. Toutefois, de nombreux travaux ont été réalisés par cette méthode (Koch et al., 2003; Lee et al., 2021; Uludag et al., 2000). Elle permet de préparer des cultures 3D à haut débit (Lee et al., 2021), d'encapsuler des cellules souches adipeuses (Williams et al., 2013) de tenter de fabriquer des foies artificiels (Pasqua et al., 2020), du cartilage (Xu et al., 2014)

-Dans le cas de la capsule creuse, les cellules ont un espace fini qui leur permettent de s'auto-organiser et proliférer librement jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence.

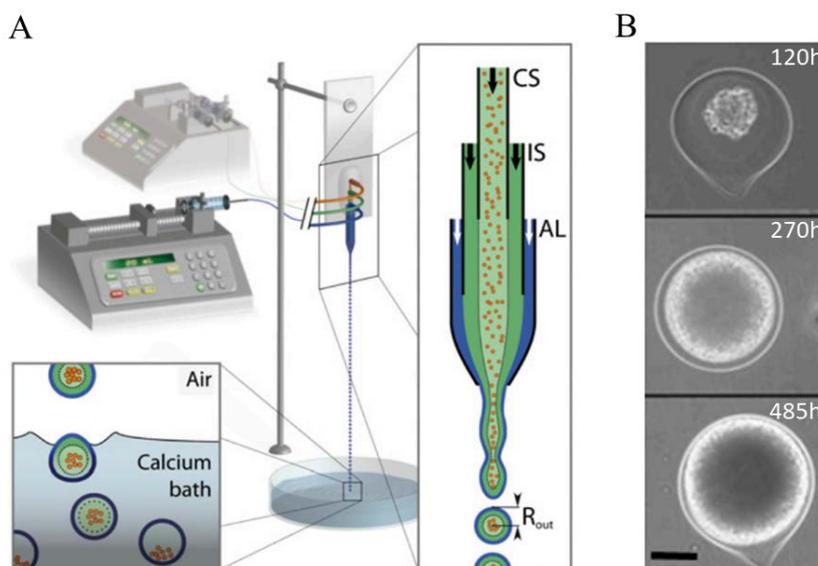
En plus de notre équipe d'accueil (Alessandri et al., 2013), deux autres groupes ont développé simultanément (2013) et indépendamment une méthode d'encapsulation de cellules dans des capsules d'alginate. Ces approches, bien que similaires, présentent quelques différences qui leur confèrent certains avantages et inconvénients.

\* Le groupe de Xiaoming He a utilisé un circuit de microfluidique en PDMS (Agarwal et al., 2013, 2015; H. Huang et al., 2017), qui reproduit la co-imbrication des flux dans un plan. Un des flux est composé d'huile minérale complétement avec du chlorure de calcium. Ce flux permet de réticuler la coque d'alginate et empêcher leur coalescence (Figure 1.15). Cette méthode est immersive : la formation des capsules a lieu entièrement dans la puce microfluidique. Elle permet de produire des capsules sphériques de taille uniforme, ce qui est favorable pour des expériences de criblage à haut-débit. Les capsules sont ensuite séparées de l'huile par centrifugation, puis placées dans un milieu de culture. Sur la base de ce développement, le groupe de X. He a conduit de nombreux travaux sur la cryopréservation de biospecimens encapsulés (Huang et al., 2021; Zhao et al., 2017), l'encapsulation de cellules pluripotentes (Agarwal et al., 2013) ou de follicules ovariens (He, 2017).



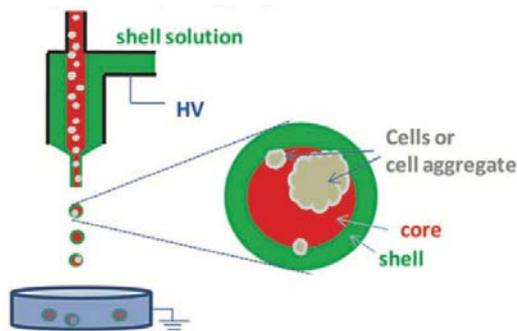
**Figure 1.15 : Formation de capsules cellulaires dans l'huile.** (A). Schéma du design microfluidique : l'alginate en jaune, l'huile minérale chargée en calcium en gris. (B) Image montrant la formation de capsules marquées à l'aide de dextrane jaune. Extrait de (Agarwal et al., 2013).

\* Le deuxième procédé consiste à générer, à partir d'un jet composite de cellules et d'alginate, des gouttelettes composites qui se forment dans l'air par instabilité de Plateau-Rayleigh (Bremond et al., 2010), pour ensuite réticuler dans un bain de calcium (Figure 1.16A). Notre groupe a réalisé en 2013 un système constitué de plusieurs capillaires de verre cylindriques, imbriqués et collés, ce qui nécessitait un grand savoir-faire expérimental (Alessandri, 2013; Alessandri et al., 2013). Ce dispositif a une structure coextrudée, dont le rayon de sortie fixe le diamètre moyen des capsules produites. Il permet de générer des capsules creuses de ~200 microns de diamètre. Certains développements techniques que je détaillerai dans le Chapitre 2 ont été apportés par rapport au dispositif initial. En présence de cellules (Figure 1.16B), elles s'agrègent (si elles sont adhésives) et peuvent proliférer car le gel a une taille de pore de l'ordre de 20 nm, ce qui permet à toutes les protéines des milieux de culture d'y diffuser à travers. L'agrégat cellulaire finira par atteindre ce qu'on appelle la confluence à 3D. Au-delà de la confluence, l'agrégat déforme la capsule qui est élastique (Alessandri et al., 2013), éventuellement jusqu'à rupture de la coque si celle-ci est fine.



**Figure 1.16 : Encapsulation cellulaire par instabilité de Rayleigh dans l'air** (A) Schéma du système d'encapsulation avec : CS : Suspension cellulaire. IS : Solution intermédiaire. AL : Solution d'alginate. (B) Images en champ clair de cellules encapsulées à différents temps. Adapté de (Alessandri et al., 2013).

L'équipe de Mingling Ma à Cornell (Ma et al., 2013) a développé un système d'encapsulation très similaire. Ils ont été les premiers 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 (Figure 1.17). Le groupe de M. MA a ensuite exploité cette technologie en oncologie (Streichan et al., 2014) ou pour encapsuler des îlots de Langherans (Ernst et al., 2018).



**Figure 1.17 : Schéma de fonctionnement d'une variante du dispositif d'encapsulation avec champ électrique.**  
Extrait de (Lu et al., 2015)

Nous reviendrons sur les caractéristiques de cette technologie. Brièvement, elle offre une coque protectrice aux cellules, permet une production homogène de capsules de taille contrôlée et le débit de production est très élevé (environ 5000 capsules/par seconde).

## 1.5 Echaffaudages (« scaffolds ») et hydrogels pour la culture cellulaire

En ingénierie tissulaire, il existe des méthodes de cultures avec ou sans « scaffold ». Les scaffolds peuvent être des céramiques ou matériaux durs (pour l'ingénierie osseuse par exemple), mais le plus souvent, ce sont des hydrogels polymères. Les hydrogels peuvent absorber jusqu'à plusieurs milliers de fois leur masse sèche en eau, et ne contiennent au maximum que quelques pourcents de polymères. Ils peuvent être stables chimiquement ou dégradables sous l'action de stimuli ou de protéases sécrétées par les cellules. L'ensemencement des cellules dans le scaffold ne permet pas l'auto-organisation des cellules, mais leurs propriétés mécaniques et de fonctionnalisation chimique pour améliorer l'adhésion des cellules ou le maintien de la pluripotence des cellules souches peuvent être contrôlées. Enfin, dans les techniques d'encapsulation mentionnées précédemment, les hydrogels peuvent servir de micro-compartiment perméable pour faire croître des sphéroïdes ou organoïdes. Il existe plusieurs façons de classer les hydrogels. On peut par exemple distinguer les polymères synthétiques et les polymères naturels. On peut aussi les trier selon le mode de réticulation: (i) les hydrogels chimiques et (ii) les hydrogels physiques. Dans (i), le réseau de liaisons chimiques reliant les différentes chaînes peut être obtenu par réticulation de polymères en solution, tandis que dans (ii), la structure est obtenue par des interactions ioniques, hydrogènes et/ou des interactions dipolaires. Nous évoquerons aussi les hydrogels hybrides combinant une réticulation chimique et physique. Entre autres revues sur le domaine des hydrogels pour la culture cellulaire, nous pouvons mentionner (Caliari and Burdick, 2016; Chen et al., 2019; G. Huang et al., 2017).

### 1.5.1 Hydrogels physiques

Il existe un grand nombre d'hydrogels commerciaux, tels que les pluronics, l'agarose, les

polysaccharides (alginate, acide hyaluronique, amidon, cellulose), les gels à base de protéines (soie, kératine, fibrine, collagène) (Kaczmarek et al., 2020; Karoyo and Wilson, 2021). Nous décrivons ici deux exemples d'intérêt : l'alginate, polymère naturel réticulant par interactions ioniques avec des cations, et le pluronic, polymère de synthèse sensible à la température.

### - Alginate

L'alginate est extrait de l'acide alginique, liquide visqueux contenu dans la paroi des cellules des algues brunes. C'est un polysaccharide largement utilisé pour sa biocompatibilité, son faible coût et son pouvoir gélifiant et viscosifiant (une solution d'alginate à 2% m/v a une viscosité 5000 fois supérieure à celle de l'eau pure). Au niveau de sa structure chimique, il est composé de deux monomères, l'acide Mannuronique (M) et l'acide Guluronique (G). Ces monomères sont disposés par blocs le long de la chaîne du polymère, formant des régions homopolymères (blocs M ou blocs G) ou hétéropolymères (par exemple, MMG, GGM, GMG) (Figure 1.18) Les réticulations ioniques de l'alginate sont formées en utilisant des cations divalents tels que le calcium, le magnésium ou le baryum pour favoriser la formation de ponts ioniques entre les unités G de l'alginate (Augst et al., 2006; Draget et al., 2002; Morch, 2008). Il est possible de dissoudre un gel d'alginate en utilisant des agents chélatants (EDTA, EGTA) ou une solution saline tamponnée au phosphate (PBS), les ions calcium sont alors échangés avec les ions sodium en excès (Bajpai and Sharma, 2004; Kikuchi et al., 1997; Wu et al., 2010).

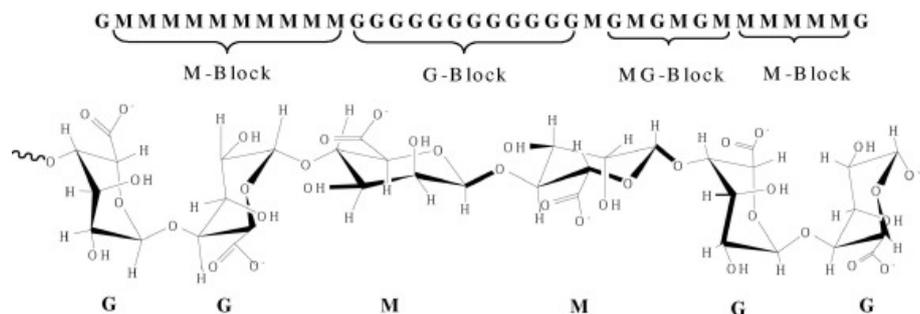
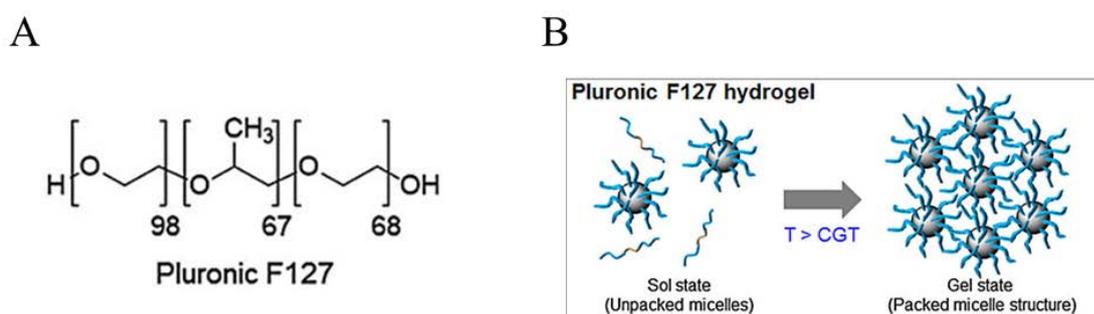


Figure 1.18 : Structure chimique de l'alginate. Extrait de (Fertah et al., 2017)

Une autre caractéristique importante des gels d'alginate est leur porosité, donc leur perméabilité aux espèces moléculaires. En général, les gels sont formés à partir de solutions d'alginate à 0,5 à 5 % en poids. Ils sont transparents à la lumière visible. La structure du gel dite « en « boîte d'œufs » (Morch, 2008) se traduit cependant par le fait que, contrairement à un gel de polymère synthétique, la taille de maille est faiblement dépendante de la concentration en alginate et en agent ionique de réticulation. Cela est bien expliqué par D. Mooney qui montre que les propriétés de transports demeurent inchangées alors que la rigidité du gel peut être augmentée (Vining and Mooney, 2017). Pour des concentrations en alginate utilisées couramment, la taille de pore est typiquement comprise entre 10 et 20 nm, compatible avec le fait que des polymères ou protéines globulaires peuvent diffuser librement à travers les réseaux d'alginate jusqu'à un poids moléculaire de 150 kDa (Erickson, 2009; Tanaka et al., 1984).

### -Pluronic

Les poloxamères sont des copolymères triblocs constitués de blocs d'oxyde d'éthylène de part et d'autre d'un bloc d'oxyde de propylène Figure 1.19A. Les plus utilisés en ingénierie tissulaire sont ceux qui ont le nom commercial de Pluronic®, et plus spécifiquement le pluronic F127. Leur nature amphiphile leur permet de s'assembler sous forme de micelles en milieu aqueux (au-dessus de la concentration micellaire critique, cmc). Via un mécanisme d'interactions micellaires, ils présentent une transition sol-gel au-dessus d'une LCST (Lower critical solution temperature) (Figure 1.19B). Par exemple, une solution de pluronic à 15 % devient liquide à une température de 4-5 °C et forme un gel à température ambiante (Dou et al., 2016). D'autre part, De nombreuses études montrent l'absence de toxicité de ces macromolécules vis-à-vis du vivant (Declercq et al., 2011), ce qui en fait un candidat de choix pour la bioimpression par exemple (Suntornnond et al., 2017).



**Figure 1.19 : Réticulation physique d'un gel thermosensible.** Cas du Pluronic F-127. (A) Structure chimique du Pluronic F-127. (B) Illustration schématique de la réticulation du Pluronic F-127 pour une température supérieure à la température critique de gélification. Extrait de (Jung et al., 2017)

### 1.5.2 Hydrogels chimiques

Les hydrogels chimiques sont constitués de chaînes polymères liées entre elles par des liaisons covalentes. Leur formation nécessite au moins l'ajout d'un agent réticulant. Entre autres exemples, le PVA (Alcool polyvinylique) (Sonker et al., 2018), le PAA (Poly(acide acrylique)) et pHEMA (Poly(2-hydroxyéthyle méthacrylate) seulement pour les cultures 2D (Caliari and Burdick, 2016; Minett et al., 1984), PEGDA (poly(éthylène glycol) diacrylate) (Chan et al., 2010; McAvoy et al., 2018; Wang et al., 2011), le PEG-4Mal (Polyéthylène glycole maléimide à 4 bras) (Cruz-Acuña et al., 2018; Fattahi et al., 2021). Nous allons ici plus particulièrement nous intéresser au PEGDA réticulant sous l'effet de la lumière.

La réaction de polymérisation est une réaction radicalaire. Un photo-initiateur sous irradiation UV donne un radical libre qui réagit avec la double liaison terminale du PEGDA (Figure 1.20). L'irgacure I2959 est beaucoup utilisé, mais le lithium phenyl (2,4,6-triméthylbenzoyl) phosphinate (LAP) est plus réactif donc nécessite une irradiation moins longue (Fairbanks et al., 2009). De ce fait, la survie des cellules est souvent meilleure.

### -Polyéthylène glycole diacrylate

La porosité des hydrogels de PEGDA varie de 3nm pour  $M_w = 700$  Da à 20 nm pour  $M_w = 10000$  Da (Chan et al., 2010). De ce fait, le PEGDA n'est pas idéal pour la culture cellulaire car la

diffusion des nutriments et hormones de croissance est au moins partiellement restreinte.

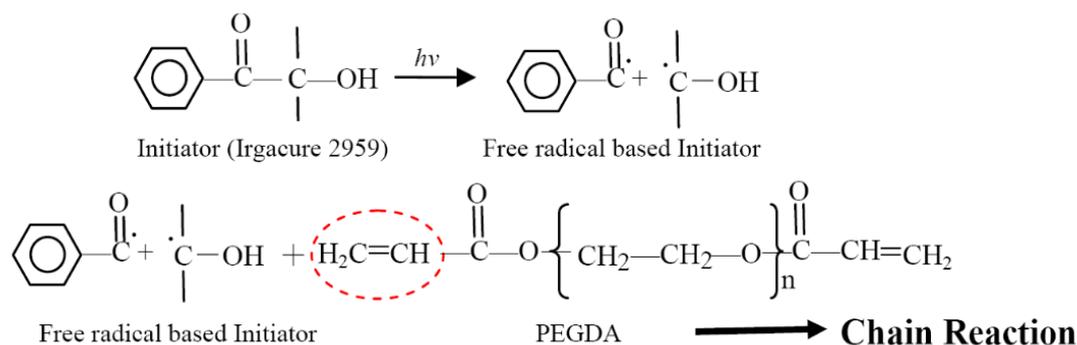


Figure 1.20 : Réticulation chimique induite par la lumière. Cas du PEGDA. Extrait de (Wang et al., 2011).

### 1.5.3 Hydrogels hybrides

Les hydrogels hybrides combinent la réticulation physique et chimique. Il y a entre autres, la Gélatine Méthacrylate (GelMA) (Tamayol et al., 2015; Van Den Bulcke et al., 2000; Xiao et al., 2019), l'Alginate Méthacrylate (AlgMA) (Jeon et al., 2009), l'Alcool Polyvinylique Méthacrylate (PVA-MA) (Cavaliere et al., 2004). Nous allons plus particulièrement nous intéresser à la GelMA et l'AlgMA.

#### - Gélatine méthacrylate

Le GelMA est synthétisé par réaction de la gélatine avec l'anhydride méthacrylique. Une partie des groupes amines présents dans la gélatine sont remplacés par des groupes méthacrylate qui confèrent à la gélatine la possibilité de réticuler par réaction radicalaire en présence de photo-initiateurs et d'une irradiation UV (Figure 1.21). Le GelMA conserve les propriétés de la gélatine : 1/ une transition sol-gel en fonction de la température (liquide pour une température  $T > 35^\circ\text{C}$  et gel pour  $T < 35^\circ\text{C}$ ) et 2/ la présence de motifs acides aminés fonctionnels (e.g. les motifs RGD) permettant aux cellules d'y adhérer.

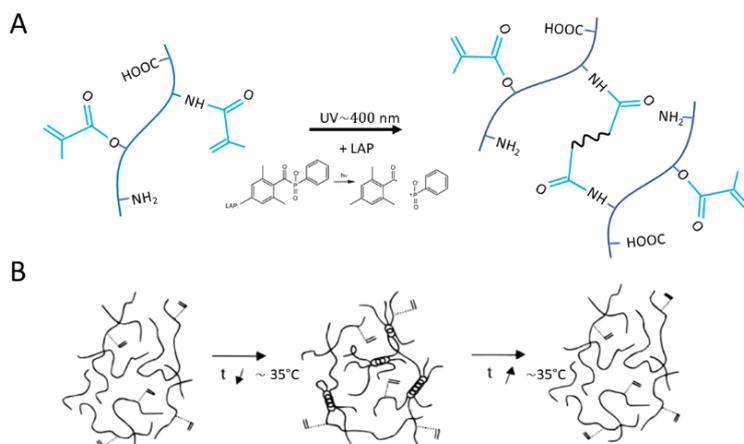


Figure 1.21 : Réticulation du GelMA. (A) Photo-réticulation des groupes méthacrylate, en présence de photo initiateur (LAP) et d'une irradiation UV (~400 nm). (B) Réticulation réversible du GelMA à une température inférieure à  $\sim 35^\circ\text{C}$ . Extrait de (Van Den Bulcke et al., 2000).

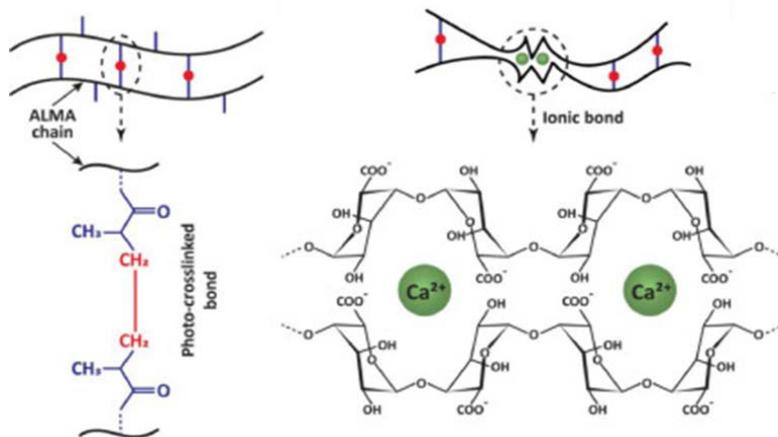
La rigidité de la GelMA dépend de sa concentration, de son degré de fonctionnalisation et du temps d'irradiation. Les rapports de mesure d'élasticité sont parfois contradictoires, mais

varient typiquement entre 1 kPa et 100 kPa (Wu et al., 2019). Les tailles de pores des gels de GelMA sont souvent mesurés par microscopie électronique à balayage et, malgré les artéfacts potentiels liés à la fixation, celles-ci varient entre quelques centaines de nanomètres et quelques dizaines de microns (Yoon et al., 2016). La GelMA peut être dégradé en présence de Collagénase de type 1 et 2 (Xiao et al., 2011).

Il est donc largement utilisé pour diverses applications biomédicales (Annabi et al., 2014) et en bio-impression (Pi et al., 2018) en raison de ses propriétés biologiques appropriées et de ses caractéristiques physiques ajustables.

### - Alginate méthacrylate

L'alginate méthacrylate (AlgMA) est synthétisé par modification chimique de ses groupes carboxyle ou hydroxyle en groupes méthacrylates. Le degré de fonctionnalisation en méthacrylate dépasse rarement 40% (Jeon et al., 2009). Comme pour la GelMA, l'AlgMA peut réticuler en présence de photo-initiateur et d'une irradiation UV. Il peut également réticuler en présence d'ions divalents (Figure 1.22).



**Figure 1.22: Réticulation de l'AlgMA.** (A) Photo-réticulation de l'AlgMA en présence de photo-initiateur et d'une irradiation UV. (B) Réticulation ionique de l'AlgMA en présence d'ions divalents. Extrait de (Tamayol et al., 2015)

Par photo-réticulation, il est possible de faire varier son module d'Young de 13kPa à 74kPa avec respectivement 0,5% et 1,5% de photo-initiateur (H. H et al., 2019). A la différence de la réticulation ionique, la photo-réticulation n'est pas réversible. En revanche, il est possible de dégrader l'alginate, ainsi que l'AlgMA avec des alginate lyases (Zhu and Yin, 2015). Cet alginate modifié est donc plus stable que l'alginate. Cela permet, entre autre, de pouvoir utiliser l'AlgMA dans certaines conditions de culture ou d'imagerie, en présence d'agents chélatants (PBS, EDTA,...).

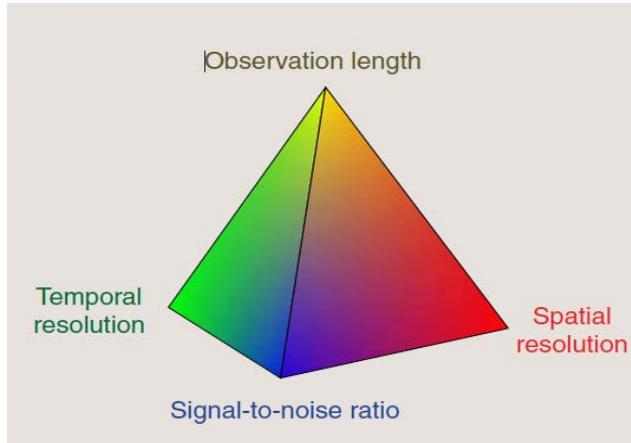
## 1.6 Contraintes liées à la microscopie d'objet biologique 3D.

Les échantillons biologiques en 3D peuvent atteindre plusieurs centaines de micromètres d'épaisseur. L'alternance de membranes lipidiques, milieux aqueux, agrégats protéiques génère autant d'interfaces qui diffusent la lumière et de molécules qui l'absorbent. Imager ces échantillons en profondeur est un défi pour la microscopie optique. D'autres contraintes propres aux échantillons biologiques vivants en général se posent également. Il faut par exemple minimiser le photoblanchiment et les photo-dommages. Ces deux phénomènes sont liés aux interactions lumière-matière. D'un côté, l'émission de fluorescence est un phénomène qui

dégrade et blanchi le fluorophore ; de l'autre, les arrachements d'électrons pour l'émission des photons de fluorescence produisent des radicaux libres (ROS : Reactive Oxygen Species) dont l'accumulation est toxique pour la cellule.

Ainsi, pour imager un échantillon épais 3D, marqué en fluorescence, il faut veiller à optimiser les principaux paramètres expérimentaux à chaque étape du processus. Tout d'abord, au niveau du marquage proprement dit, il faut veiller à ce que la sonde d'intérêt marque bien la structure visée, qu'elle soit brillante et spécifique (afin de limiter le marquage ectopique, source de bruit de fond). Ensuite, au niveau du processus d'excitation et d'émission, on veillera à utiliser des longueurs d'ondes les plus décalées dans le rouge possible, en prenant garde à rester dans les limites de détection des capteurs. Enfin, d'un point de vue des processus optiques mis en œuvre, il est nécessaire d'utiliser des approches qui permettent un «sectionnement optique de l'échantillon. Virtuellement, cela revient à découper optiquement et numériquement l'échantillon en tranches, d'une épaisseur connue, qui, mises les unes sur les autres, permettent de reconstituer une image 3D de l'échantillon observé. Ce paragraphe dresse un inventaire bref et non exhaustif de plusieurs techniques optiques permettant un tel sectionnement.

D'un point de vue pratique, quelle que soit la technique employée, l'expérimentateur peut ajuster plusieurs paramètres lors de l'acquisition. Ceux-ci ont une importance majeure à la fois les caractéristiques de l'image acquise et sur la préservation de l'échantillon. On présente souvent l'ajustement de ces paramètres comme un compromis à faire entre les quatre sommets d'une pyramide (Figure 1.23) : résolution temporelle, rapport signal sur bruit, longue durée d'acquisition et résolution spatiale (Keller, 2013).



**Figure 1.23: Représentation schématique de la pyramide des paramètres d'acquisition en bioimagerie.** Extrait de (Keller, 2013)

### 1.6.1 Microscopies « confocales »

La technique de sectionnement optique la plus répandue est communément appelée « microscopie confocale ». Par cet abus de langage, la convention est de désigner la technique de microscopie à balayage laser en ligne, en lumière visible (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM). Ceci est un abus de langage car le terme « confocal » est plus universel et regroupe toute technique qui permet de localiser le point source en 3D, et de replacer le signal qui en provient dans une matrice dimensionnelle pour reconstruire une image 3D de l'objet imagé. Le concept fut posé par Marvin Minsky et breveté en 1957 (Minsky, 1957), mais il fallut que soient développés les lasers dans les années 70 pour qu'il soit mis en œuvre techniquement.

Brièvement, il s'agit de balayer en ligne, et point par point, un laser sur l'échantillon dans le plan focal de l'objectif ; de collecter à chaque point l'ensemble des photons émis avec un détecteur unidimensionnel, un tube photomultiplicateur (PMT). Ces photons sont détectés quelle que soit leur couleur par le détecteur, ce qui nécessite de placer des dispositifs de séparation spectrale. Ce principe général peut être complexifié depuis l'excitation à la détection afin d'améliorer l'étendue des fluorophores utilisables, la rapidité de balayage, les propriétés optiques de focalisation ou la sensibilité des détecteurs.

Si l'on s'en tient là, on constate que sur le trajet optique du laser, les fluorophores sont excités de part et d'autre du point focal et émettent des photons, qui seront détectés par le détecteur, générant un flou assimilable à celui obtenu en microscopie en champ large. Pour éliminer ces photons non désirés, il faut considérer que s'ils suivent une trajectoire balistique, l'angle avec lequel ils pénètrent dans le système de détection est différent de celui des photons en provenance du point focal. L'astuce consiste alors à utiliser un sténopé (« pinhole ») pour bloquer les photons provenant des plans hors focus. Le prix à payer est que les fluorophores hors plan focal ont été blanchis sans que les photons émis n'aient été utilisés. De plus, la reconstruction de l'image point par point est assez lente, à la fois car il faut balayer physiquement le laser avec des miroirs motorisés, mais aussi parce le temps de résidence sur un point doit être suffisant pour qu'assez de photons soient émis.

Pour revue, le lecteur peut se référer à l'ouvrage de référence suivant : Handbook of Biological Confocal Microscopy (Pawley, 1995).

S'il on veut « accélérer » un CLSM, il faut acquérir plus d'une dimension à chaque itération, et par exemple, remplacer le PMT (1D) par une caméra (2D). L'utilisation de roues de Nipkow permet de paralléliser 1/ l'illumination de chemins optiques indépendants par des microlentilles et 2/ la détection filtrée spatialement par des sténopés. La vitesse de rotation de ces deux roues synchronisées (lentille et sténopé alignés) doit être prise en compte pour l'ajustement du temps d'exposition sur la caméra, et permettre que tous les secteurs de l'image soient scannés par les couples lentilles/sténopés (Gräf et al., 2005).

Cette technique, dite de « spinning disk microscopy » est très populaire pour l'imagerie d'échantillons vivants car le temps total d'illumination de l'échantillon est très réduit. Elle a longtemps été considérée comme ne permettant pas un accès à la profondeur aussi important que la CLSM. Cependant, l'utilisation de jeux de disques ajustables et de meilleures caméras en font une microscopie de choix, y compris pour l'acquisition sur échantillons fixés, compte tenu du gain de temps très important. Par exemple, avec un 40x à 0.8, un champ de 400  $\mu\text{m}$  en 512x512 imagé en CLSM à 400 Hz prend environ 1 seconde alors qu'il ne prendra que 50ms avec un « spinning disk ».

### 1.6.2 Microscopie multiphotonique

Les deux techniques précédentes présentent les mêmes inconvénients : 1/ exciter et blanchir inutilement des fluorophores hors plan focal, et 2/ utiliser la lumière visible pour l'excitation, dont la profondeur de pénétration dans les tissus est limitée à une centaine de micromètres.

La microscopie multiphotonique est une microscopie à balayage laser point par point, où la source est un laser infrarouge (IR) impulsif. Les photons IR émis par la source sont regroupés temporellement en petits paquets très énergétiques. Typiquement, les lasers utilisés

produisent des impulsions d'une centaine de femtosecondes à une fréquence de répétition de 80 MHz, avec puissance moyenne de l'ordre du Watt, mais qui atteint des valeurs de l'ordre du Térawatt en puissance crête. Individuellement, un photon IR ne peut pas exciter un fluorophore (par exemple une GFP) lors de son trajet dans le tissu. Cependant, au point focal, en plus d'être concentrés temporellement, les photons IR sont aussi concentrés spatialement. Il en résulte que la probabilité d'interaction simultanée de deux photons IR avec un fluorophore est non nulle exclusivement au point focal (Denk et al., 1990). Pour un fluorophore tel que la GFP, deux photons à 976 nm, d'énergie 1,28 eV se combinent pour apporter 2,56 eV (soit l'énergie portée par un photon à 488 nm) nécessaire à son excitation. Le corollaire de l'excitation localisée est que les photons de fluorescence émis à un instant ne peuvent provenir que du point excité, même si leur trajectoire n'est pas balistique et qu'ils ont diffusé dans le tissu. On peut alors se passer du sténopé et collecter autant que possible tous les photons émis pour revue, (Zipfel et al., 2003).

La microscopie multiphotonique est donc intrinsèquement « confocale ». De plus, les photons IR, moins énergétiques, ont une plus grande pénétration dans les tissus, ce qui permet d'accéder à des profondeurs allant jusqu'au millimètre (Centonze and White, 1998). La limite sera alors fixée par la distance de travail de l'objectif et la capacité du dispositif optique à collecter et détecter les photons émis, qui eux, sont généralement visibles.

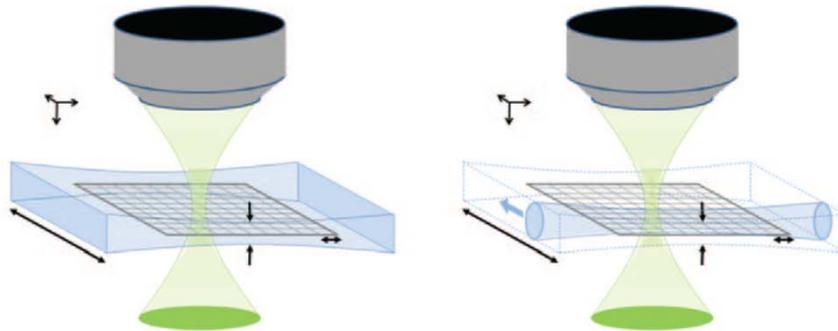
Ce type de microscopie est extensivement utilisé pour imager des échantillons vivants, épais et très diffusants, tels que des tranches de cerveaux de rongeurs, ou des cerveaux entier, *in situ* (Svoboda et al., 2006). La relation qui lie la résolution d'un système optique à la longueur d'onde n'est cependant pas à son avantage. En effet, la résolution latérale, selon la loi d'Abbe : est  $r_{lat} = 0.51\lambda / NA$  ; et la résolution axiale :  $r_{ax} = (0.88\lambda) / (n - \sqrt{n^2 - NA^2})$  ( $n$ : indice de réfraction du milieu en sortie d'objectif ;  $NA$  : ouverture numérique) (Pawley, 1995). Si nous prenons un objectif à  $NA=0.75$ , pour une longueur d'onde à 488 nm et 976 nm nous obtenons respectivement  $r_{lat}=331$  nm,  $r_{ax}=1268$  nm et  $r_{lat}=663$  nm,  $r_{ax}=2536$  nm. Soit une résolution, pour  $\lambda=976$  nm, deux fois plus grande que pour  $\lambda=488$  nm.

### 1.6.3 Microscopies à feuille de lumière

La microscopie à feuille de lumière est peut-être la plus récente en termes de mise sur le marché, mais l'idée d'illuminer et imager l'échantillon de manière orthogonale précède le développement technique d'un siècle (Siedentopf and Zsigmondy, 1903). La première description d'une telle configuration appliquée à la microscopie photonique vient du laboratoire d'Ernst Stelzer (Huisken et al., 2011). Nommée « Selective Plane Illumination Microscopy » (SPIM), elle consiste à focaliser le faisceau laser collimaté avec une lentille cylindrique, ce qui produit un feuillet de lumière au point focal (Figure 1.24). Ce feuillet excite un plan de l'échantillon, et l'axe optique de détection qui lui fait face est équipé d'une caméra. L'épaisseur de la nappe (donc la résolution axiale) est conditionnée par l'ouverture numérique de l'objectif d'excitation, et la résolution latérale dépend quant à elle de l'objectif d'illumination et de la taille du pixel de la caméra. Cette modalité permet non seulement de réaliser des acquisitions extrêmement rapides mais aussi d'imager des échantillons plus en profondeur compte tenu du découplage entre les axes optiques d'excitation et d'émission.

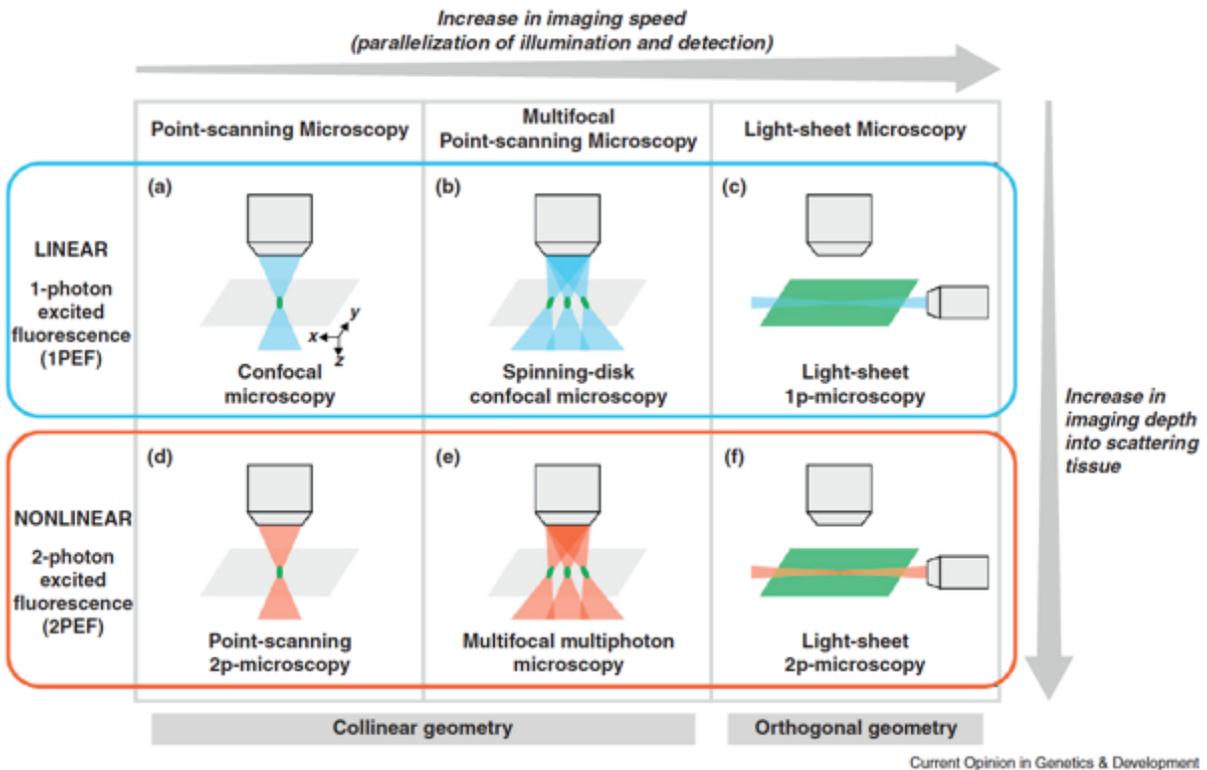
De nombreux développements ont donné lieu à une myriade d'acronymes, parmi lesquels le

DSLM (Digitally Scanned Light-sheet Microscope) où la feuille de lumière est réalisée en balayant latéralement le faisceau de lumière incidente, produisant une nappe « virtuelle » (Figure 1.24). On doit aussi ce développement au laboratoire de Stelzer (Keller et al., 2008).



**Figure 1.24 : Illustrations des techniques SPIM et DSLM.** (A) SPIM avec illumination grand champ. (B) DSLM avec illumination à balayage linéaire. La lumière d'illumination est représentée en bleu. La fluorescence résultante est collectée avec un objectif. La PSF (ou fonction d'étalement du point, en français) de détection (sur l'axe uniquement) est représenté en vert. (Mertz, 2011)

Il est intéressant aussi de remarquer que ces différentes modalités (excitation multiphotonique, roue de Nipkow, feuillet de lumière) sont combinables pour tirer parti des spécificités de chaque technique (Figure 1.25).



**Figure 1.25: Spécificités des différences techniques de microscopie à fluorescence linéaire et non-linéaire.** Microscopie linéaire (A-C) et non linéaire (D-F) en fonction du temps d'acquisition et de leur capacité à imager, un tissu, en profondeur. (Supatto et al., 2011)

#### 1.6.4 Tomographie par cohérence optique

La tomographie par cohérence optique (OCT) (Huang et al., 1991) est une technique d'imagerie interférométrique, non invasive. Un faisceau est séparé pour illuminer d'une part l'échantillon et d'autre part un miroir. La lumière réfléchiée dans les deux bras est recombiniée et les interférences entre les deux faisceaux sont analysées numériquement. Les différences de vitesse de propagation de la lumière dans les différents milieux biologiques de l'échantillon (lipides, milieu aqueux, riche en pigments...) perturbent les interférences et l'analyse du signal permet donc d'accéder à des informations relatives aux différences d'indices entre les milieux traversés (Boppart et al., 1996). Cette modalité d'imagerie peut, comme la microscopie de fluorescence se décliner aussi en plein champ (Beaurepaire et al., 1998).

Dans notre équipe, Amaury Badon a notamment développé un système d'OCT plein champ qui nous a permis d'imager des capsules d'alginate remplies de cellules, sphériques (Recher et al., 2020) ou tubulaires (Mekhileri et al., 2021).

La résolution axiale du système est directement liée à la dispersion chromatique de la lumière incidente alors que la résolution latérale est liée à l'ouverture numérique de l'objectif. Cette technique est particulièrement indiquée pour l'imagerie de grands échantillons en 3D tels que l'ont montré d'autres groupes (Dubois et al., 2002; Jung and Boppart, 2012).

#### 1.6.1 Transparisation d'objets biologiques

Nous avons évoqué le fait que la taille du tissu biologique et sa composition jouent un rôle dans la limitation de l'imagerie en profondeur, notamment des phénomènes de diffusion aux interfaces lipides-eau.

Une approche pour limiter l'impact de ces différences d'indices est de les minimiser, en faisant en sorte que l'indice majoritaire se rapproche de celui des lipides, de celui de l'eau ou d'un autre liquide qui les remplacera. Ces procédés sont appelés «*transparisation*». Une des approches les plus répandues est nommée CLARITY, et consiste à établir des liaisons covalentes entre les protéines puis à éliminer les lipides avec un détergent, et facilité par une électrophorèse (Chung et al., 2013). L'échantillon est ensuite imprégné dans un liquide d'indice similaire à celui utilisé pour les objectifs à immersion, ce qui permet d'optimiser encore la propagation de la lumière. Cette technique est particulièrement fastidieuse, et d'autres protocoles ont été proposés. Ils combinent souvent l'usage de différents solvants, plus ou moins toxiques pour le manipulateur et qui préservent plus ou moins bien les protéines (Richardson and Lichtman, 2015). Le développement de ces protocoles a d'abord été initié dans le domaine des neurosciences, le cerveau étant particulièrement riche en lipide et les questions scientifiques nécessitant souvent d'imager de vastes zones pour appréhender les réseaux de neurones interconnectés. Cependant, pour des échantillons de taille plus modeste tels que les sphéroïdes, il existe des protocoles plus anciens et pourtant plus simples à mettre en œuvre. Notamment, l'usage du glycérol, bien connu des opticiens comme liquide d'immersion. Il présente d'autres avantages : il permet à la fois de restaurer la taille d'un échantillon contracté par la fixation, et c'est également un très bon cryopréservateur, ce qui permet de stocker ses échantillons à -20° sans plus de précaution. Des sphéroïdes immergés dans un mélange glycérol PBS (80-20) sont plus transparents et présentent une meilleure conservation des contrastes qu'avec d'autres

molécules telles que le RapiClear ou le TDE (Fatafta et al., 2021).

### 1.6.1 Coupes histologiques

Il arrive cependant que lorsque l'on cherche à montrer l'absence ou la présence d'un marquage en profondeur, l'on soit confronté à une impasse. Si le marquage est absent, est-ce dû à un problème de pénétration du marqueur ? Ou de la lumière ? Comment s'en assurer ? Il est possible d'effectuer des « contremarquages » pour des structures dont on sait qu'elles sont présentes au cœur du sphéroïde : par exemples les noyaux. Cependant, les marqueurs nucléaires sont souvent très petits et diffusent bien, ce qui n'est pas forcément le cas des anticorps ou d'autres sondes aux propriétés physico-chimiques différentes. Dans ce cas, persister à vouloir imager l'échantillon dans son intégrité est un écueil, et il faut faire appel aux techniques plus « classiques » d'histologie, et sectionner non plus optiquement, mais physiquement les échantillons.

Les échantillons, trop petits pour être mécaniquement sectionnés, doivent au préalable être inclus dans une matrice plus ou moins rigide. Les deux techniques les plus répandues dans les laboratoires sont : l'inclusion en paraffine ou l'inclusion en résine cryogénique. La première se fait par imprégnation des échantillons dans la paraffine chauffée (56°C) puis refroidie à température ambiante ; la seconde consiste à imprégner l'échantillon dans une résine qui se rigidifie au froid. Cette dernière, bien qu'elle permette une meilleure préservation des structures biologiques est plus délicate à mettre en œuvre.

En règle générale, il y a peu de marge de manœuvre pour faire varier l'épaisseur des coupes qui se situe entre 7 et 12  $\mu\text{m}$ . Pour reconstituer l'objet en 3D, il faut alors imager toutes les coupes et les superposer pour recréer le volume. En pratique, les échantillons subissent des déformations dues aux forces de cisaillement et les coupes ne sont pas superposables. Il convient alors de sélectionner des coupes dans le bloc afin d'imager un échantillon représentatif de la totalité. Dans ce cas, il est bienvenu de garder en tête quelques principes de stéréologie, notamment pour la sélection de l'intervalle entre les coupes (Mayhew, 1991).

## 1.7 Problématiques et objectifs de la thèse

Dans ce chapitre, nous avons vu que les pré-adipocytes sont hautement réactifs aux signaux biochimiques et biophysiques de leur environnement. La complexité de ces processus est encore mal comprise. À ce jour, l'impact de la compression sur l'adipogenèse n'a pas été étudiée sur des assemblées cellulaires 3D. Le corps est pourtant constamment soumis à des forces de compression, notamment en position de sédentarité. C'est dans ce contexte que nous allons utiliser la technique des capsules cellulaires pour tenter de déterminer quantitativement si une simple compression induite par confinement est suffisante pour déclencher l'adipogenèse, sans intervention de facteurs adipogéniques chimiques.

Pour le suivi de l'adipogenèse, il y a deux stratégies possibles qui consistent : 1/ à regarder chimiquement la sécrétion des facteurs adipogéniques, 2/ à regarder par microscopie le changement phénotypique spécifique à l'adipogenèse. La première méthode requiert généralement de dissocier les cellules entre elles et donc de perdre l'information spatiale de l'agrégat. Nous avons choisi la deuxième méthode qui permet de garder l'information structurelle de l'agrégat adipocytaire tout en ayant un suivi clair de l'adipogenèse via la

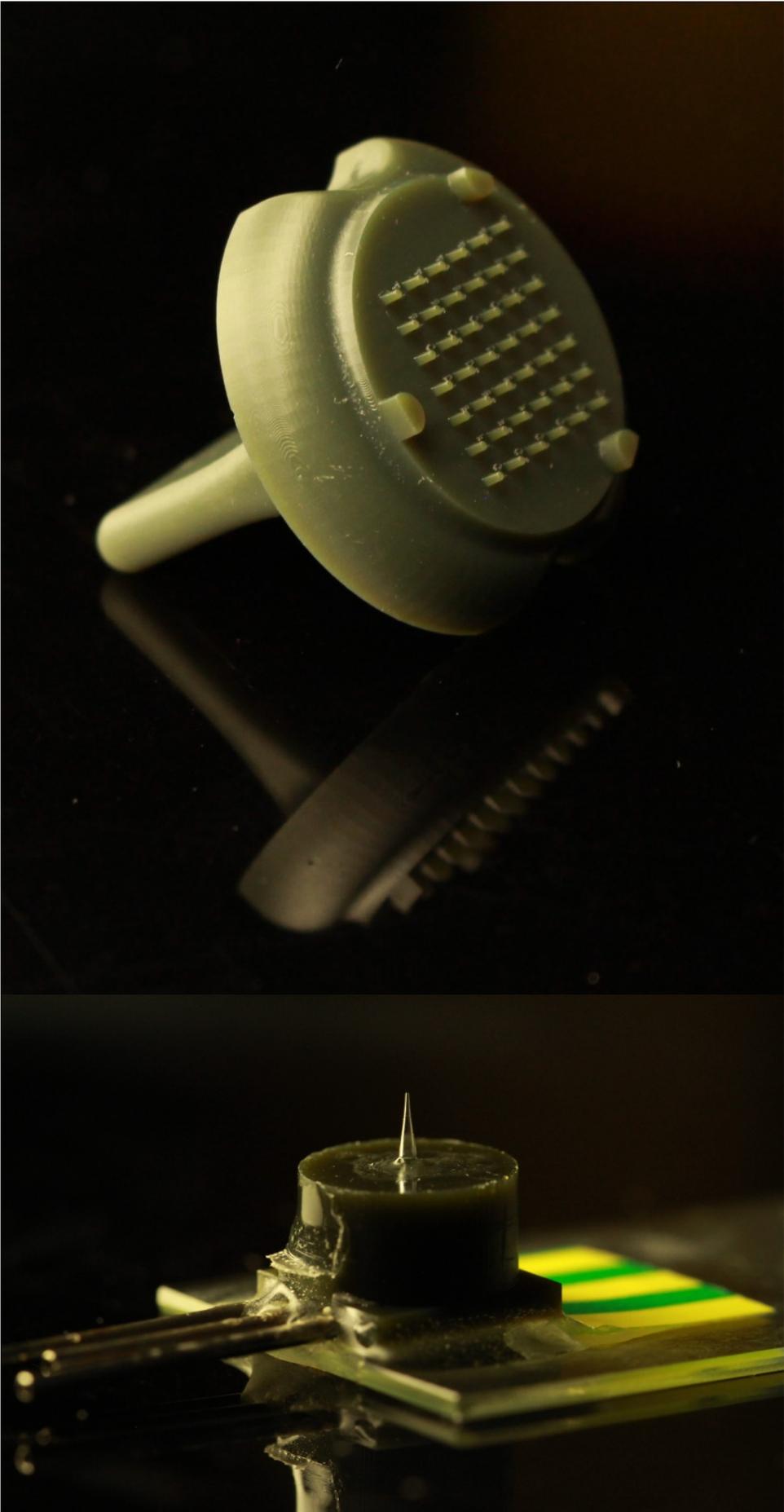
formation de gouttelettes lipidiques. Cela nous permet de suivre le cours de la différenciation uniquement par imagerie, sans avoir à multiplier les tests biochimiques. Pour éclairer nos observations à 3D en l'absence de signaux biochimiques, nous mènerons deux types de contrôle : d'une part, la réalisation d'expériences miroir dans un milieu dont la composition hormonale est adipogénique ; et d'autre part, la réalisation d'expériences à 2D en condition de confinement spatial sur micromotif.

Nous commencerons par rassembler dans le chapitre 2 l'ensemble des matériels et méthodes utilisés. Les protocoles, les adaptations que nous avons dû apporter sur le système d'encapsulation, et le développement d'une méthode de confinement 2D seront en particulier rapportés.

Le chapitre 3 sera consacré sur l'étude de la croissance et de l'adipogenèse d'agrégats 3D de pré-adipocytes encapsulés et de préadipocytes confinés en 2D.

Dans un 4<sup>ème</sup> chapitre exploratoire, nous décrirons certains développements inspirés de la bio-impression que nous avons appliqués aux systèmes d'encapsulations existants.

Nous conclurons ensuite en abordant les possibles expériences futures qui pourront compléter notre travail.



# 2

## Matériels et Méthodes

---

2.1	Modèles cellulaires.....	47
2.1.1	Cellules de la Fraction Stromale Vasculaire du Tissu adipeux.....	47
2.1.2	Lignée cellulaire clonale : maintenance et différenciation .....	47
2.1.3	Construction FUCCI.....	47
2.1.4	Fixation, immunofluorescence et coupes histologiques .....	48
2.2	Caractérisation de la prolifération cellulaire à 2D.....	49
2.2.1	Modèles de croissance cellulaire .....	49
2.2.2	Imagerie holographique sans lentille .....	52
2.2.3	Microscopie à contraste de phase .....	54
2.3	Formation d'organoïdes de préadipocytes par la technologie des capsules cellulaire. ....	56
2.3.1	Principe de fonctionnement de la technique d'encapsulation et contraintes pratiques .....	56
2.3.2	Fabrication d'une puce microfluidique hybride.....	57
2.3.3	Module d'encapsulation électro-fluidique.....	60
2.3.4	Caractérisation morphométrique des capsules.....	64
2.3.5	Protocole d'encapsulation .....	66
2.3.6	Capsules à petit et grand cœur : modulation de l'épaisseur de la coque.....	68
2.3.7	Stratégie de formation d'agrégats cellulaires uniques par capsule .....	69
2.4	Microfabrication de micro-puits pour capsules .....	70
2.4.1	Sensibilité environnementale des préadipocytes .....	70
2.4.2	Moulage de micro-puits pour adressage des capsules .....	71
2.4.3	Protocole de transfert des capsules .....	74
2.5	Techniques de confinement de cellules à 2D .....	75
2.5.1	Photolithographie .....	75
2.5.2	Micro-impression d'ilots adhérents .....	76
2.5.3	Fabrication par gaufrage de motifs topographiés .....	78
2.6	Imagerie et Analyses d'images.....	79
2.6.1	Microscopie en fond clair et segmentation des agrégats multicellulaires.....	79
2.6.2	Microscopie de fluorescence et segmentation des gouttelettes lipidiques.....	81

## 2.1 Modèles cellulaires

### 2.1.1 Cellules de la Fraction Stromale Vasculaire du Tissu adipeux

Nous avons dans un premier temps utilisé des cellules isolées de la fraction stromale vasculaire (SVF) du tissu adipeux de souris. La SVF de la souris est une fraction cellulaire hétérogène fraîchement isolée du tissu adipeux blanc. Il faut donc isoler et purifier les pré-adipocytes de la SVF.

Les souris sacrifiées ont été fournies par le Professeur Andreas Bikfalvi (Inserm U1029, Laboratoire de l'Angiogenèse et du Microenvironnement des Cancers). Le protocole que nous avons suivi est celui appris à l'IPMC chez nos collaborateurs. Ce protocole est détaillé en annexe 1. Brièvement, il consiste en plusieurs étapes de digestion, séparation et filtration.

Le protocole est efficace, mais le taux de mort cellulaire était assez élevé, ce qui est souvent le cas avec des cellules primaires. Étant donné que nous avons besoin d'environ 2 millions de cellules pour une encapsulation, cela n'a pas été envisageable. Nous sommes donc passé à des lignées cellulaires de préadipocytes.

### 2.1.2 Lignée cellulaire clonale : maintenance et différenciation

Comme nous l'avons vu au Chapitre 1, il existe plusieurs lignées cellulaires préadipocytaires. Nous avons choisi d'utiliser les 3T3-F442A qui sont capables d'accumuler plus de graisse que les 3T3-L1 (Green and Kehinde, 1976; Gregoire et al., 1998).

Les cellules ont été fournies par l'équipe Mécanobiologie moléculaire et intégrative du Docteur Éric Honoré, de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC) de Nice, avec l'aide technique de Malika Arhatte.

Les 3T3-F442A sont cultivées en milieu non-adipogénique Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 4.5 g/l de glucose, complété avec 10% SVF et 5% de Pénicilline-Streptomycine (PS), et maintenues à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>. Les préadipocytes, comme beaucoup d'autres types cellulaires, sont sensibles à la confluence. Afin de ne pas dépasser les 70%-80% de confluence, il est nécessaire de réaliser des passages réguliers, environ toutes les 48h-60h pour une concentration initiale de 10 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Le passage est réalisé en ajoutant de la trypsine EDTA jusqu'à décollement des cellules. Une flasque (T75) de cellules est fractionnée entre 3 à 5 autres flasques. La différenciation des 3T3-F442A est déclenchée par l'ajout de 10 µg.ml<sup>-1</sup> d'insuline (Fisher science, 12097549).

### 2.1.3 Construction FUCCI

Pour les cellules eucaryotes, on distingue deux états dans le cycle cellulaire: l'interphase et la phase mitotique (M). Pendant l'interphase, la cellule accumule de la matière et duplique son ADN. Il y a trois étapes :

La phase G1 : la cellule s'agrandit, copie les organelles et fabrique les blocs de construction moléculaires dont elle aura besoin.

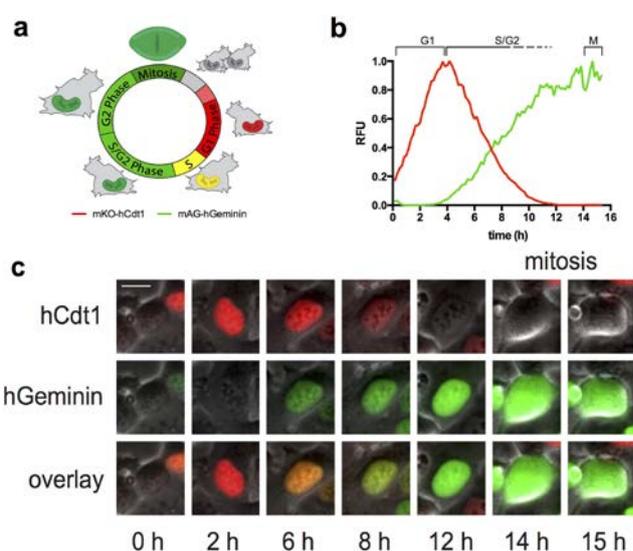
La phase S : la cellule synthétise une copie complète de l'ADN dans son noyau.

La phase G2 : Au cours de cette phase, la cellule croit davantage, fabrique des protéines et des organelles et commence à réorganiser son contenu en vue de la mitose

Pendant la phase mitotique (M), une copie de génome est répartie dans chaque cellule fille puis le cytoplasme se divise, c'est la cytokinèse.

Miyawaki et ses collègues (Sakaue-Sawano et al., 2008) ont mis au point un indicateur du cycle cellulaire, le FUCCI (fluorescence ubiquitination cell cycle indicator). Le système FUCCI est un indicateur bicolore (rouge et vert) codé génétiquement qui permet de suivre dans quel état du cycle cellulaire se trouve une cellule, et plus largement une population cellulaire.

Plus précisément, le système FUCCI (Figure 2.1a) est constitué de deux polypeptides de fusion fluorescents où chaque protéine fluorescente est attachée à une protéine cible. Chaque protéine de fusion est dégradée par le protéasome de manière régulée en fonction de l'état de la cellule dans le cycle cellulaire. La production de la construction rouge (mKO-hCdt1) augmente en phase G1 puis la protéine est dégradée au début de phase S. La production de la construction verte (mAG-hGeminin) augmente au début de la phase S et la protéine est dégradée à l'anaphase de la mitose. Au fur et à mesure que les cellules progressent vers la phase S, le signal vert s'accumule et le signal rouge se dégrade (Figure 2.1). L'absence de signal rouge correspond à la transition vers la fin de la phase S. Les cellules restent vertes pendant la fin de la phase S et la phase G2 et entrent en mitose après 14 à 18 heures. Dans la Figure 1c, nous pouvons voir les différentes étapes du cycle cellulaire en microscopie de fluorescence. Dans cet exemple, la durée moyenne du cycle cellulaire est de ~16 h. Les cellules passent 4 à 6 h en phase G1, et 8 à 10 h en phase S/G2 et environ 1 h en mitose. La durée de la phase G1 représente environ 25 à 40% de la durée totale du cycle.



**Figure 2.1 : Caractérisation du cycle cellulaire à l'aide de la construction FUCCI.**

(a) Description schématique du cycle cellulaire et des couleurs observées en fluorescence sur la construction FUCCI. (b,c) Suivi de l'intensité de fluorescence au cours du cycle (b) et images de microscopie de fluorescence (c) de cellules possédant la construction FUCCI. La barre est de 10 µm. Extrait de (Marcus et al., 2015).

#### 2.1.4 Fixation, immunofluorescence et coupes histologiques

Les protocoles de fixation habituellement utilisés pour des cellules 2D doivent être adaptés pour les capsules cellulaires. En effet, il faut d'une part que l'agent fixateur ait le temps d'atteindre le centre de l'agrégat, et d'autre part, que la capsule ne soit pas exposée à des agents chélateurs du calcium ou des composés qui dissoudraient l'alginate (par exemple, le PBS - voir section 1.5.1). En pratique, on place les capsules dans une solution aqueuse de Paraformaldéhyde (PFA) à 4% v/v, pendant 12h, à 4°C. Ensuite, on rince les échantillons avec du milieu de culture à faible concentration en glucose additionné de 2% v/v de PFA, puis on peut les conserver à 4°C

plus de 10 mois.

Comme nous le verrons chapitre 3, section 3.3.1, l'imagerie en microscopie de fluorescence *in toto*, que ce soit sur tissu frais ou fixé, présente des limitations en termes d'accès à la profondeur. Pour contourner ces écueils, nous avons pris le parti d'utiliser en parallèle, des méthodes plus traditionnelles et éprouvées d'histologie sur tissus fixés et sectionnés.

Pour réaliser les coupes histologiques, nous avons congelé les tissus préalablement fixés avec une résine développée pour l'imprégnation au froid, l'OCTc (Optimal Cutting Temperature compound) (Dutscher, 050226). Nous avons utilisé des capsules fixées de préadipocytes 3T3-F442A que nous avons placées dans un bain de sucrose à 30%. Après 48h à 4°C, le sucrose est aspiré afin qu'il ne reste plus qu'un fond de sucrose avec les capsules. Ce fond est ensuite transvasé dans un moule jetable à inclusion 7x7x5 mm avec base (Dutscher, 040664). Nous ajoutons ensuite la solution de cryogénération OCTc sur ce fond de capsules. La solution est alors délicatement mélangée pour mettre en suspension les capsules dans le bloc afin de les répartir de manière homogène. Pour la congélation, de l'isopentane est versé dans une boîte métallique, qui baigne dans un bain d'azote liquide. Une fois l'isopentane froid (moins de -20°C), le moule, avec les capsules enrobées d'OCTc, y est plongé. Après 1-3 minutes, l'OCTc durcit et devient opaque. L'échantillon est alors prêt à être récupéré. Le bloc d'OCTc peut alors être conservé à -80°C ou -20°C. Une fois démoulé, le bloc d'OCTc est installé sur le support froid du cryostat (Leica CM3050S). La température du cryostat est de -30°C environ. Nous ajoutons de l'OCTc entre le bloc et le support. L'OCTc ajouté durci en quelques minutes et la coupe peut commencer. Nous déposons ensuite une lame « superfrost » (Dutscher, 0457895) sur les coupes. La lame, avec les coupes, se conserve à -20°C en attendant le montage pour imagerie.

La partie délicate concerne le rinçage du sucrose en présence des capsules de 3T3-F442A. En raison de la présence de gouttelettes lipidiques, les capsules ont tendance à flotter, ce qui rend le rinçage compliqué si nous ne voulons pas aspirer de capsules avec le sucrose. Ces gouttelettes ont aussi l'inconvénient de se désolidariser de l'agrégat lors de la coupe malgré la présence de la « colle » OCTc.

## 2.2 Caractérisation de la prolifération cellulaire à 2D

La détermination de la durée du cycle cellulaire des pré-adipocytes 3T3-F442A passe par un suivi de la cinétique de prolifération. Nous effectuerons ces mesures à 2D, même si nous avons bien conscience que la dynamique de croissance peut parfois différer en 2D et en 3D (Smith et al., 2012). Pour ce faire, nous utiliserons un modèle empirique simple (le modèle logistique). Expérimentalement, nous suivrons le nombre de cellules (ou noyaux) au cours du temps ou déterminerons le taux de confluence (i.e. fraction de la surface de la boîte de Pétri occupée par les cellules au cours du temps). Nous avons utilisé deux méthodes optiques fonctionnant sur des principes différents.

### 2.2.1 Modèles de croissance cellulaire

Commençons par envisager le scénario le plus simple de croissance de population, qui peut être résolu de manière analytique. En notant  $N_0$  le nombre initial de cellules, le nombre de cellules après  $n$  cycles de division,  $N_n$ , est donné par  $N_n = 2^n N_0$  avec. Soit  $\tau$  la durée du cycle cellulaire

supposée constante, on obtient directement, avec  $t = n\tau$ , l'évolution temporelle,  $N(t) = N_0 2^{t/\tau}$ , soit :

$$N(t) = N_0 e^{\frac{t \ln 2}{\tau}} \quad (2.1)$$

De manière plus générale, pour prendre en compte la mort cellulaire, on écrit plutôt l'évolution de  $N$  sous forme d'une équation différentielle :

$$\frac{dN}{dt} = (k_+)N - (k_-)N \quad (2.2)$$

où le premier terme donne l'augmentation de  $N$  par division cellulaire, avec  $k_+ = \frac{\ln 2}{\tau}$  est le taux de prolifération (en  $h^{-1}$  ou  $jour^{-1}$ ) supposé constant, alors que le second terme représente la perte de cellules par apoptose ou nécrose, avec  $k_-$  le taux de mort cellulaire. Le plus souvent, au premier ordre, notamment pour des cellules cancéreuses très prolifératives, le taux de mort cellulaire est négligeable devant le taux de division.

Dans tout modèle de croissance de population, il existe souvent un effet de saturation. Pour en rendre compte, on peut par exemple introduire une interaction de paires entre cellules, liée à la compétition pour les nutriments et l'espace. Il s'agit de modèles de croissance logistique, établis pour la première fois par Verhulst en 1838 (Verhulst, 1838). Ils ont été largement appliqués à des domaines allant du rôle de l'autophagie dans les populations de cellules de levure en réponse à la famine (Jin and Lei, 2014) jusqu'aux études évolutives du cancer (Korolev et al., 2014). L'équation (2.2) (avec  $k_-$  négligeable et  $k = k_+$ ) devient alors

$$\frac{dN}{dt} = kN - \beta N^2 \quad (2.3)$$

Notons que le terme en  $N^2$  est négatif et contribue bien à une évolution moins rapide du nombre de cellules.

Une autre formulation de l'équation (2.3) peut être obtenue en reprenant l'équation (2.2), mais avec un taux de croissance  $k$  non constant, qui décroît lorsque  $N$  augmente selon :

$$\frac{dk}{dt} = -\delta k N \quad (2.4)$$

De (2) et (4), on déduit :

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{1}{\delta} \frac{dk}{dt} \quad (2.5)$$

En notant  $N_0$  à  $t_0$  et  $N_{max}$  pour  $t \rightarrow \infty$ , nous avons finalement :

$$\alpha(t) = \frac{N(t)}{N_{max}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{N_{max}}{N_0} - 1\right) e^{-kt}} \quad (2.6)$$

Avec  $\alpha(t)$  le nombre de cellules normalisé par rapport au nombre maximum à saturation. Nous utiliserons cette équation pour déduire de nos mesures la durée du cycle cellulaire des pré-adipocytes à 2D.

*Remarque (Aparté) :* Il y a d'autres modèles, comme celui de Gompertz qui a été beaucoup

utilisé pour décrire la croissance des plantes, de la croissance des bactéries, ou encore des tumeurs (Laird, 1964; Paine et al., 2012; Teleken et al., 2011). Ces modèles purement phénoménologiques, qui peuvent être attractifs parce qu'ils permettent de bien ajuster les données expérimentales, ne donnent que peu d'éclairage sur les mécanismes physiques ou biologiques et peuvent conduire à masquer certains effets importants. En effet, dans le cas de la croissance de sphéroïdes, le modèle de Gompertz conduit une forme sigmoïdale, et donc une saturation de la croissance. D. Drasdo a montré que le soi-disant plateau de saturation de la croissance suit plutôt une croissance sous-exponentielle, en loi de puissance  $N \propto t^3$  tant que les concentrations du milieu en glucose et en oxygène ne sont pas trop faibles (Drasdo et al., 2007). Il est à noter que ces simulations de type « cell-based agent » reposent sur des propriétés physiques telles que le module d'Young des cellules ou leurs énergies d'adhésions (introduites dans un modèle de type Johnson-Kendall-Robert, JKR (Johnson et al., 1971)). Elles montrent en particulier que ce ralentissement de la croissance (et non saturation) au-delà d'une taille critique n'a pas pour origine une limitation en nutriments ou oxygène. En effet, de manière surprenante a priori, la croissance d'une monocouche à 2D montre des effets similaires, alors que l'apport d'oxygène et nutriments n'est pas limité en frontière de la colonie cellulaire. Au-delà d'une certaine taille de colonie, la prolifération est réduite à l'intérieur, à l'exception d'une zone périphérique d'une épaisseur de quelques cellules (Brú et al., 1998). Tant qu'une colonie 2D est petite, une cellule au sein de la monocouche est généralement capable d'exercer une force suffisante sur ses voisines pour les écarter ou les inciter à migrer activement afin de doubler de volume et se diviser. En revanche, au-delà d'une certaine taille de monocouche, les cellules situées suffisamment loin de la périphérie sont entourées de tant de cellules environnantes qu'elles ne sont pas capables de les repousser pour générer un espace suffisant à la division.

À 3D, dans des sphéroïdes ou organoïdes, s'ajoute l'effet de la diffusion des nutriments restreinte vers le cœur de l'agrégat. Au-dessus d'une certaine taille (diamètre) de tumeur d'environ 400-600 $\mu\text{m}$ , des cellules au cœur de l'agrégats deviennent quiescentes (au repos) ou nécrotiques (mortes) (Freyer and Sutherland, 1985), ce qui explique la structuration « fonctionnelle » généralement rapportées pour les sphéroïdes (Jagiella et al., 2016)

Pour prendre en compte analytiquement ces effets, Montel et al. ont considéré un taux de croissance surfacique différentiel sur une couronne de quelques distances cellulaires (Montel et al., 2011b). Ainsi d'après ce modèle, l'évolution temporelle de  $N$  est la somme d'un terme volumique (dont le taux est  $k = k_d - k_a$  où  $k_d$  et  $k_a$  sont les taux de division et d'apoptose, respectivement) et d'un terme surfacique (de croissance différentielle  $\delta k_s N_s$ ). On obtient :

$$\partial_t N = (k_d - k_a)N + \delta k_s N_s \quad (2.7)$$

Où  $N_s$  est le nombre de cellules situées dans une couronne périphérique d'épaisseur  $\lambda$ .

En supposant une densité cellulaire constante, pour  $R > \lambda$  le taux d'augmentation du volume peut être exprimé comme :

$$\partial_t V = (k_d - k_a)V + (36\pi)^{1/3} \delta k_s \lambda V^{2/3} \quad (2.8)$$

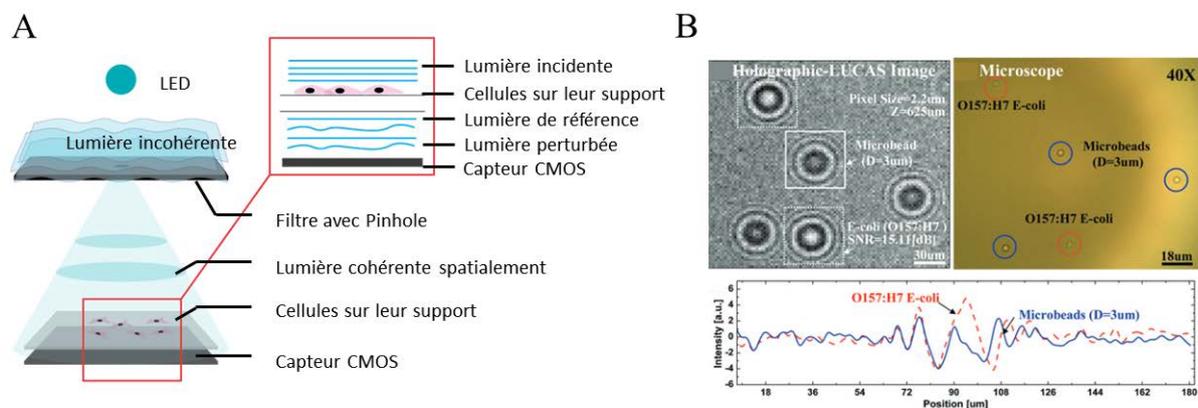
Enfin, le modèle cellulaire que nous avons envisagé, celui de cellules progénitrices

d'adipocytes susceptibles de se différencier en cours de croissance en présence d'hormones adéquates, et éventuellement en l'absence de cocktail chimique mais en présence de contraintes mécaniques, présente des spécificités supplémentaires qui compliquent a priori la description théorique. En effet, si, dans les modèles précédents, l'effet de compactage sous pression pouvait être pris en compte par un paramètre de compressibilité cellulaire, ici, la différenciation s'accompagne de l'apparition de gouttelettes lipidiques qui conduit au contraire à une augmentation significative du volume cellulaire (jusqu'à 30 fois le volume initial (Cinti et al., 2005), voir Section 1.3). Il y a donc des effets de prolifération couplés à des effets de différenciation (production de gouttelettes). Les travaux dans le domaine de la cinétique de prolifération accompagnée de différenciation cellulaire sont rares et ont été peu informatifs pour nous. A 2D, nous avons pris connaissance de (Song et al., 2002). Cet article se focalise sur les cinétiques de nucléation, croissance et coalescence de gouttelettes au sein des cellules dont le taux de croissance est suivi en parallèle. Une approche purement mathématique de différenciation de MSC en pré-adipocytes puis en adipocytes a également été proposée (Gilleron et al., 2019). Ce modèle se base sur la régulation couplée de la différenciation et de la prolifération cellulaire à l'aide de lois phénoménologiques de forme sigmoïde qui dépendent de la taille moyenne des adipocytes. Il permet de montrer un comportement connu pour la distribution des adipocytes : une distribution bimodale des adipocytes dans l'espace. En effet, les adipocytes n'ont pas de taille caractéristique unique. Il a été montré, par exemple, que les adipocytes présentent une distribution avec un pic de population de petite taille avec un diamètre autour de  $15\mu\text{m}$  et un autre pic pour les adipocytes plus gros généralement supérieurs à  $60\mu\text{m}$  (McLaughlin et al., 2007). Cependant, dans ce modèle, la comparaison à des données expérimentales est très peu abordée ou repose sur des données non publiées et sur l'introduction d'un nombre incalculable de paramètres. Nous ne détaillons pas ici les résultats de cet article que nous ne pourrions pas exploiter complètement, même si notre approche semi-quantitative, basée sur un nombre d'hypothèses appuyées par les observations expérimentales, pourra s'en inspirer.

### 2.2.2 Imagerie holographique sans lentille

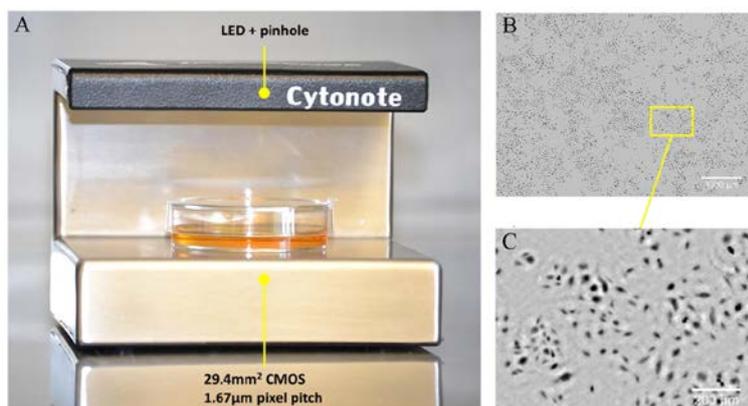
**Principe :** Le **CYTONOTE 1W** (Iprasense, Clapiers, France) un appareil d'imagerie sans lentille dont le fonctionnement est basé sur la technique d'holographie dans l'axe et qui a été développée initialement dans le laboratoire de Ozcan (Seo et al., 2009; Su et al., 2009). Cette technique consiste à illuminer directement un objet en transmission avec une source partiellement cohérente, permettant l'enregistrement du motif de diffraction holographique de chaque cellule par un capteur CMOS. La figure de diffraction holographique de chaque cellule est créée par l'interférence de la lumière diffusée par la cellule avec la lumière de référence non diffusée émanant directement de la source (Figure 2.2). Cette technique est donc plus adaptée pour imager des objets relativement petits qui ne couvrent pas toute la zone imagée. Le CYTONOTE (Allier et al., 2014) est composé d'une diode électroluminescente (LED) RGB avec un diaphragme (pinhole) et d'un capteur CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) de  $29,4\text{mm}^2$ . La reconstruction de l'image est ensuite mise en œuvre par un algorithme de reconstruction inspiré de l'holographie numérique en ligne (Sanz et al., 2015) qui récupère l'image de phase des cellules à partir de leurs motifs holographiques

d'interférence. Contrairement à la majorité des systèmes d'imagerie utilisés en biologie (voir chapitre 1, section 1.6), ce système à grand champ de vue,  $29.4 \text{ mm}^2$ , permet de faire des acquisitions sur une très large population, de quelques dizaines à plus de 4000 cellules, sur plusieurs semaines.



**Figure 2.2 : Microscopie holographique sans lentille.** (A) Schémas de principe du microscope holographique sans lentille. (B) Image de diffraction holographique pour un mélange de microbilles de polystyrène ( $D=3\mu\text{m}$ ) et de E. Colis imagé avec un réseau de capteurs d'une taille de pixels de  $9\mu\text{m}$ . (C) Image de microscope du même champ de vision acquise avec un objectif x40. (D) Le profil d'intensité en coupe transversale (tiré de (A)) du modèle de diffraction holographique d'une microbille et d'un échantillon de E. Coli est illustré. (B-D). Extrait de (Seo et al., 2009).

Dans une expérience typique, le CYTONOTE est placé à l'intérieur d'un incubateur et une boîte de Pétri contenant les cellules est placée sur le capteur CMOS du CYTONOTE. La reconstruction des images et l'analyse des résultats sont réalisées par le logiciel dédié : HORUS. Ce logiciel permet de déterminer le taux de confluence, la taille des cellules ou de faire un suivi cellulaire. Un avantage important de cette technique est que le suivi ne demande pas de marquage fluorescent.

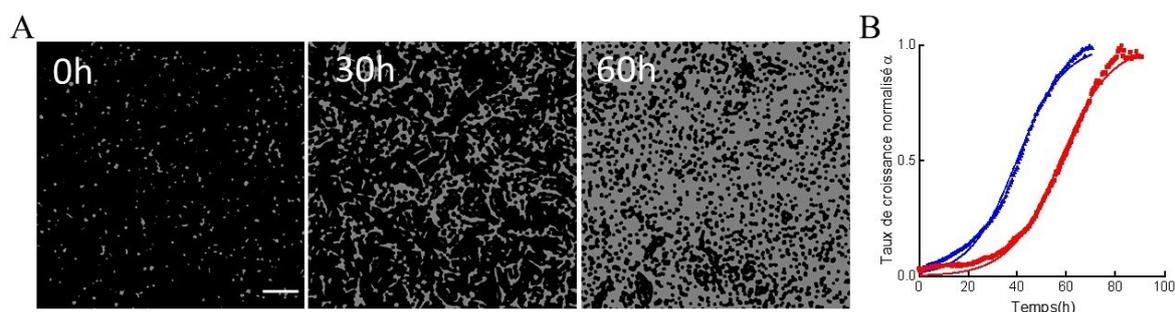


**Figure 2.3: Cytonote 1W.** Photographie du microscope sans lentille (IPRASENSE Cytonote) permettant une imagerie d'une culture cellulaire en boîte de Pétri ( $35 \text{ mm}$  de diamètre). (B) Acquisition et reconstruction de phase d'une culture de cellules endothéliales (barre d'échelle  $1000 \mu\text{m}$ ). (C) Image zoomée de (B). Barre d'échelle :  $250 \mu\text{m}$ . Extrait de Allier et al., 2014.

Expériences sur pré-adipocytes : Nous avons donc utilisé le CYTONOTE avec les cellules 3T3-F442A cultivées dans une flasque T75. Nous les avons suivies pendant 4 jours (Figure 2.4A). L'expérience a été réalisée deux fois dans les mêmes conditions afin d'en vérifier la robustesse. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 2.4A, l'espace libre dans la flasque diminue très rapidement. La quasi-confluence est atteinte après 60h d'enregistrement. Le taux de confluence mesuré à partir de ces images, nous a ensuite permis de tracer le rapport de croissance  $\alpha$ . Nous

pouvons remarquer sur la Figure 2.4B, que les deux courbes expérimentales ont une allure très similaire, avec un décalage de 20h. Ce décalage est probablement lié au fait que les cellules, ne provenant pas du même lot congelé, ont une latence différente à l'initiation de la phase proliférative exponentielle. Nous avons pu remarquer à plusieurs reprises que ces cellules étaient très sensibles aux variations de température.

La courbe d'ajustement basé sur le modèle logistique (Eq.6) nous permet ici de déterminer le taux de doublement moyen  $\tau_{cyto} = 7h \pm 0,3h$ . Alors que le taux de doublement de cellules eucaryotes est généralement de l'ordre de la journée, on obtient ici une valeur près de 4 fois plus faible, indiquant une prolifération très rapide à 2D. Par comparaison, les données de la littérature que nous avons trouvées sont de l'ordre de 12.5h pour les 3T3-L1 (Negrel et al., 1978), ce qui semble corroborer nos premiers résultats.



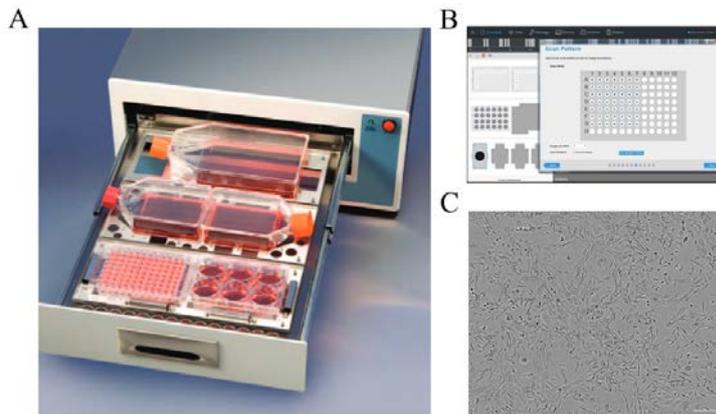
**Figure 2.4: Détermination du taux de prolifération des pré-adipocytes 3T3-F442A avec le Cytonote.**

(A) Masque inversé des images prises avec le Cytonote à différents temps (barre d'échelle 200 $\mu$ m), avec en noir l'espace libre et en gris l'espace occupé par les cellules. (B) Tracé du rapport de croissance  $\alpha$  en fonction du temps mesuré avec le Cytonote, chaque courbe correspondant à une même expérience réalisée deux fois, les courbes d'ajustement basées sur le modèle logistique sont représentées en traits pleins.

### 2.2.3 Microscopie à contraste de phase

En parallèle et en guise de confirmation du résultat précédent, nous avons utilisé un dispositif différent mis à disposition par l'équipe Angiogenèse et Microenvironnement des Cancers (LAMC).

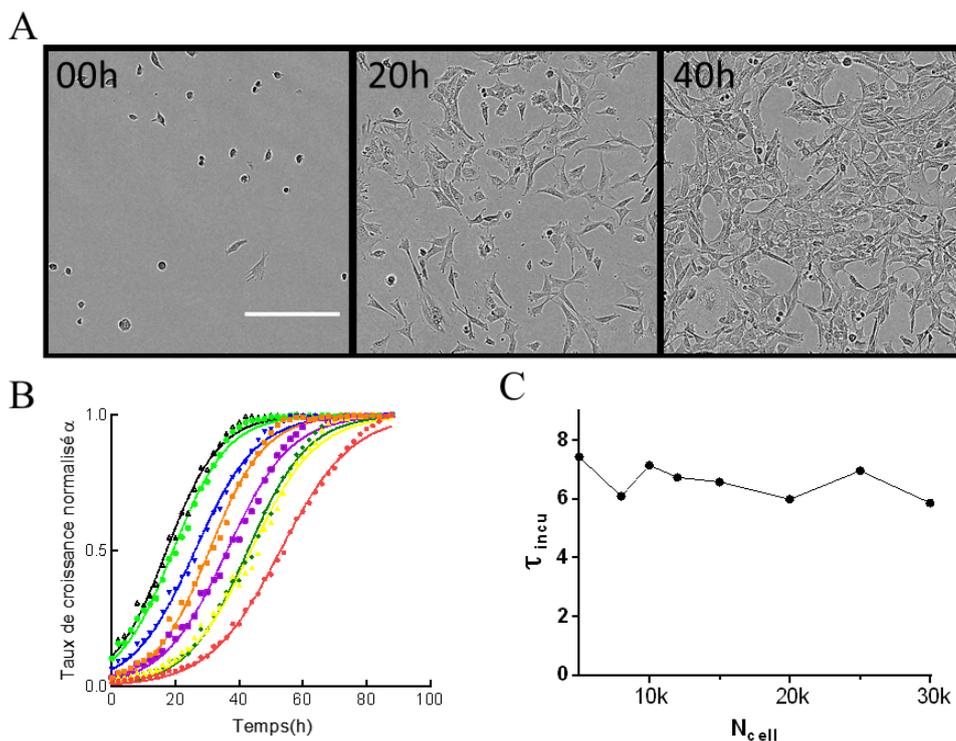
Dispositif : L'IncuCyte (Sartorius, Göttingen, Allemagne) est une plate-forme d'imagerie et d'analyse de cellules vivantes en temps réel qui permet de visualiser et de quantifier le comportement des cellules dans le temps, en recueillant et en analysant automatiquement des images 24 heures sur 24 dans un incubateur de laboratoire standard (Figure 2.5).



**Figure 2.5 : Incucyte.** (A) Photographie du vidéomicroscope à contraste de phase (IncuCyte FLR), extraite du site <https://intellicyt.com>. (B) Image du logiciel d'acquisition multi-positions, extraite du site <https://intellicyt.com>. (C) Image de phase d'une culture 2D de préadipocytes (barre d'échelle 20 µm).

L'Incucyte est un microscope à contraste de phase et à fluorescence équipé d'objectifs de grossissements différents. Bien que le champ de la caméra soit trois fois plus petit que le CYTONOTE, la motorisation du système permet d'acquérir en mode dit « multi-positions » et ainsi parcourir différentes zones de l'échantillon, voire différents supports de culture.

Expériences sur les pré-adipocytes : Pour cette expérience, nous utilisons un objectif x5 et une plaque 24 puits dont le fond des puits mesure environ 1,9cm<sup>2</sup>. Nous ensemençons différentes concentrations de cellules par puits, allant de 5000 (noté 5k) à 30 000 (noté 30k) cellules. Aucun marquage fluorescent n'a été utilisé. Des images récupérées (Figure 2.6A) et traitées par le logiciel d'analyse d'Incucyte, on obtient le taux de confluence des cellules. De là nous pouvons déterminer le taux de croissance normalisé  $\alpha$ . Comme nous pouvons le voir sur la Figure 2.6B, quelle que soit la concentration initiale, les 8 courbes ont une forme similaire. Plus la densité initiale de cellules est élevée, plus la saturation est atteinte rapidement, en accord avec l'Eq.(6). En revanche, la pente de la courbe sigmoïdale semble être indépendante de la densité. En effet, quand on trace le temps de doublement, obtenu en ajustant ces points expérimentaux avec l'Eq.(6), en fonction du nombre de cellules initial  $N_0$ , on observe, sur la Figure 2.6C que celui-ci est constant, et en moyenne  $\tau_{incu} = 6h \pm 0.8h$ . Ce résultat est proche de  $\tau_{cyto} = 7h \pm 0.3h$  mesuré avec le CYTONOTE.



**Figure 2.6 : Détermination du taux de prolifération des pré-adipocytes 3T3-F442A avec l'Incucyte.** Images prises à différents temps (barre d'échelle 200 $\mu\text{m}$ ). (B) Tracés du nombre de cellules normalisé  $\alpha$  en fonction du temps pour différentes densités de cellules initiales : 30k en noir, 25k en violet, 20k en vert clair, 15k en vert foncé, 12k en bleu, 10k en jaune, 8k en orange et 5k en rouge. Les courbes en trait plein correspondent aux courbes théoriques (Eq. (6)). (C) Tracé du temps de doublement en fonction du nombre de cellules à  $t=0\text{h}$ .

En bref, par deux méthodes, nous avons déterminé le temps de doublement des pré-adipocytes 3T3-F442A à 2D. Un temps de 6-7h est obtenu, ce qui correspond à un taux de prolifération remarquablement élevé.

Comme nous l'avons dit précédemment, la dynamique de croissance en 2D n'est pas nécessairement la même qu'en 3D. Cependant, cela nous donne une première idée de ce que pourra être la dynamique de croissance d'un agrégat cellulaire de 3T3-F442A.

## 2.3 Formation d'organoïdes de préadipocytes par la technologie des capsules cellulaire.

### 2.3.1 Principe de fonctionnement de la technique d'encapsulation et contraintes pratiques

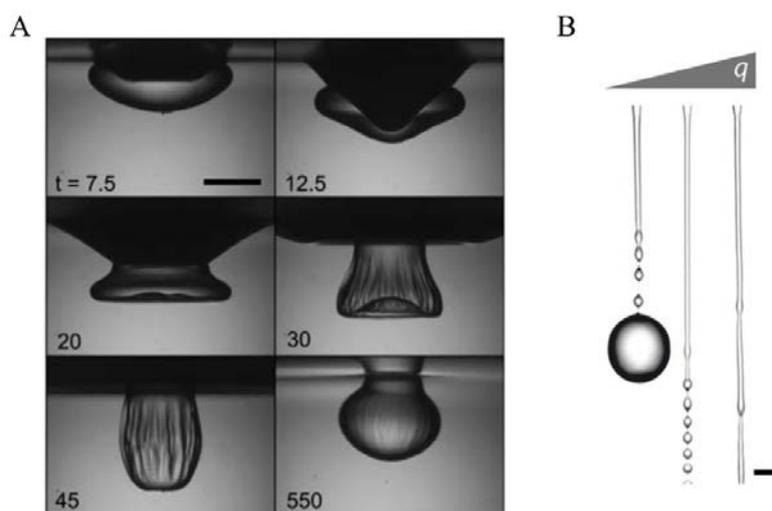
Notre méthode de fabrication de sphères creuses d'alginate encapsulant des cellules est inspirée de la fabrication des perles liquides millimétriques (Bremond et al., 2010) et a été développée précédemment dans le groupe (Alessandri, 2013). Elle a été valorisée au travers de la création d'une start-up, Treefrog (<https://treefrog.fr/>), dédiée à la culture 3D de cellules souches et leurs applications en thérapie cellulaire, et au travers d'une plateforme académique d'encapsulation, Voxcell (<https://www.tbmcore.u-bordeaux.fr/voxcell/>), principalement orientée vers des applications en oncologie. Une revue des potentialités de la Technologie des Capsules Cellulaires, est reproduite en annexe « Publication 1 ».

Les caractéristiques essentielles du principe de fonctionnement de la technologie des Capsules Cellulaires sont les suivantes :

- Bien que toutes les solutions utilisées soient aqueuses, leur mise sous flux dans des systèmes de dimension sub-millimétrique assure un bas nombre de Reynolds, donc permet d'éviter le mélange. Cependant l'utilisation de solutions ioniques, le temps de contact entre chaque solution doit être limité. C'est pourquoi le système de coextrusion, que je présenterai par la suite, minimise ce temps de contact entre solutions.

- La fabrication de capsules de taille sub-millimétrique ne peut pas être obtenue dans un régime dit de « dripping » (Utada et al., 2007) car la taille d'une goutte tombant d'un capillaire est contrôlée par la gravité et la tension de surface, et est donnée par la longueur capillaire de l'ordre de 3 mm pour des solution aqueuse. L'astuce a donc consisté à augmenter les débits pour atteindre le régime dit de « jetting ». Le jet liquide ainsi formé a la taille du capillaire de sortie et se fragmente en gouttelettes par instabilité de Plateau-Rayleigh (Alessandri, 2013) (Figure 2.7B).

- Enfin, il faut gérer l'impact de la gouttelette sur le bain de réticulation. Bremond et al (Bremond et al., 2010) ont montré pour des gouttes millimétriques que l'explosion des gouttes pouvait être évitée en ajoutant le tensio-actif sodium dodecyl sulfate (SDS) (VWR) dans la solution d'alginate. Le tensioactif confère à l'interface solution d'alginate/air une rigidité qui amortit l'instabilité de cisaillement lors de l'impact. Bien que la capsule se déforme significativement au passage de l'interface, la réticulation très rapide de l'alginate et les propriétés élastiques résultantes de la capsule font que celles-ci conservent une forme sphérique (Figure 2.7A). En plus de cela, nous ajoutons également des traces de tensio-actif Tween80 (Sigma-Aldrich, P1754) à la surface du bain de calcium pour réduire sa tension de surface et nous contrôlons la hauteur de chute des gouttelettes.

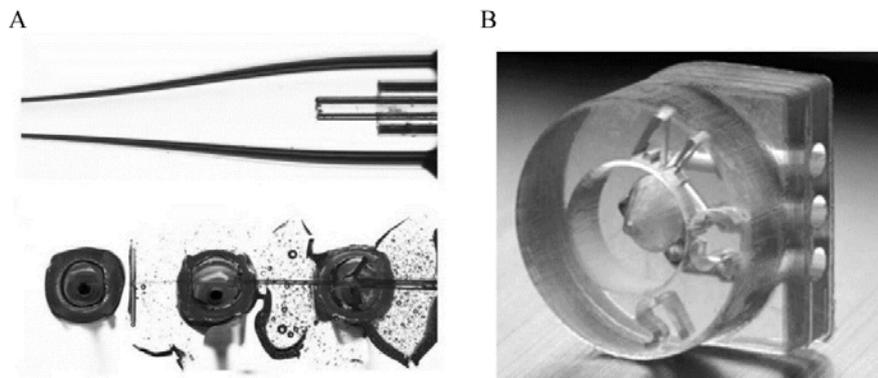


**Figure 2.7 : Principe de formation de coques d'alginate par jetting et instabilité de Rayleigh.** A. Formation de perles à cœur liquide en présence de SDS. Extrait de (Bremond et al., 2010). B. Images extraites d'une vidéo de l'écoulement d'un jet composite en sortie de buse. À gauche, Goutte-à-goutte (débit de 55 ml.h<sup>-1</sup>) ; au milieu fragmentation du jet par instabilité de Plateau-Rayleigh (débit de 100 ml.h<sup>-1</sup>) ; à droite jet continu (débit de 150 ml.h<sup>-1</sup>). Extrait de (Alessandri et al., 2013)

### 2.3.2 Fabrication d'une puce microfluidique hybride

Notre groupe avait développé les premières puces de co-extrusion avec des capillaires en verre collés (Alessandri et al., 2013) ce qui demandait un travail long, minutieux et peu reproductible (Figure 2.8A). La deuxième version a consisté à fabriquer des puces tout-plastique par impression 3D (Alessandri et al., 2016) faciles à produire et reproductibles (Figure 2.8B).

Cependant la forme des capsules étant très sensible à la régularité du jet sortant du dispositif de coextrusion, il a été observé qu'un embout lisse et hydrophobe était crucial pour mieux contrôler la non-mouillabilité du jet liquide, ce qui n'est pas le cas pour la buse en plastique de la puce. C'est pourquoi une rondelle d'un capillaire en téflon (PFA HP PLUS TUBING, 360 $\mu$ m OD, 100  $\mu$ m ID de IDEX) a été collée à l'extrémité de la puce en plastique. Bien que les premières encapsulations étaient satisfaisantes, nous avons remarqué que i) le collage de la rondelle en téflon était critique sur la structure interne des capsules, le moindre désalignement ou surplus de colle génère une perturbation dans les couches liquides internes de la capsule ; et ii) le système était sensible au mouillage, la moindre perturbation du jet, due à la présence d'un agrégat cellulaire par exemple, ne permettait plus de former le jet.

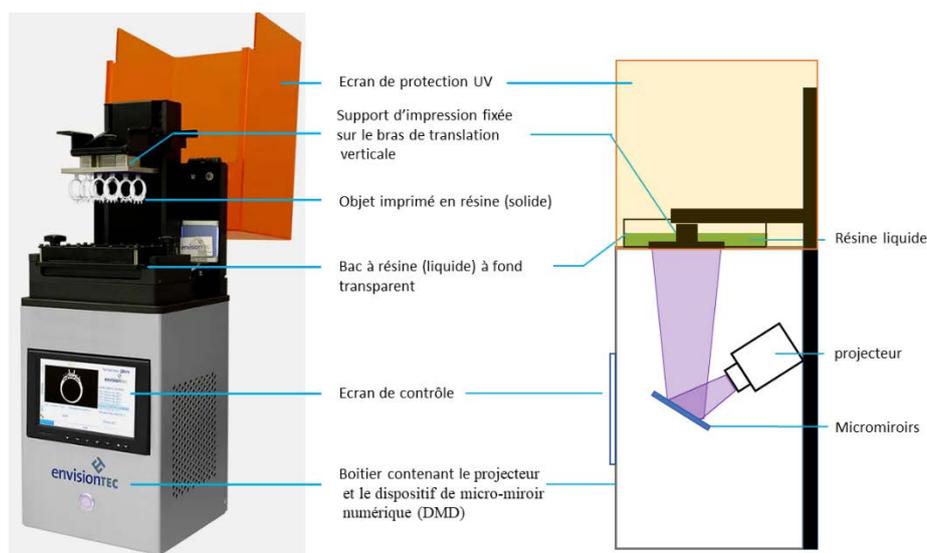


**Figure 2.8 : Différentes générations de puces de coextrusion développées au laboratoire avant 2016.** (A) Puce totalement en verre, (B) Puce tout en plastique. Extrait de (Alessandri et al., 2016)

Au début de ma thèse, nous avons mis au point une nouvelle puce hybride, verre-plastique. Le corps de l'injecteur est fabriqué par impression 3D et la pointe (capillaire de sortie) est en verre. L'idée étant de garder la simplicité de fabrication de la puce tout en plastique et la qualité de formation de capsule de la puce tout en verre.

### **Fabrication du corps en plastique de la puce**

Le corps en résine de la puce est fabriqué à l'aide d'une imprimante 3D (EnvisionTEC Micro Plus HD) à projection de lumière directe (DLP, Direct Light Projection) (Figure 2.9). Elle permet la réalisation de modèles en résine de géométrie complexe avec une résolution de 30  $\mu$ m en x, 30  $\mu$ m en y et 25  $\mu$ m en z.



**Figure 2.9 : Imprimante 3D.** (A) Photo de l'imprimante DLP Envisiontec extraite du site <https://envisiontec.com/>. (B) Schéma de principe de l'imprimante 3D DLP en cours d'impression.

La première étape consiste à réaliser un modèle numérique de l'objet 3D par un logiciel de Conception Assistée par Ordinateur (CAO) tel que Solidworks (Dassault Systèmes) (Figure 2.10A). La principale différence entre le modèle de la puce-tout-plastique et le corps de la puce hybride est l'absence des cônes extrudés en pointe de puce dans le cas de la puce hybride (Figure 2.9B et Figure 2.10). Ces cônes seront, en partie, remplacés par une pointe en verre. Une fois l'objet créé avec SolidWorks, nous utilisons le logiciel fabricant pour virtuellement positionner l'objet sur une plateforme et réaliser une découpe du modèle en fines couches horizontales d'une épaisseur fixe (25 $\mu$ m). Les imprimantes 3D DLP sont construites autour d'un réservoir de résine à fond transparent. Il dispose d'un bras motorisé relié à une plate-forme qui se déplace verticalement dans le réservoir de résine. Au début de l'impression, la plateforme descend au fond du réservoir. Un projecteur illumine ensuite un dispositif de micro-miroir numérique (DMD) qui réfléchit l'image de la couche sur l'ensemble de la plateforme, polymérisant tous les points de la couche simultanément. Ainsi la pièce modélisée se forme, couche par couche, au fur et à mesure que la plateforme monte selon l'axe z. Il y a autant de cycles d'impression que de couches nécessaires à l'obtention du volume complet de la pièce.

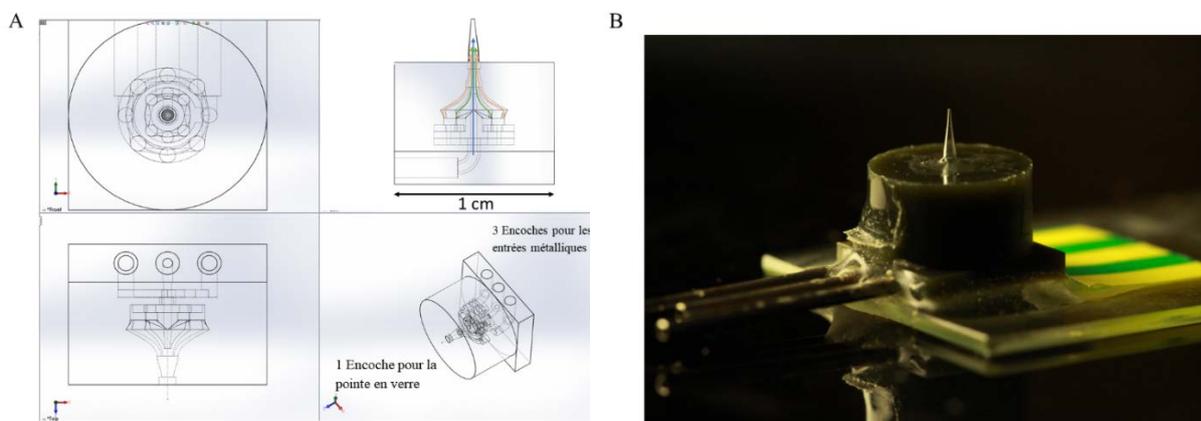
L'étape suivante consiste à nettoyer la pièce imprimée, avec un solvant (2-Propanol = isopropanol = IPA) pour retirer la résine non polymérisée, à la fois par baignade et en injectant l'IPA avec une pissette dans les canaux microfluidiques. Il est en général recommandé de remettre la pièce imprimée dans un four à UV, afin que celle-ci finisse de solidifier. Cependant, afin d'éviter tout bouchage de la puce, nous ne réalisons pas cette dernière étape post traitement qui risquerait de polymériser la résine résiduelle encore liquide au cœur de la puce.

### Fabrication de la partie en verre de la puce

Les pointes en verre sont fabriquées à partir d'un capillaire en borosilicate (CMScientific – CV6084, ID : 0.60mm, OD : 0.84mm) étiré par une étireuse de capillaires (Sutter P-3000). En exerçant une traction sur le verre tout en le chauffant avec une résistance hélicoïdale, le capillaire s'affine jusqu'à la rupture. Cela nous permet de fabriquer de fines pointes d'environ 30  $\mu$ m de diamètre extérieur. Ces pointes sont ensuite coupées le plus court possible (pour

minimiser le temps de contact entre les solutions) et collées (Loctite M31-CL) dans l'encoche de la puce en résine (Figure 2.10). Puis les pointes sont poncées à la main afin d'obtenir un diamètre, en sortie, d'environ 130  $\mu\text{m}$  (papier à grain habituellement utilisé pour les fibres optiques, de 3, 6, et 9  $\mu\text{m}$ , 3M). Il faut ensuite hydrophobiser la surface de la pointe pour éviter le mouillage par le jet et donc la perturbation du flux coaxial. Pour cela nous nettoyons et activons les pointes dans un mélange « piranha » (alcide sulfurique/péroxyde d'hydrogène : 70/30, v/v) pour générer des groupes hydroxyles (-OH) réactifs, qui peuvent ensuite former des liaisons siloxane (Si-O-Si) avec des molécules de silane (1H,1H,1H,2H-perfluorooctyltriméthoxysilane) au cours d'un processus de silanisation en phase gazeuse pendant 45 minutes. La puce est ensuite rincée à de multiples reprises avec de l'éthanol puis de l'eau pure.

Nous obtenons donc un système de co-extrusion de la taille d'une pièce de 20 centimètres (Figure 2.10A) Afin de minimiser la durée de contact entre les différentes solutions dans le flux hybride, la pointe a été coupée la plus courte possible, typiquement 4 mm.



**Figure 2.10 : Puce hybride verre-plastique.** (A) Plan détaillé du corps en résine de la puce réalisé sur Solidworks, avec pour longueur de flèche 1 mm. (B) Photo de la puce hybride avec son corps en résine, ses trois entrées métalliques, sa pointe en verre, le tout collé sur une lame en verre.

### 2.3.3 Module d'encapsulation électro-fluidique

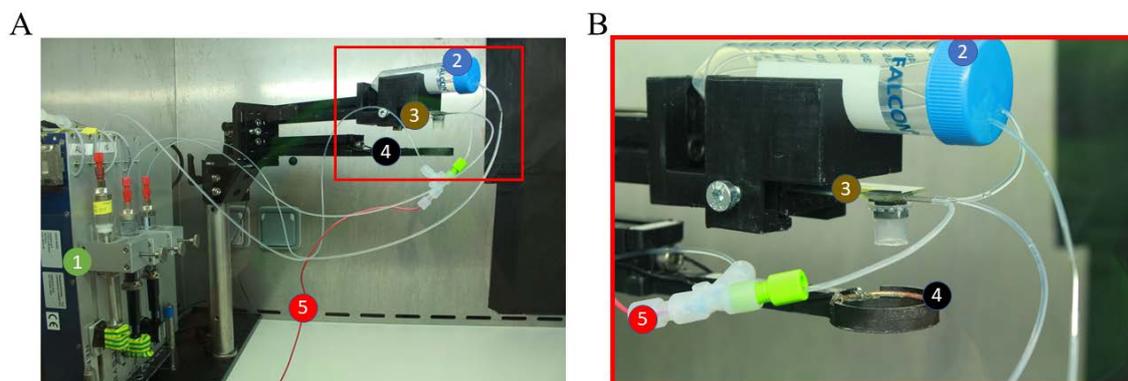
#### Dispositif expérimental

Le dispositif actuel est composé de trois pousse-seringues (NEMESYS Base / BASE 120) (Figure 2.11 et Figure 1.12). La première seringue (AL) contient de l'alginate (FMC Biopolymer) 2% stérilisé par filtration à 0.22  $\mu\text{m}$  (Pall Life Science) et 1.5% de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) en volume comme tensio-actif. La concentration d'alginate a été déterminée en fonction de plusieurs paramètres : i) la coque en formation au contact du calcium doit être suffisamment résistante pour supporter l'impact à la surface du bain ; des concentrations en alginate inférieures à 1% sont difficilement gérables en pratique entre nos mains ; ii) le jet en sortie de puce ne doit pas être trop visqueux. Typiquement, au-delà de 3%, il devient difficile de former des gouttelettes sub-millimétriques et la stérilisation préalable de l'alginate par filtration conduit parfois à la rupture des filtres du fait des trop fortes pressions à appliquer. Une concentration à 2% offre un bon compromis. Alors que la concentration de SDS utilisée initialement dans Bremond et *al* (2010) est proche de la concentration micellaire

critique  $\sim 10$  mM, nous avons réduit cette concentration à 0.5 mM pour éviter une perméabilisation des membranes cellulaires, sans que cela ne provoque de rupture des capsules à leur formation, ni de déformation excessive (voir étude quantitative au paragraphe 2.3.4).

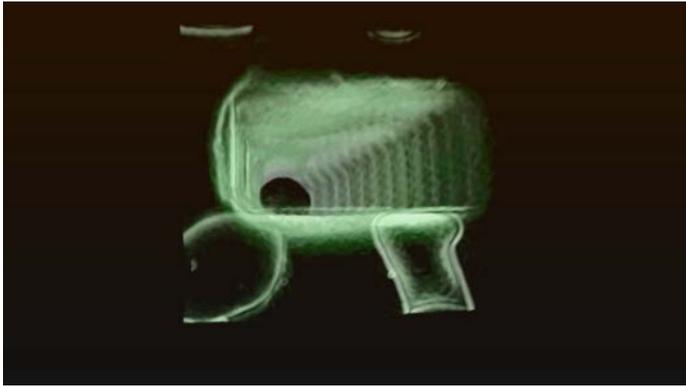
La deuxième seringue (IS) contient du Sorbitol 0.3M stérilisé à l'autoclave. Le sorbitol est un sucre biocompatible utilisé pour deux raisons : i) il permet d'ajuster l'osmolarité des solutions et éviter tout choc osmotique qui réduirait la viabilité cellulaire au moment de l'encapsulation ; ii) contrairement à des sels, il ne contient pas de trace de calcium qui pourrait interagir avec l'alginate et provoquer la réticulation à l'intérieur de la puce. Le rôle de cette solution intermédiaire est donc de créer une barrière composée d'un liquide « inerte » entre les cellules et la solution d'alginate, évitant la diffusion du calcium relargué dans la suspension cellulaire vers la solution d'alginate ainsi que celle du SDS vers la suspension cellulaire.

La troisième seringue (CS) contient elle aussi du sorbitol stérilisé. Elle contenait à l'origine directement la suspension cellulaire. Cependant, pour réduire le volume de suspension cellulaire à environ 200 $\mu$ l (ce qui évite de travailler avec un nombre de cellules trop important, nous avons modifié le système de chargement permettant ainsi de charger la suspension cellulaire directement dans le tube en Téflon du réservoir (Figure 2.11, numéro 2), en amont de l'entrée de puce. Le sorbitol, de la seringue CS, a donc pour rôle de pousser la suspension cellulaire jusqu'à la puce d'encapsulation.



**Figure 2.11 : Dispositif d'encapsulation.** (A) Image du dispositif d'encapsulation dans une PSM. En 1, le pousse seringue avec la seringue d'alginate (AL) à gauche, la seringue intermédiaire (IS) au milieu, et la seringue de suspension cellulaire (CS) à droite. Toutes les seringues sont reliées à la puce 3 d'encapsulation par des tubes en téflons. En 2 le falcon 50ml jouant le rôle de réservoir frigorifique. En 4 l'anneau relié à la masse d'un générateur électrique. En 5 le câble électrique connecté à la borne positive du générateur électrique et en contact avec la solution d'alginate. (B) Zoom sur la puce d'encapsulation.

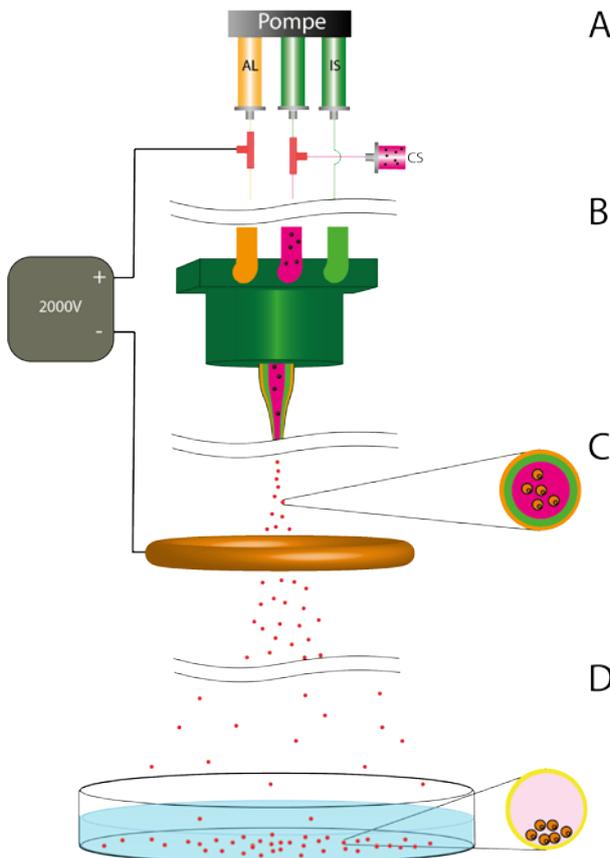
Les différentes étapes d'encapsulation sont présentées dans la Vidéo 1 :



**Vidéo 1: Rendu 3D d'un puits d'agarose réalisé avec un tampon type Universlide.**  
(voir vidéo).

Les débits imposés dans les 3 seringues doivent être suffisamment élevés pour qu'un jet soit formé et pas trop élevés pour que l'instabilité de Rayleigh se produise bien au cours de la chute libre avant l'impact avec le bain de calcium. Pour une puce de diamètre de sortie 130  $\mu\text{m}$  que nous avons utilisée pour la plupart des expériences, des débits  $Q_{\text{IS}}=Q_{\text{CS}}=20\text{mL/h}$  et  $Q_{\text{AL}}= 30\text{ mL/h}$  ont été sélectionnés.

A la différence du dispositif initial, le jet formé en sortie de puce est chargé électriquement (Figure 2.12), comme cela a été aussi rapporté (Trushko et al., 2020). Pratiquement, le fluide de coque (i.e. l'alginate) est alimenté par la jonction d'un câble en Téflon. Un câble électrique le relie à un générateur de tension continue (EMI Photomultiplier Power Supply PM28B). L'électrode est reliée directement à la terre. Cette électrode est un anneau en cuivre de 5 cm de diamètre. Les tensions imposées sont de 2kV dans des conditions standards d'encapsulation.



**Figure 2.12 : Schéma du dispositif d'encapsulation.** (A) Système d'injection avec le pousse-seringue contenant les différentes solutions : AL (alginate) reliée à la borne positive du générateur, IS (solution intermédiaire) correspondant au sorbitol et CS la suspension cellulaire. (B) Puce d'encapsulation. (C) Electrodispersion avec l'anneau en cuivre relié à la borne négative du générateur. Zoom sur une capsule contenant les différentes couches de solution. (D) Bain de calcium, avec zoom sur une capsule réticulée dans le bain.

### Retour sur l'instabilité de Rayleigh

L'instabilité de Rayleigh génère un train de gouttelettes de rayon équivalent au diamètre de sortie de buse (Tomotika, 1935). Dans une expérience typique, le débit total d'injection est  $Q_{\text{total}} = 70$  ml/h et le rayon des capsules expérimentalement de l'ordre de  $120 \mu\text{m}$ . Nous produisons ainsi environ 2500 capsules par seconde, soit environ 100 000 capsules par encapsulation.

D'un point de vue théorique, le rayon d'une goutte est déterminée par le mode de croissance le plus rapide de l'instabilité de Rayleigh, à savoir  $2\pi/\lambda$ , où  $\lambda$  est proportionnel au diamètre du jet de fluide  $d_{\text{jet}}$  pour un contraste de viscosité donné (Tomotika, 1935), la conservation du volume entre un cylindre de longueur  $\lambda$  et de section  $\frac{\pi d_{\text{jet}}^2}{4}$  et une goutte de rayon  $R$  conduit à  $R \approx d_{\text{jet}}$ . Cela est bien obtenu qualitativement puisque dans les expériences de la Figure 14, le rayon intérieur moyen était de  $109 \mu\text{m} \pm 12 \mu\text{m}$ , et l'épaisseur de coque de l'ordre de  $15 \mu\text{m}$  (soit un rayon externe de  $124 \mu\text{m}$ ), alors que le capillaire de la puce dont avait un diamètre de sortie de  $130 \mu\text{m}$ .

Comme cette instabilité est spontanée (non déclenchée), la longueur d'onde n'est pas fixée strictement et les gouttelettes générées présentent de légères variations de tailles, suffisantes pour qu'une gouttelette plus grosse en rattrape une plus petite au cours de la chute, entraînant des événements de coalescence et l'apparition d'une distribution élargie de tailles ainsi que la formation de capsules elliptiques comme cela a été rapporté dans (Alessandri et al., 2013). Pour éviter cela et améliorer la distribution de taille des capsules, nous avons ajouté un champ électrique en sortie de puce. L'objectif est de charger les gouttes et de générer des répulsions électrostatiques entre elles, ce qui les disperse latéralement en éventail, réduisant ainsi la fréquence d'événements de coalescence en vol.

### Retour sur l'influence du champ électrique

Contrairement à (Fenn et al., 1990; Xie et al., 2006), dont le but est l'atomisation des liquides au moyen de forces électriques et donc la génération de gouttelettes nanométriques, la tension appliquée ici vise seulement à générer, après fragmentation du jet, un spray conique de gouttelettes chargées.

La Figure 14 résume les différents modes électrohydrodynamiques pour la génération de gouttelette en fonction du nombre de Weber et le nombre de Bond électrique (Rosell-Llompart et al., 2018). Le nombre de Weber défini par  $We = \frac{\rho Q^2}{(d_j^2 d_g \gamma)}$ , représente la compétition entre la force d'inertie du jet et la force de tension superficielle, avec  $Q$  le débit en sortie de puce,  $\gamma$  la tension de surface de la solution,  $\rho$  la masse volumique de la solution,  $d$  le diamètre des gouttelettes formées,  $d_j$  le diamètre du jet. Le nombre Bond électrique est défini par  $Bo_e = \frac{\epsilon_0 V^2}{d \gamma}$ , qui lui représente la compétition entre les forces électrique et la tension superficielle, avec  $\epsilon_0$  la permittivité du vide et  $V$  la tension appliquée.

En fonction de la valeur de ces nombres nous avons différents modes de formation de gouttelettes (Figure 2.13).

- Pour  $We < 1$  et  $Bo_e < 1$ , le régime est dit « electro-dripping », aucun jet ne se forme, les gouttes se détachent de la buse de manière périodique.
- Pour  $We < 1$  et  $Bo_e \approx 1$ , Le régime est dit « spindle », la goutte suspendue en sortie de buse va former un ménisque qui croit et s'étire tout en éjectant de fines gouttelettes chargées d'un jet conique stationnaire qui se fragmente.
- Pour  $We > 1$  et  $Bo_e$  de l'ordre de 1, Le régime est dit « simple jet ». La génération de gouttelettes se fait alors par instabilité de Plateau-Rayleigh.
- Pour  $We > 1$  et  $Bo_e \gg 1$ , Le mode est dit « Whipping Jet ». Le jet subit alors des déplacements latéraux, qui sont amplifiés dans l'écoulement, créant des motifs irréguliers « fouettés ». Le jet se brise irrégulièrement car le fouettement interfère avec la croissance des ondes capillaires.

Dans notre cas, avec  $d = 240 \mu\text{m}$ ,  $d_j = 130 \mu\text{m}$ ,  $\rho = 10^3 \text{ kg/m}^3$ ,  $\gamma = 50 \text{ mN/m}$ , nous avons  $We \approx 2$ . De plus, pour  $V = 2 \text{ kV}$ ,  $Bo_e \approx 3$ . Nous sommes donc bien a priori dans un régime simple jet.

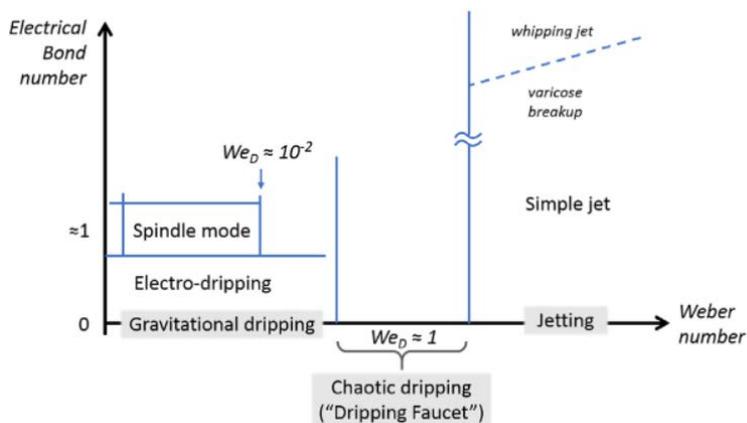


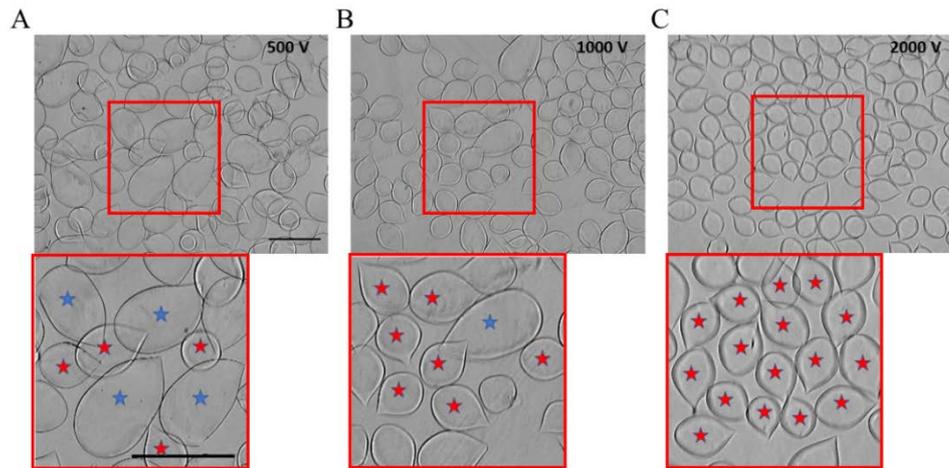
Figure 2.13 : Différents régimes électrohydrodynamiques en fonction des paramètres  $We$  et  $Bo_e$ . Extrait de (Rosell-Llompарт et al., 2018).

Une fois le champ appliqué, les gouttelettes multi couches tombent et réticulent dans un bain de calcium, préalablement stérilisé dans un autoclave, situé à 20- 25 cm de la puce. Cette distance a été déterminée empiriquement. En effet, si la puce est trop proche du bain, la répulsion coulombienne n'a pas le temps de disperser les gouttelettes, générant ainsi, des coalescences.

### 2.3.4 Caractérisation morphométrique des capsules

La Figure 2.14 montre des images en fond clair d'échantillons de capsules vides produites avec une puce dont l'extrémité du capillaire a un diamètre de  $130 \mu\text{m}$ . Nous avons conduit une caractérisation morphométrique de ces capsules en fonction de la tension électrique appliquée sans changer les autres paramètres d'ajustement.

Nous constatons la présence de grosses capsules de section approximativement elliptique, suggérant des événements de coalescence dans les conditions 500 et 1000 V (Figure 2.14A et B) Celles-ci sont beaucoup plus rares dans la condition 2000 V (et même absentes sur l'échantillon représentatif de la Figure 2.14C).

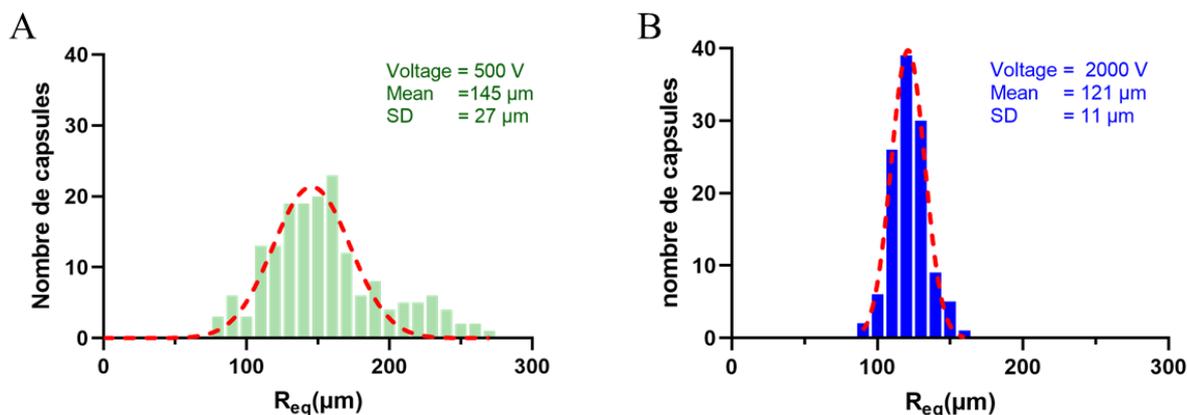


**Figure 2.14 : Images de capsules en fonction du champ électrique appliqué.** (A) Images de capsules en champ clair produites à 500V, (B) à 1000V, (C) à 2000V. Les astérisques bleus soulignent des capsules issues d'une coalescence, les astérisques rouges montrent des capsules de taille « attendue ». Barre d'échelle 500µm.

Pour être plus quantitatif, nous avons déterminé la taille et la sphéricité des capsules à 500 V et 2000V en analysant environ 100 capsules. Comme rapporté précédemment par Alessandri et al (2013), les capsules présentent des « queues » dues à l'impact du bain de calcium. En effet, après l'entrée de la capsule dans le bain, l'interface air/bain de réticulation se referme en étirant la coque dans le sens inverse de sa chute. Nous avons mesuré la surface de la paroi externe de la capsule pour en déduire un rayon moyen. Pour cela, nous avons manuellement segmenté chaque capsule en ne prenant pas en compte leur queue.

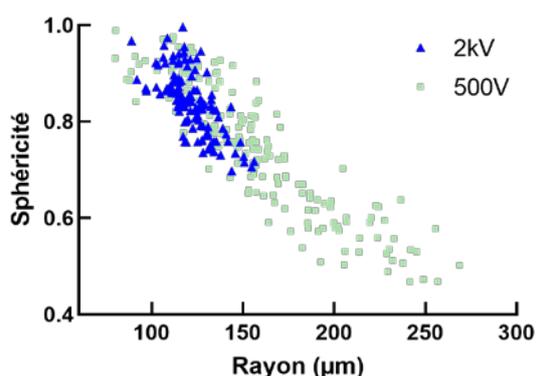
Comme le montre l'histogramme de la Figure 2.15A, la distribution des tailles de capsules formées à 500V est plus large que celle à 2000V. Un ajustement gaussien de la distribution à 500V n'est pas très bon, ce qui suggère l'existence de plusieurs modes. Outre le mode principal centré autour de 145µm, Les queues de la distribution correspondent a priori aux autres modes conduisant aux fractions des gouttes coalescées et des satellites liés à un effet non-linéaire lors de la rupture du jet (Eggers and Villermaux, 2008).

En revanche, avec une tension de 2kV (Figure 2.15B), la distribution est remarquablement fine et unimodale. Nous n'avons pas trouvé explication physique pour laquelle ces satellites n'étaient pas présent à 2000V avec cette puce. L'ajustement gaussien donne un rayon moyen autour de 121 µm et une demi-largeur à mi-hauteur de 11 µm. Cela confirme que les effets de coalescence ont bien été considérablement réduits par le champ électrique. Notons aussi que les capsules pourtant réalisées avec la même puce de diamètre 130 µm, sont un peu plus petites que pour la tension de 500V, ce qui suggérerait que, bien que l'on ne se situe pas dans le régime d'électro-pulvérisation, le jet liquide est affiné par l'application de 2kV.



**Figure 2.15 : Histogramme du rayon équivalent des capsules en fonction de la tension appliquée.** A)  $V= 500$  V avec un ajustement gaussien (ligne pointillée rouge) correspondant au mode principal pour  $N=188$  (voir texte pour détails), (B)  $V= 2000$  V avec un ajustement gaussien (ligne pointillée rouge) pour  $N=118$  capsules.

Nous nous intéressons maintenant à la sphéricité définie par  $S = \frac{\text{Petit axe}}{\text{Grand axe}}$ , de manière à ce que la valeur maximale  $S = 1$  soit obtenue pour la sphère. Ce paramètre est calculé automatiquement par l'outil « mesure » de ImageJ lors de la segmentation de la capsule. Nous avons tracé la sphéricité en fonction du rayon des capsules pour les deux conditions de champ électrique (Figure 2.16). Nous observons que, dans le cas d'une tension à 2kV, 67% des capsules ont une sphéricité comprise entre 0.8 et 1. Alors que dans le cas d'une tension à 500V, seulement 36% des capsules se trouvent dans cet intervalle. On note également que la sphéricité augmente lorsque la taille des capsules diminue. La dépendance en rayon pourrait s'expliquer par le fait que les plus petites gouttes ont le temps de relaxer vers une forme sphérique (favorisée par la tension de surface mais défavorisé par la viscosité de l'alginate) au cours de leur chute libre ou que l'impact sur la surface du bain de calcium les déforme moins que les plus grosses.



**Figure 2.16 : Caractérisation morphométrique des capsules d'alginate en fonction de la tension appliquée.** Sphéricité versus Rayon pour  $V= 500$ V,  $N=188$  (vert) et  $V= 2$ kV,  $N= 118$  (bleu).

### 2.3.5 Protocole d'encapsulation

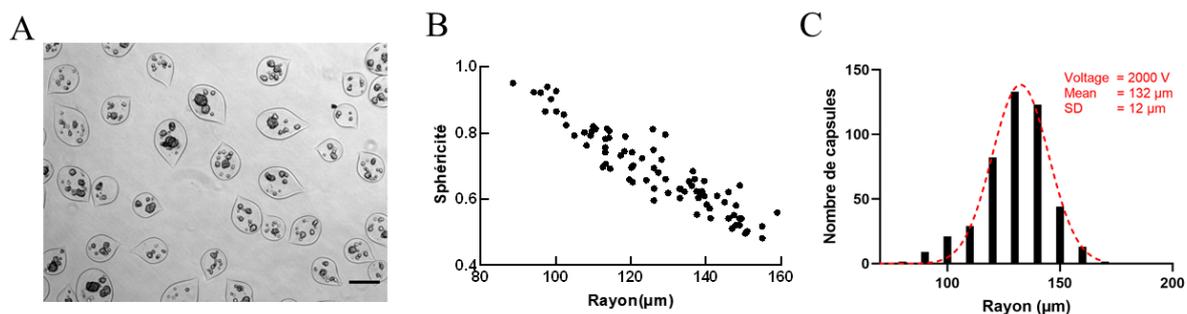
Les cellules 3T3-F442-A sont cultivées en milieu non-adipogénique selon le protocole de la section 2.1.1. Les cellules contenues dans deux flasques T75 (soit environ  $1,4 \cdot 10^6$  cellules au total) sont détachées avec de la Trypsine-EDTA à 0,5% (Dutscher X0930-100) et transférées dans un tube Falcon de 15 mL. Nous les centrifugeons ensuite ( $300 \times g$ , 3 minutes,  $20^\circ\text{C}$ ) dans

leur milieu de culture non adipogénique. Nous transférons le culot de cellules dans un tube Eppendorf de 0.5 mL et nous ajustons le volume afin d'avoir un volume final, de 200  $\mu$ l. La suspension est ensuite injectée dans le tube en amont du réservoir (Figure 2.11) du dispositif d'encapsulation.

Après avoir placé le bain de calcium stérile sous la puce, le pousse seringue et le champ électrique sont activés. Le jet est contrôlé minutieusement. La moindre irrégularité ou déviation du jet est signe d'un bouchage de la puce. Il faut alors arrêter le système afin de nettoyer rapidement la puce pour éviter toute réticulation non souhaitée de l'alginate au contact du milieu de culture dans le corps de la puce. Cette opération doit se dérouler le plus rapidement possible pour ne pas laisser les cellules sédimenter dans la tubulure d'injection.

Nous récupérons ensuite les capsules du bain de calcium en les transvasant avec un filtre de 40  $\mu$ m (Cell strainers, VWR, 732-2757) dans un tube Falcon de 50 ml. Une fois les capsules égouttées, nous les remettons en suspension dans le milieu approprié. Nous les passons directement dans la centrifugeuse à 1500 g pendant 6 minutes (section 2.3.7). Nous laissons ensuite reposer les capsules une heure dans l'incubateur avant de les répartir dans deux flacons contenant le milieu de culture standard.

D'un point de vue physique, l'ajout de cellules pour l'encapsulation dans le fluide interne en nombre assez faible ( $7.10^6$  cellules /ml, soit en moyenne <20 cellules par capsule), ne modifie pas la viscosité du fluide, et aucune variation de forme ni de taille des capsules n'est attendue. Pourtant, notre expérience avec des types cellulaires variés nous a montrés que la nature des cellules (par exemple la rapidité à laquelle les cellules adhèrent entre elles après trypsinisation) peut altérer la formation des capsules. Nous avons encapsulé des préadipocytes 3T3-F442A en utilisant la même puce que celle utilisée dans la section précédente pour produire des capsules vides. Nous avons utilisé une concentration cellulaire de  $7.10^6$  cellules/ml (Figure 2.17A), un champ électrique de 2kV et nous n'avons pas réalisé de centrifugation (voir Section 2.3.7). Nous avons analysé la morphométrie des capsules selon la même approche (Figure 2.17B). Nous conservons bien une distribution unimodale (Figure 2.17C). Le rayon moyen est de  $\sim 132$   $\mu$ m alors qu'il était de  $\sim 121$   $\mu$ m pour les capsules vides, et la largeur de la distribution est toujours de  $\sim 12$   $\mu$ m. En revanche, la présence des cellules semble diminuer la sphéricité puisque 50% des capsules ont une sphéricité comprise entre 0.75 et 0.95 (contre 92% pour les capsules vides). Cependant, on observe que plus les capsules sont grosses, moins elles sont sphériques.



**Figure 2.17: Encapsulation de pré-adipocytes : distribution des tailles de capsules et de leur sphéricité à 2kV . (A) Image prise en champ clair quelques heures après l'encapsulation de pré-adipocytes 3T3-F442A. Barre d'échelle 200 $\mu$ m. (B) Graphique représentant la sphéricité des capsules en fonction de leur rayon. (C) Histogramme**

du rayon équivalent des capsules.

### 2.3.6 Capsules à petit et grand cœur : modulation de l'épaisseur de la coque

Une des spécificités de la technologie des capsules cellulaires est la possibilité de produire des capsules creuses à épaisseur de coque variable. L'épaisseur de la coque est un paramètre que nous utiliserons par la suite.

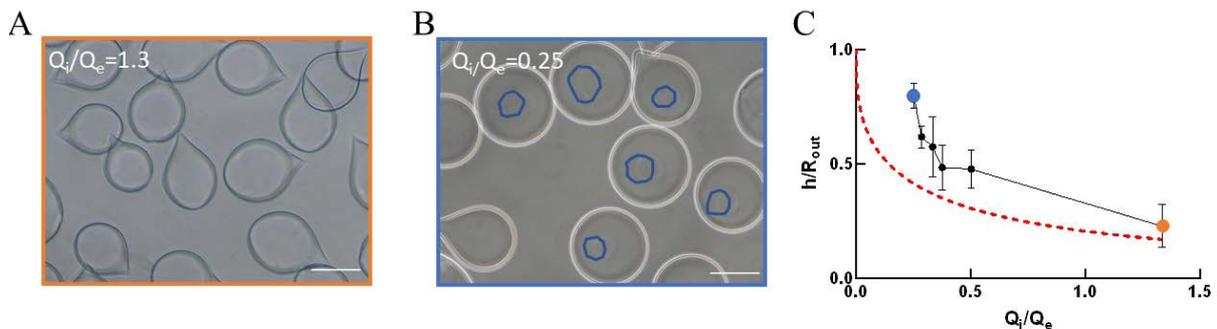
On définit le rapport d'aspect des capsules par  $\rho = h/R_{out}$ . Avec  $h$  l'épaisseur de la coque et  $R_{out}$  le rayon extérieur de la capsule. Ce rapport d'aspect peut être modulé simplement en jouant sur les débits des différents fluides. On note  $Q_e$  le débit du fluide extérieur (AL),  $Q_i$  le débit cumulé de la couche intermédiaire (IS) et de la suspension cellulaire (CS). A partir de la conservation du volume, la valeur théorique calculée du rapport d'aspect de la capsules est donné par (Alessandri et al., 2013).

$$\frac{h}{R_{out}} = 1 - \left( \frac{\frac{Q_i}{Q_e}}{1 + \frac{Q_i}{Q_e}} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (4)$$

Nous avons comparé cette valeur théorique  $h/R_{out}$  avec les données expérimentales.

Comme on le voit sur la Figure 2.18, sur une même capsule,  $h$  n'est pas strictement constante : la coque est plus épaisse du côté de la pointe de la capsule que du côté opposé. Pour avoir une estimation de la valeur moyenne de  $h$ , nous avons mesuré les surfaces interne et externe de la coque pour en déduire les rayons équivalents et leur différence. Sur les photos de la Figure 2.18A et B, on vérifie bien visuellement que la coque s'épaissit lorsque  $Q_i/Q_e$  diminue.

Plus quantitativement, la courbe de la Figure 2.18C montre cette évolution sur une gamme de débits permettant de varier  $\rho$  de 0.2 à 0.8. Cela signifie que pour des rapports de débit de l'ordre de 1.3, la coque peut être aussi fine que  $18 \mu\text{m}$  pour une capsule de rayon  $R=90 \mu\text{m}$ , tandis que des rapports  $Q_i/Q_e$  de l'ordre de 0.2 vont conduire à des épaisseurs de  $92 \mu\text{m}$  pour une capsule de  $R=114 \mu\text{m}$ . Nous appellerons ces deux conditions extrêmes les capsules à petit cœur (ou coque épaisse) et les capsules à grand cœur (ou coque fine) au chapitre 2.2. Notons que la courbe expérimentale suit bien la même tendance que la courbe théorique (Figure 2.18C). Toutefois, toutes les valeurs de  $h/R_{out}$  sont supérieures aux valeurs attendues pour un débit donné.



**Figure 2.18: Influence des débits sur le rapport d'aspect.**  $\rho = h/R_{out}$ . (A) et (B) Image en champ clair de capsules creuses pour différents rapports de débits. (A) Capsules à coque fine ; (B) capsules à coque épaisse. Surligné en bleu, la paroi interne des capsules. (C) Courbe de l'évolution du rapport d'aspect  $h/R_{out}$  en fonction du rapport  $Q_i/Q_e$ . Données expérimentales la courbe noires et les valeurs théoriques en rouge. Le point orange correspondant aux capsules à coque fine et le point bleu aux capsules à coque épaisse. Barre d'échelle,  $200\mu\text{m}$ .

Cette observation est assez contre-intuitive. En effet, la réticulation d'un gel s'accompagne d'un processus de synérèse, dû à la contraction de l'hydrogel et l'expulsion d'une fraction d'eau (Nguyen et al., 2004). Aussi, le volume occupé par le gel devrait être inférieur au volume de la solution de départ. Nous devrions donc avoir une épaisseur expérimentale inférieure à celle théorique. Une explication possible serait l'apparition d'un phénomène de convection au sein de la capsule, généré lors de l'impact dans le bain de calcium entraînant un « mélange » partiel du cœur de la capsule avec le bord interne de la coque avant gélification. D'autre part, la réticulation de l'alginate se produisant de l'extérieur vers l'intérieur de la capsule, un gradient de réticulation et une dilution partielle de l'alginate peuvent apparaître. D'ailleurs, cet effet pourrait expliquer que les parois internes sont moins bien définies (délimitation bleue Figure 2.18B). Pour confirmer cela, nous avons remarqué que le cœur liquide de la capsule, pour  $Q_i/Q_e \leq 0.25$  disparaît, laissant place à une bille pleine d'alginate, alors que le calcul théorique prévoit un rapport  $h/R_{out}$  de 0.42, soit un cœur d'environ  $50\mu\text{m}$  pour une capsule de  $120\mu\text{m}$ . Notons aussi que la différence entre théorie et expériences est moins marquée pour les capsules à coque fine car la réticulation est plus rapide.

Pour la suite des expériences, nous utiliserons un rapport  $Q_i/Q_e=1.3$  pour les capsules à grand cœur et un rapport  $Q_i/Q_e= 0.25$  pour les capsules à petit cœur.

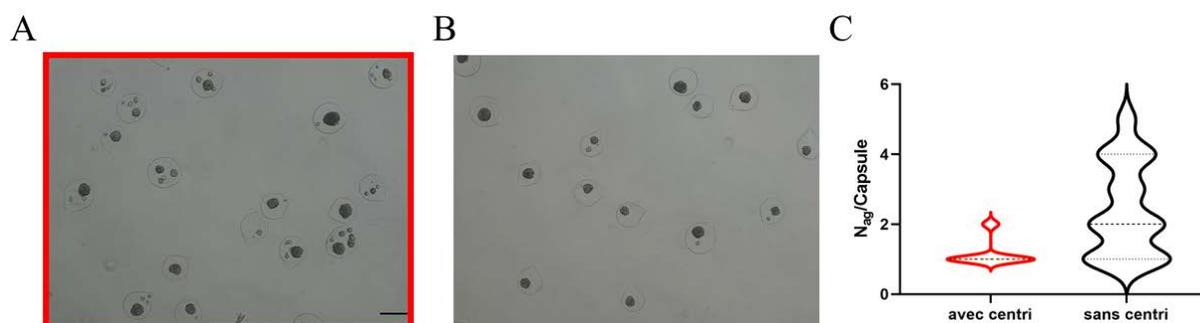
### 2.3.7 Stratégie de formation d'agrégats cellulaires uniques par capsule

Malgré la présence de petits agrégats cellulaires (voir Figure 2.17A), la plupart des cellules en suspension sont isolées après l'encapsulation. Par division, elles peuvent former des agrégats qui grossissent séparément (Figure 2.19A). Cela complique significativement l'analyse d'images lorsqu'il s'agit de suivre la dynamique de croissance d'agrégats individuels. En effet, le but est d'effectuer les mesures sur la plus grande gamme de tailles possible, sans avoir à tenir compte des effets de coalescence tardive.

Nous avons trouvé un moyen de favoriser la présence d'un seul agrégat par capsule. Il faut pour cela augmenter la probabilité de contact entre cellules pour provoquer leur adhésion et éviter les cellules isolées engendrant la nucléation d'autres agrégats. En pratique, nous avons centrifugé les capsules juste après encapsulation pour accélérer la sédimentation des cellules. Toutefois, comme les capsules sont affectées par les forces centrifuges, qui peuvent les déformer, nous avons réalisé plusieurs tests pour déterminer de façon semi-qualitative la vitesse et la durée de centrifugation optimales.

Les capsules récupérées du bain de calcium après encapsulation et transférées dans un tube Falcon de 50 ml sont centrifugées à 1500 tours/minute pendant 6 minutes. Le tube est placé dans un incubateur en position verticale pendant 30 minutes. Nous transférons ensuite délicatement les capsules dans une flasque T75 que nous remettons dans l'incubateur. Après 1 heure, nous les analysons.

La Figure 2.19 résume les résultats obtenus. Nous pouvons remarquer que seulement (32%) des capsules renferment un seul agrégat si les capsules de pré-adipocytes n'ont pas été centrifugées. En revanche, quand nous avons centrifugé les capsules, la différence est nette, puisque 85% des capsules ne contiennent qu'un agrégat multicellulaire.



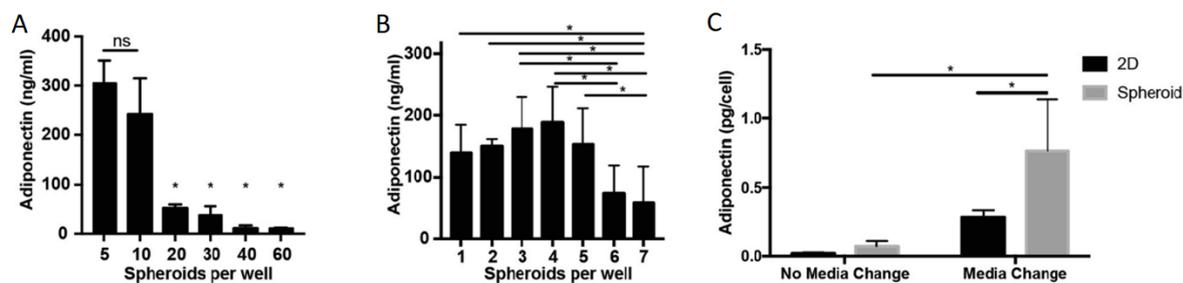
**Figure 2.19 : Effet de la centrifugation sur le nombre d'agrégats par capsule.** (A) Image de capsules prises en champ clair deux jours après encapsulation sans centrifugation. (B) Image de capsules deux jours après encapsulation, mais préalablement centrifugées à 1000G pendant 6 minutes un jour avant. (C) Pourcentage du nombre de capsules en fonction du nombre d'agrégats par capsule avec et sans centrifugation.

## 2.4 Microfabrication de micro-puits pour capsules

### 2.4.1 Sensibilité environnementale des préadipocytes

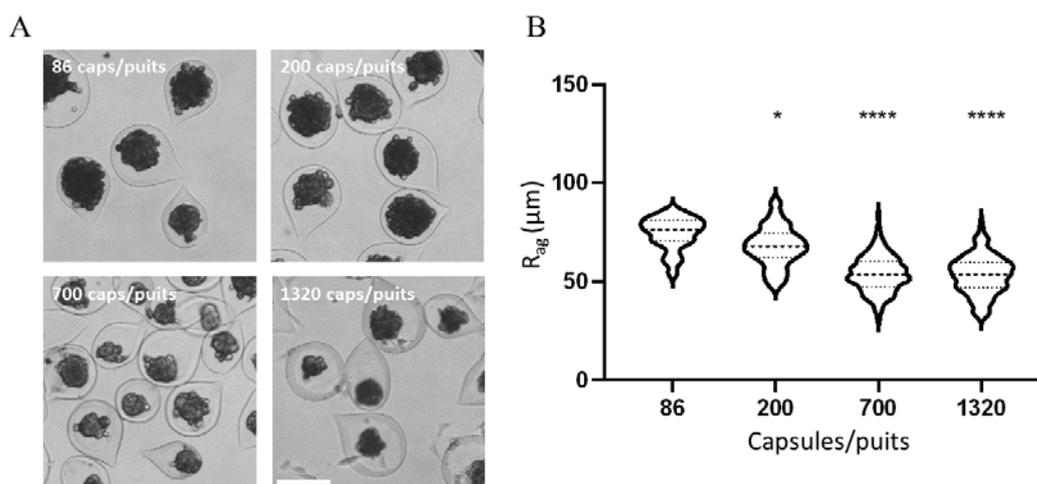
Les agrégats de pré-adipocytes sont biologiquement actifs et sécrètent des facteurs spécifiques adipeux (Chapitre 1, section 1.3.1). Il a été montré que ces activités hormonales sont perturbées par des densités cellulaires élevées (Klingelhutz et al., 2018). La génération d'un stress métabolique apparaît lorsque le nombre de sphéroïdes dans un même puits augmente. En effet, plus la densité cellulaire est élevée, plus la disponibilité locale en nutriment est affectée. Bien que le tissu adipeux ait été historiquement considéré comme un simple stockage d'énergie, ce concept a été révisé après la découverte de la leptine, la première cytokine dérivée des adipocytes, par le groupe de Friedman en 1990 (Leibel et al., 1990). La libération de leptine en réponse à des changements de l'état nutritionnel indique que le tissu adipeux agit comme un organe endocrine impliqué dans la modulation de l'homéostasie énergétique (Friedman et al., 1991; Zhang et al., 1994). Depuis cette découverte, d'autres cytokines, hormones et peptides sécrétés par les adipocytes, collectivement appelés « adipokines », ont été identifiés et ont fait l'objet de recherches intensives sur leur rôle dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Rondinone, 2006).

Klingelhutz et al ont observé que le fait d'avoir trop de sphéroïdes dans un puits génère des conditions de stress qui réduisent la sécrétion d'adiponectine. Ils ont mis en évidence une relation inverse entre le nombre de sphéroïdes par puits et le niveau de sécrétion d'adiponectine (Figure 2.20A). Un phénomène similaire d'entassement des adipocytes conduisant à un dysfonctionnement adipeux est observé dans le cadre de l'obésité (Kusminski et al., 2016). Dans d'autres expériences, ils ont constaté que 3-5 sphéroïdes d'environ 130 $\mu\text{m}$  de rayon dans 2 ml de milieu, avec des changements de milieu tous les 3 jours, donnaient les niveaux les plus élevés d'adiponectine sécrétée détectable (Figure 2.20B).



**Figure 2.20: Sensibilité des sphéroïdes adipeux (3T3 L1) à la surpopulation : effet de la production d'adiponectine par rapport à la culture 2D.** (A) Chute du niveau d'adiponectine lorsque le nombre de sphéroïdes cultivés ensemble dans un puits passe de 5 à 60 pour un volume de milieu compris entre 0.5 à 1 mL. (B) idem avec des densités d'ensemencement plus faibles. La sécrétion d'adiponectine atteint un pic à 4 sphéroïdes par puits. (C) Comparaison de la production d'adiponectine sur une période de 24 heures après 10 jours de culture avec changement de milieu tous les 3 jours en utilisant des cellules ensemencées dans du plastique de culture tissulaire en 2D ou sous forme de sphéroïdes d'adipocytes dans des plaques à très faible liaison. Extrait de (Klingelutz et al., 2018)

Ces résultats publiés ont été obtenus avec la lignée 3T3 L1 de préadipocytes (Klingelutz et al., 2018). Nous avons cherché à voir si un effet similaire avait lieu avec la lignée de 3T3-F442A. Sur une même encapsulation, nous avons réparti les capsules dans 4 puits, avec un nombre variable de capsules par puits. Plus précisément, nous avons placé respectivement 86, 200, 700 et 1320 capsules/puits dans 3ml de milieu que nous avons ensuite cultivées pendant 8 jours. Nous remarquons (Figure 2.21) que le rayon moyen des agrégats  $R_{ag}$  reste sensiblement constant à faible densité de capsules, de l'ordre de  $70 - 75 \mu m$ . En revanche, à partir de 700 capsules/puits,  $R_{ag}$  diminue significativement, à  $\sim 52 \mu m$ , indiquant une croissance volumique des agrégats ralentie. Nous avons donc fait en sorte de ne pas dépasser le seuil de 200 capsules/3 mL dans nos expériences à venir.



**Figure 2.21 : Croissance des agrégats de 3T3 F442 2A en fonction du nombre de capsules.** (A) Images en champ clair, au jour 8, de chaque puits contenant respectivement 86 capsules, 200, 700 et 1320 dans 3 mL de milieu. Barre d'échelle :  $200\mu m$ . (B) Représentation graphique de la distribution des tailles de capsules en fonction du nombre de capsules par puits, et test statistique de la variance (one-way ANOVA) par rapport à la première distribution.

## 2.4.2 Moulage de micro-puits pour adressage des capsules

Pour déterminer la cinétique de croissance des agrégats pré-adipocytaires, il faut : 1/ imager les

capsules en champ clair sur plusieurs de jours, 2/ mesurer la taille des agrégats à intervalle de temps régulier 3/ distinguer les régimes de croissance libre et post-confluente. La difficulté pratique de ce dernier point vient du fait que, puisque la densité initiale de cellules dans chaque capsule diffère légèrement, la confluence n'est pas synchronisée dans toutes les capsules. Une étude basée sur une population de capsules prises aléatoirement en champ large dans une flasque permet d'obtenir facilement un grand nombre de données. Mais, encore une fois, en pratique, puisque ce suivi sera conduit sur 20 jours environ, il nécessitera des changements de milieu réguliers (tous les 2-3 jours). Chaque remplacement de milieu entraîne des effets de convection qui redistribuent les capsules dans la flasque et empêchent tout suivi individuel des capsules.

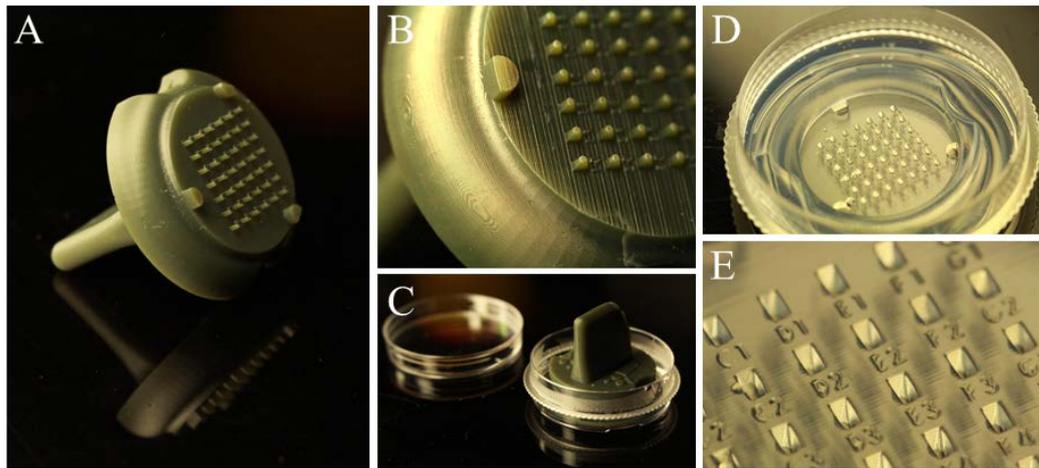
Pour surmonter cette difficulté, nous avons sélectionné manuellement les capsules pour éliminer les trop petites, les trop grandes, les trop remplies ou les trop peu remplies. Pour suivre individuellement les capsules, nous avons utilisé un dispositif inspiré de l'*UniverSlide* (Alessandri et al., 2017). Il s'agit d'une chambre d'observation multi-usages adaptée à la bio-imagerie 3D sur échantillons vivants, développée dans l'équipe (Figure 2.22). Ce dispositif, qui a l'avantage d'être compatible avec tous les statifs de microscopes, droits ou inversés, permet le criblage à moyen débit et l'acquisition automatisée d'images multi-positions, en fournissant une immobilisation stable et parallélisée des échantillons.

La base de l'*UniverSlide* est une partie imprimée en résine. Elle est conçue pour accueillir une lamelle en borosilicate ( $24 \times 50 \text{ mm}^2$ ) qui recouvre la partie ouverte au fond du cadre. Afin d'éviter tout risque de toxicité, aucune colle n'est utilisée, seul un joint rectangulaire flexible en PDMS vient maintenir et étanchéifier le tout. Ce joint en PDMS est fabriqué à partir de moules en résine que nous avons imprimé en 3D et clipsé dans la base de la chambre entre le verre et les bords de la chambre. De l'agarose (2%) est ensuite coulé dans le fond de la chambre recouvrant ainsi toute la surface de la lamelle en borosilicate. On pose le tampon en résine sur l'agarose (Figure 2.22B) environ 30 minutes, puis le tampon est retiré, laissant place au puits d'agarose (Figure 2.22D). La chambre est ensuite remplie avec un milieu de culture qui imbibe tout l'agarose et remplit les micro-puits dans lesquels sont chargés les échantillons. Après avoir placé le couvercle pour éviter une évaporation excessive et maintenir la stérilité, la chambre est prête à être utilisée en microscopie.



**Figure 2.22 : UniverSlide** . (A) Dessin 3D des différentes parties de la chambre, comprenant le cadre principal de la chambre [1], la lamelle inférieure [2], le tampon d'agarose [3], le joint en PDMS [4] et enfin le cadre du couvercle [5]. (B) *UniverSlide* avec son bloc d'agarose fabriqué à partir d'un tampon en résine imprimé en 3D. (C) Gros plan des motifs du tampon imprimé en 3D. (D) zoom sur les puits d'agarose gélifiés. (E) Dessin technique du motif avec pour caractéristique son bout rond de 300µm de diamètre en prolongement d'une pente douce (prise à 67,5° par rapport à l'axe vertical). (F) Rendu 3D des puits d'agarose après marquage par fluorescence de l'agarose avec du Dextran (voir Vidéo 2). Extrait de (Alessandri et al., 2017)

Dans notre cas, il est nécessaire de faire faire des allers-retours à nos échantillons quotidiennement entre l'incubateur et le microscope sur une longue période (~20 jours). Ces nombreuses manipulations de la chambre génèrent des fuites (notamment si le milieu mouille le couvercle), risquant ainsi de contaminer nos échantillons avant la fin de la manipulation. Nous avons donc remplacé la chambre de l'*UniverSlide* par une boîte de pétri 35mm et modifié le tampon en résine (Figure 2.23). L'écartement des motifs du tampon étant plus petit, cela nous permet d'imager deux puits d'agarose à la fois avec un objectif 10x donnant un champ de vue de 1.3 mm<sup>2</sup>. Les bords sont lissés afin de faciliter le retrait du tampon de l'agarose (Figure 2.23). Ce nouveau tampon est maintenant commercialisé sous le nom de « Stampwell » par Idylle (<https://www.idylle-labs.com/stampwell-by-mountn>).



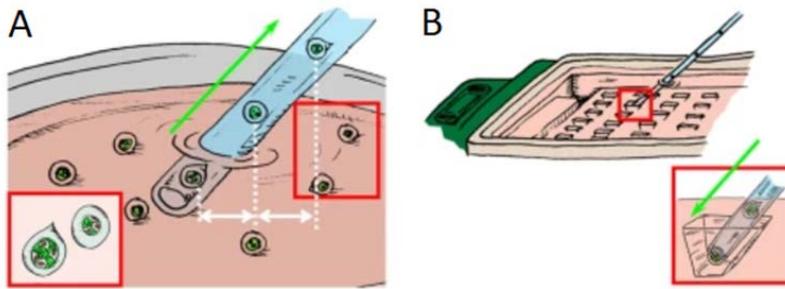
**Figure 2.23 : Nouveau tampon en résine imprimé en 3D.** (A) Nouveau tampon en résine. (B) Zoom du nouveau tampon. (C) Après l'ajout de 2 ml d'agarose chaud dans une boîte de pétri de 35 mm, le tampon y est déposé au centre. Après quelques minutes, l'agarose est gélifiée, le tampon peut être retiré. (D) Coussin d'agarose dans la boîte de pétri de 35 mm après impression. (E) Puits d'agarose en gros plan.

### 2.4.3 Protocole de transfert des capsules

Les moules d'agarose sont préalablement réalisés et rincés plusieurs fois avec du milieu de culture pour que l'eau de l'agarose soit remplacée. Le tri des capsules a été effectué à l'aide d'un stéréomicroscope portatif à champ clair (Microscope OPTIKA, SFX-91). Environ 100 capsules sont sélectionnées avec une pipette 20 $\mu$ l parmi plus de 25000 capsules produites en 10 secondes d'encapsulation. Cette manipulation doit rester la plus rapide possible pour ainsi éviter que les cellules ne soient trop affectées par les variations de température (hors de l'incubateur) et le manque de CO<sub>2</sub>.

Une fois la sélection réalisée, on remet les capsules dans l'incubateur pendant quelques heures. Les capsules sont ensuite séparées en deux et transférées dans deux moules d'agarose différents contenant un milieu de culture standard et un milieu enrichi à l'insuline.

Il est nécessaire de transférer une seule capsule par puits d'agarose pour un meilleur suivi de la croissance et pour faciliter l'analyse d'images. Cette étape est délicate, car il faut amener la pipette au plus près de la base rectangulaire supérieur du puits d'agarose, qui mesure 1 $\times$ 0.5mm<sup>2</sup>, et l'introduire dans le puits pour déposer la capsule au fond de celui-ci (Figure 2.24). S'il est conseillé d'utiliser une pipette Pasteur étirée couplée à une pipette à bouche pour charger les échantillons, je préfère utiliser un Pipetman et des cônes en plastiques. Dans ce cas, du fait de la forme conique de la pointe, il n'est pas possible de charger plusieurs capsules à la fois sans qu'elles ne sédimentent dans le cône, rendant alors le dépôt imprécis. Que l'on utilise une pipette en verre ou des cônes en plastique, il est important de bien mouiller l'intérieur de la pointe pour éviter que les capsules ne collent à la surface.



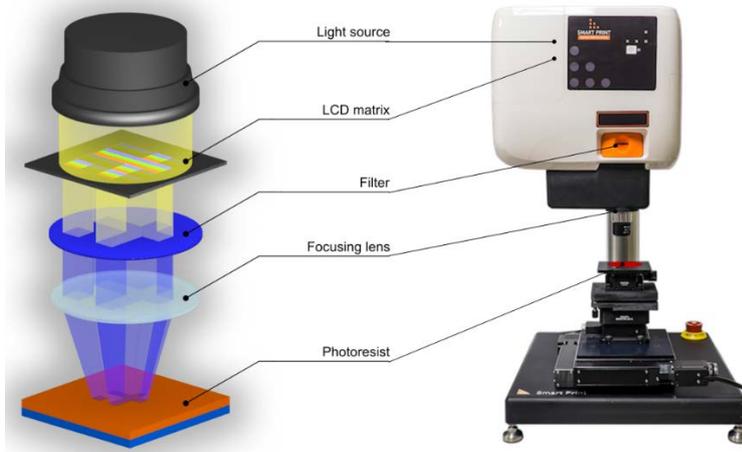
**Figure 2.24 :** illustration du transfert des capsules dans les puits d'agarose. (A) Sélection des capsules. (B) transfert des capsules sélectionnées dans un puits d'agarose. Extrait de (Alessandri et al., 2017)

## 2.5 Techniques de confinement de cellules à 2D

### 2.5.1 Photolithographie

Nous avons utilisé le Smartprint (Smart Force Technologies SAS) qui est un dispositif LCD (écran à cristaux liquides) (Figure 2.25). Cette matrice LCD est utilisée comme modulateur spatial de la lumière. Cette technique repose sur une modification locale d'une résine par exposition à une lumière bleue ( $\lambda=435$  nm). Les motifs sont définis par le LCD.

En pratique, la réalisation des motifs se déroule en 4 étapes. 1/ Étalement de la résine sur un *wafer* de silicium par enduction centrifuge (« spincoating ») ; 2/ cuisson de la résine dans un four pour la durcir ; 3/ exposition de la résine selon le photomasque souhaité avec un temps d'exposition adapté en fonction de l'épaisseur et le type de résine ; 4/ développement dans le développeur pendant un temps défini par l'épaisseur et le type de résine.



**Figure 2.25: Lithographie sans masque (SmartPrint).** Présentation de la machine de photolithographie SmartPrint avec ses différents composants principaux. Extrait de (<http://www.smartforcetechnologies.com/products/smartprint>)

### Préparation de la plaque en silicium

La plaque de silicium sert de support pour la résine. Elle est fragmentée en carrés d'environ 2 cm de côté. Un des fragments est immergé dans un bain d'acétone sous ultrasons (Branson 5510 ultrasonic cleaner) pendant 10 minutes. L'opération est répétée dans un bain d'isopropanol. Après séchage, le fragment est ensuite activé au piranha (d'acide sulfurique  $H_2SO_4$ /peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  : 75/25). Pour rendre la surface hydrophobe, nous étalons une goutte de TI PRIME (MicroChemical) à l'aide d'un *spincoater* (spinner Polos, SPIN150) : 2000 tours/min pendant 20 secondes. Afin de figer le TI PRIME, la plaque est chauffée sur une plaque chauffante à  $120^\circ C$  pendant 1 à 2 minutes.

### Dépôt de la résine

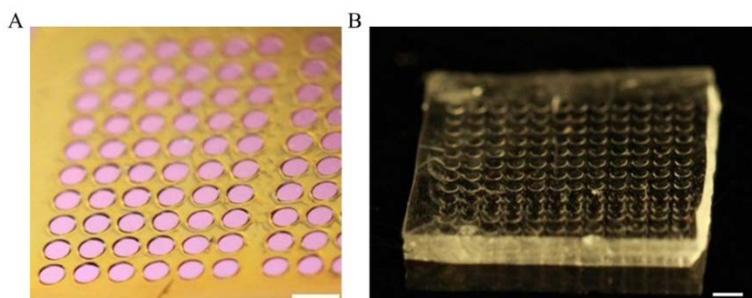
Nous avons utilisé la résine Resist AZ 4562 (MicroChemicals, AZ 4562) qui est une résine positive épaisse : elle permet de réaliser des motifs de 1 à 20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Pour obtenir une épaisseur de résine de 10  $\mu\text{m}$ , nous déposons une goutte de Resist AZ 4562 avec une pipette au centre du fragment et la passons au *spincoater* à 2500 tours/ min pendant 40 secondes. Après séchage à température ambiante pendant 20 minutes à l'abri de la lumière, nous mettons le fragment dans le four à 100°C pendant 15 minutes.

### Photolithographie

L'échantillon est ensuite placé sur la plateforme motorisée du SmartPrint. Cette plateforme de 74.8×74.8 mm nous permet de déplacer la plaquette avec une précision de 0.31 $\mu\text{m}$  en XY et 0.63 $\mu\text{m}$  en Z. L'exposition, ajustable, a été fixée à 4 secondes par masque, l'énergie déposée n'étant pas déterminée, nous avons réalisé un étalonnage de l'exposition par pas de 0.5 seconde. Une fois toute la surface d'intérêt exposée, nous plaçons le fragment pendant 10 minutes dans un solvant appelé *developer* (MicroChemicals, AZ 326 MIF Developer). Ce solvant dissout la résine non exposée aux UV. Le fragment est ensuite rincé dans un bain d'eau ultra pure pour retirer le développeur de la surface de la résine, séché et conservé à l'abri de la lumière à température ambiante.

#### 2.5.2 Micro-impresion d'îlots adhérents

Comme pour la très grande majorité des microsystèmes utilisés pour la culture cellulaire, nous avons utilisé du Polydiméthylsiloxane PDMS. Le PDMS est préparé en mélangeant 9/10 de polymère de silicone et 1/10 d'agent réticulant (Sylgard 184 Silicone Elastomere Kit, parts A&B, Dow Corning). Le PDMS est ensuite dégazé afin de retirer toutes les bulles formées lors du mélange avant de le couler sur le fragment photolithographié. La réticulation a lieu au four à 80°C pendant 2h. En pelant délicatement le PDMS, on récupère un tampon de PDMS qui présente la forme positive des motifs en résine (Figure 2.26). Un découpage autour des motifs est réalisé en laissant un espace suffisant pour permettre la manipulation du tampon avec une pince.



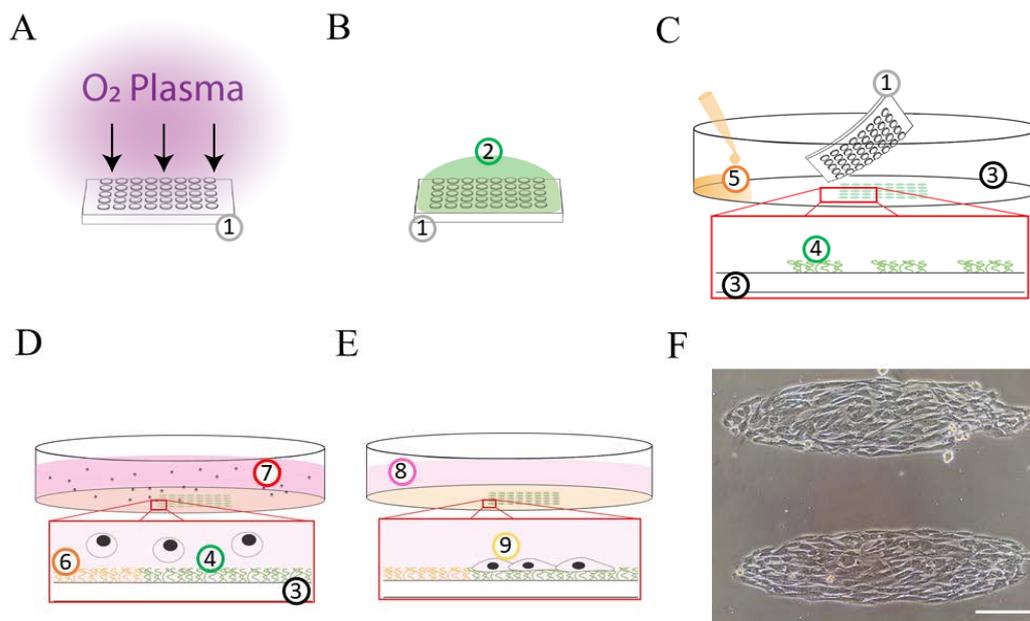
**Figure 2.26: Fabrication d'un tampon en PDMS.** (A) Image du film épais de résine après exposition et développement. (B) Tampon de PDMS formé à partir de A. Barre d'échelle : 1mm

Les motifs que nous avons utilisés par la suite ont une hauteur moyenne de  $8\mu\text{m} \pm 2\mu\text{m}$ . Nous avons mesuré la hauteur avec le microscope inversé Axio Observer (ZEISS, Objectif 10x/0.3, Caméra Retiga R1 de Qimaging), en soustrayant les coordonnées de focalisation de la surface du motif et de la base du bloc de PDMS. Les formes des différents motifs que nous avons utilisés tout au long de nos expériences sont : carrée (400 $\mu\text{m}$  de coté), circulaire (500 $\mu\text{m}$  de

diamètre) et ovale (1mm grand axe et 300µm petit axe).

N'ayant pas d'expérience dans la réalisation des micromotifs autre que bibliographique, nous avons appris la réalisation concrète de motifs cellulaires en collaboration avec l'équipe de Benoit Ladoux (*Cell Adhesion and Mechanics* de l'Institut Jacques Monod à Paris), experte de ces techniques.

Le tampon de PDMS est tout d'abord activé dans un *plasma cleaner* (PDC 002 - Harrick Plasma) sous vide à 600mTor pendant 60 secondes (Figure 2.27A). Une solution de fibronectine (Sigma-Aldrich, FC010-5MG) à 50µg/mL est ajoutée sur la surface du tampon en PDMS (Figure 2.27B). Après une heure d'incubation, le tampon est rincé 3 fois avec de l'eau ultra pure puis séché avec de l'air comprimé filtré à 0.22µm. Le tampon est ensuite posé sur le fond de la boîte de Pétri et légèrement pressé pour s'assurer que tous les motifs soient en contact avec la surface. Une fois le tampon retiré délicatement (Figure 2.27C), la fibronectine est a priori transférée sur la boîte de Pétri. Il faut ensuite inactiver vis-à-vis de l'adhésion cellulaire et de l'adsorption de protéine le reste de la surface. Nous utilisons une solution de Pluronic F127 (Sigma, P2443) à 2% w/v. Après incubation pendant 1h et lavage au PBS, la suspension cellulaire peut être ajoutée sur les motifs. Nous laissons les cellules s'y déposer à 37° C pendant 2h (Figure 2.27D) avant de retirer le surplus de cellules non adhérentes par rinçage doux (Figure 2.27E).



**Figure 2.27 : Protocole de fabrication de motif par dépôt de protéines.** (A) Activation de la surface du tampon de PDMS au *plasma cleaner*. (B) Ajout d'une solution de fibronectine à sur la surface activée du tampon en PDMS. (C) Dépôt puis décollage du tampon en PDMS sur la surface activée. Ajout d'une solution de Pluronic F127. (D) Immersion des motifs et ensemencement des cellules dans leur milieu de culture. (E) Élimination des cellules non adhérentes. (F) Image de cellules 3T3-F442A adhérant sur des motifs ovales 10h après l'étape E. Barre d'échelle : 200µm. Numérotation : 1) tampon en PDMS, 2) solution de fibronectine à 0.1%, 3) fond de la boîte de pétri, 4) peigne adhérent de fibronectine, 5) solution de Pluronic F127 à 2%, 6) peigne répulsif de Pluronic F127, 7) suspension cellulaire avec le milieu, 8) milieu de culture, 9) cellules en adhésion.

Le résultat, dans les heures suivant la manipulation est satisfaisant (Figure 2.27F). Les cellules s'étalent de manière uniforme sur toute la surface des motifs. Cependant, cette méthode n'est

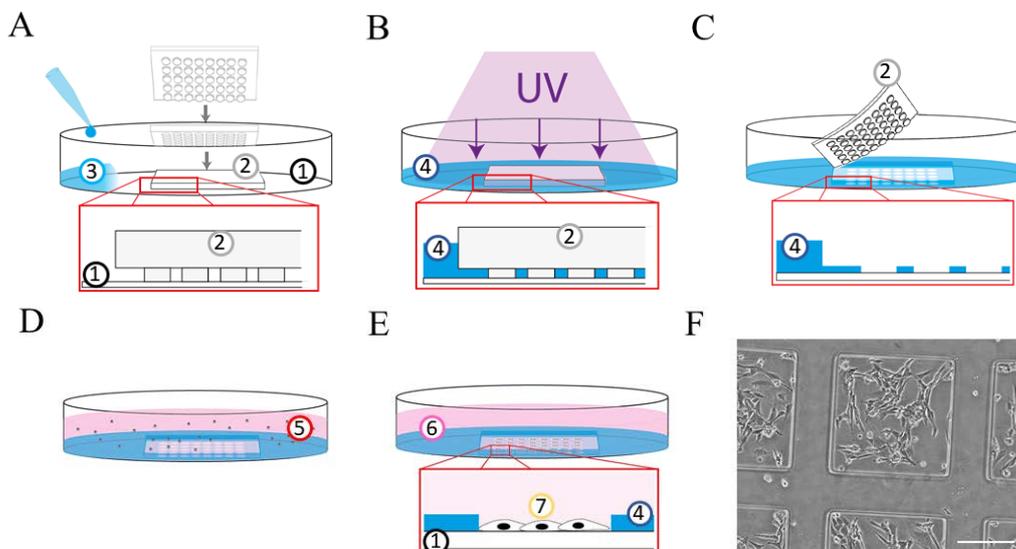
pas optimale. Nous verrons au chapitre 3 que, 24h après ensemencement, les cellules sortent des motifs en migrant dans la zone couverte de Pluronic. Il a donc fallu trouver un autre moyen de confiner les cellules en 2D.

### 2.5.3 Fabrication par gaufrage de motifs topographiés

Le principe du confinement 2D par gaufrage est de générer des motifs adhérents par impression négative d'un moule dans un gel, de manière à confiner physiquement les cellules. Nous sommes bien conscients que la topographie peut impacter le devenir cellulaire (Qi et al., 2013; Zhang et al., 2019). Aussi serons-nous attentifs à l'apparition éventuelle d'effets de bord (chapitre 3).

L'avantage de cette technique est que les tampons de PDMS utilisés précédemment pour la fabrication de motifs par dépôt d'ECM sont aussi adapté pour ce système de confinement 2D. Le principe est de couler un hydrogel inerte auquel les cellules n'adhéreront pas, autour du tampon posé au fond de la boîte de pétri, puis de le réticuler. Il faut ensuite que le polymère qui formera l'hydrogel puisse i) s'écouler entre les motifs du tampon en PDMS afin de recouvrir toute la surface restante de la boîte pétri, ii) être, une fois réticulé, suffisamment rigide pour garder la forme des motifs, iii) être inerte vis-à-vis de l'adhésion cellulaire. Nous avons choisi le PEGDA (polyéthylène glycol) 700mn (Sigma-Aldrich, 455008), dont les propriétés ont été décrites au chapitre 1.

Le protocole que nous avons mis au point est le suivant: Nous commençons par déposer le tampon en PDMS sur la surface activée d'un des puits d'une plaque 12 puits. Nous y ajoutons environ 400µl d'une solution de PEGDA 30% avec 0.5% de photoinitiateur LAP (Sigma-Aldrich, 900889), autour du tampon (Figure 2.28A). La solution s'écoule sous le tampon de PDMS par capillarité. En cas de formation de bulles d'air, on peut les éliminer par aspiration-refoulement avec la pipette au bord du tampon.



**Figure 2.28 : Protocole de fabrication de motif par gaufrage.** (A) dépôt du tampon en PDMS sur la surface activée d'une boîte de pétri, puis ajout de la solution de PEGDA 30% avec photoinitiateur LAP ; (B) réticulation du PEGDA par exposition aux UV ; (C) décollage du tampon en PDMS du gel de PEGDA. (D) Immersion des motifs par ajout d'une suspension cellulaire dans leur milieu ; (E) rinçage de la suspension cellulaire, puis ajout du milieu

de culture sur les cellules adhérant aux motifs ; (F) Image de cellules 3T3-F442A adhérant sur les parties nues de la surface de la boîte de pétri délimité par le motif de PEGDA. Barre d'échelle : 200µm. Numérotation : 1) fond de la boîte de pétri, 2) tampon en PDMS, 3) Solution de PEGDA à 30% et de LAP à 0.5%, 4) gel de PEGDA, 5) suspension cellulaire, 6) milieu de culture, 7) cellules.

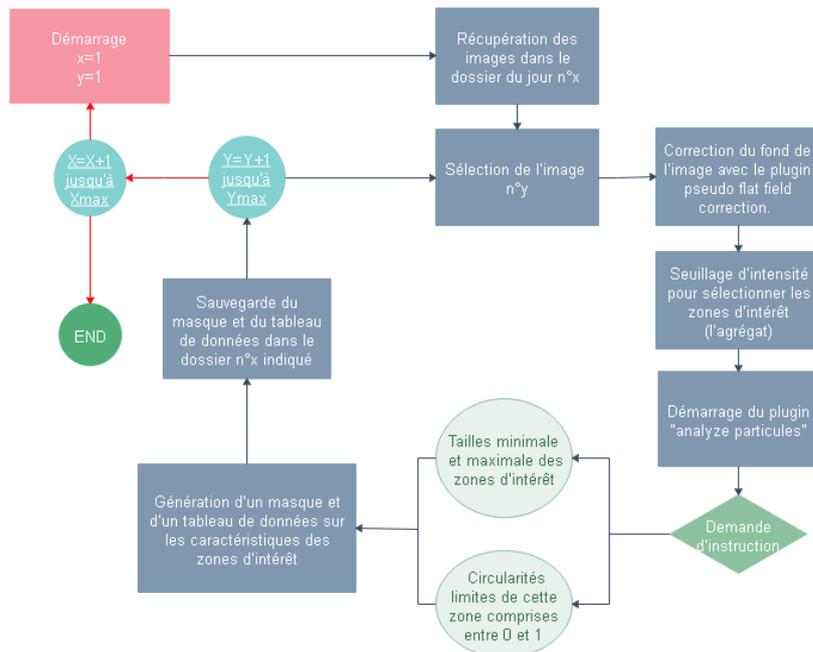
Nous réticulons ensuite le PEGDA par exposition aux UV (UWAVE, UTARGET 405 nm) (200mW/cm<sup>2</sup>) pendant 3 secondes (Figure 2.28B). Le tampon est ensuite retiré délicatement. Enfin, les motifs sont rincés dans un bain de PBS pendant toute une nuit pour éliminer les espèces non réticulées (Figure 2.28C). Il ne reste plus qu'à transférer la suspension cellulaire sur les motifs et laisser sédimenter à 37°C pendant 2 heures (Figure 2.28D), avant de retirer le surplus de cellules non-adhérentes (Figure 2.28E). Ces motifs 2D par gaufrage sont efficaces pour maintenir les cellules confinées en 2D (Figure 2.28F). Les cellules adhèrent strictement aux motifs et ne colonisent pas le PEGDA. C'est cette méthode que nous utiliserons au chapitre 3. La forme des motifs utilisés sera circulaire.

## 2.6 Imagerie et Analyses d'images

### 2.6.1 Microscopie en fond clair et segmentation des agrégats multicellulaires

Pour suivre la taille et la morphologie des agrégats, nous utilisons un microscope inversé à champ clair (Nikon, Eclipse TS100, objectif 10x/0.25NA) en prenant des images une fois par jour pendant 25 jours. Le traitement et l'analyse des images sont réalisés avec le logiciel libre Fiji ImageJ (<https://imagej.net>). Pour quantifier la cinétique de croissance des 3T3-F442A, nous mesurons la surface pour une focalisation à l'équateur des agrégats. Comme nous utilisons un microscope à champ large, un objet opaque apparaît comme une surface sombre. Cela nous permet donc, par seuillage d'intensité, de mesurer automatiquement cette surface  $A_{ag}$ . En faisant l'approximation que les agrégats sont sphériques, nous en déterminons le rayon moyen

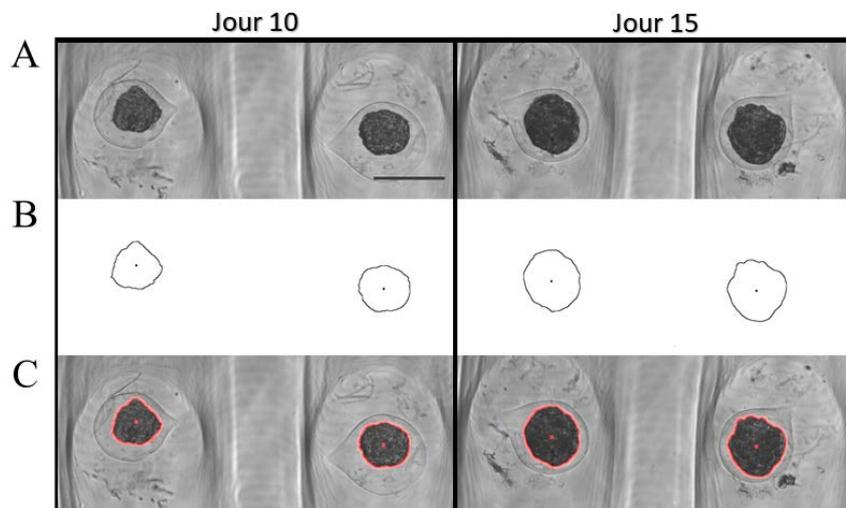
$R_{ag}$  par  $R_{ag} = \sqrt{\frac{A_{ag}}{\pi}}$ . Avec 35 capsules pour chaque condition, et 25 jours d'acquisition, 1750 images doivent être analysées. Nous avons développé une « macro » permettant la segmentation des agrégats ainsi que la réorganisation des fichiers (Figure 2.29 et Annexe 2). Afin d'optimiser la détection des agrégats, le programme exécute tout d'abord un « pseudo flat field correction ». Cela corrige une illumination inégale ou des artefacts (saleté/poussière) sur les lentilles et miroir du chemin optique, en créant une image de référence à "champ plat" à partir de l'image prise. Une fenêtre de dialogue s'ouvre ensuite, pour entrer une gamme de tailles et de circularité (définie par  $4\pi * (surface/périmètre^2)$ ) souhaitées.



**Figure 2.29 : Organigramme de la macro de segmentation.** Avec en rose le lancement du programme, en bleu les opérations exécutées par la macro, en vert les demandes d'instruction, En turquoise, point de sortie de la boucle si l'itération atteint sa valeur maximale et en vert le point d'arrêt du programme

La zone d'intérêt est représentée par le contour noir correspondant au bord de l'agrégat (Figure 2.30B et C). Enfin, la « macro » exporte un tableau de valeurs qui correspondent à la surface et au positionnement de la zone d'intérêt.

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 2.30, la qualité des images permet une segmentation automatique précise des agrégats, au moins jusqu'au jours 15.

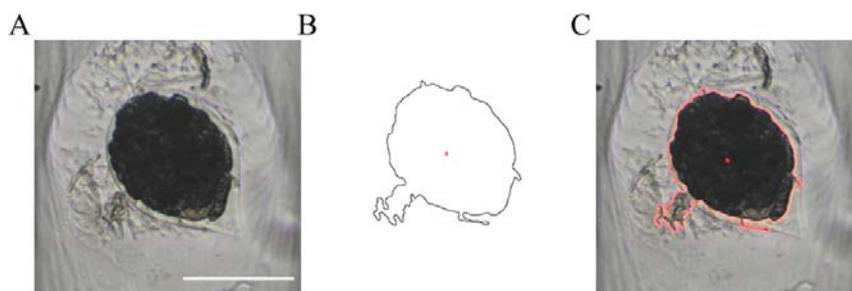


**Figure 2.30: Exemples de segmentation d'agrégats cellulaires encapsulés et disposés dans les puits d'une UniverSlide.** (A) images en champ clair de deux capsules de 3T3-F442A au fond de leurs puits d'agarose, à différents jours. Ces capsules font parties du lot avec régime enrichi. Barre d'échelle : 200µm. (B) Masque de segmentation des agrégats en (A). (C) Superposition du masque de segmentation avec les images des agrégats en champ clair.

### Difficultés

Après 16 jours, la segmentation automatique devient plus compliquée. Des résidus du milieu de culture sédimentent au fond du puits d'agarose. Leur accumulation génère des amas opaques, qui génèrent des erreurs de détection de contour (Figure 2.31). Il est donc souvent nécessaire

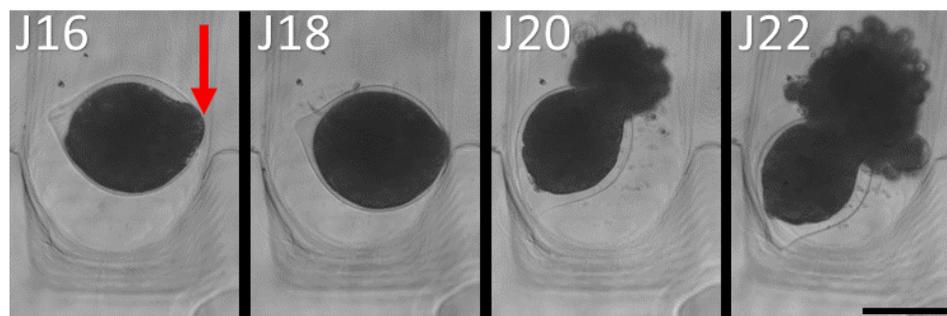
de retoucher manuellement les contours sur les images prises les derniers jours.



**Figure 2.31: Exemple d'aberration de l'analyse automatique.** (A) images, prises en champ clair, d'une capsule de 3T3-F442A au fond de son puits d'agarose. Barre d'échelle : 200 $\mu$ m. (B) Masque de segmentation de l'agrégat en (A). (C) Superposition du masque de segmentation avec l'image de la capsule en champ clair.

Certaines analyses, pour des conditions de culture en milieu adipogénique le plus souvent, sont arrêtées avant les autres, en raison de la rupture de la capsule (Figure 2.32). Une fois la coque ouverte, l'agrégat, sous pression, sort partiellement de la capsule (voir

Vidéo 3).



**Figure 2.32: Exemple de rupture de la coque d'alginate.** Image d'une capsule de 3T3-F442A en champ clair à différents jours. La flèche rouge indique le point de rupture de la capsule. Au jour 20, l'agrégat cellulaire sort partiellement de la capsule.

## 2.6.2 Microscopie de fluorescence et segmentation des gouttelettes lipidiques

Afin d'imager nos échantillons en 3D, nous avons utilisé des microscopes à sectionnement optique (Chapitre 1, section 1.6). Pour cela, nous avons utilisé la plateforme d'imagerie Bordeaux Imaging Center (BIC). Nous avons principalement utilisé le spinning-disk Leica DMI8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) équipé avec un scanner confocale CSU-W1 T2 (Yokogawa Electric Corporation, Tokyo, Japan). Les images sont acquises par une caméra sCMOS Prime 95B (Photometrics, Tucson, USA). Les diodes laser utilisées sont à 405 nm (100 mW), 488 nm (400 mW), 561 nm (400 mW) et 642 nm (100 mW). Quand le spinning-disk n'était pas disponible, nous avons utilisé le confocal Leica SP8 WLL2 sur un support inversé DMI6000 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Il est équipé d'un laser

« blanc » (*supercontinuum*) avec une excitation ajustable de 470 à 670 nm (par pas de 1 nm) et d'une diode laser à 405 nm. Le balayage a été effectué à l'aide d'un scanner conventionnel (10Hz à 1800 Hz). Le microscope est composé de 2 tubes photomultiplicateurs (PMT) internes, de 2 détecteurs hybrides internes et d'un PMT externe pour la transmission.

### **Marquage des gouttelettes lipidiques et des noyaux**

Pour quantifier la production de lipides, il existe différents types de marqueurs chromogéniques ou fluorescents. Le plus couramment utilisé est le Nile Red (Fowler and Greenspan, 1985; Sackett and Wolff, 1987). Le Nile Red est une molécule hydrophobe non chargée dont la fluorescence est fortement influencée par la polarité de son environnement. Le Nile Red est donc a priori idéal pour marquer des environnements lipidiques. Cependant, son absorption est affectée par la composition de la paroi cellulaire, les conditions de croissance et l'environnement (Gao et al., 2008; Laurens and Wolfrum, 2011).

Il existe aussi un marqueur lipidique fluorescent classique, le BODIPY 505/515, qui a l'avantage de ne pas se lier aux compartiments cytoplasmiques autres que les corps lipidiques. Les gouttelettes lipidiques sont donc marquées de façon distincte (Cooper et al., 2010). C'est pourquoi nous avons utilisé le BODIPY ex:505/em:515 pour caractériser la dynamique de croissance des gouttelettes lipidiques. Le coefficient de partage huile/eau élevé du BODIPY 505/515 lui permet de traverser facilement les membranes cellulaires sans avoir à les perméabiliser. Cela permet de marquer des cellules vivantes.

Pour quantifier le nombre de cellules, il existe de nombreux marqueurs nucléaires tels que les DAPI, SYTO, HOECHST, etc... Nous avons utilisé le Hoechst-33342, qui colore le noyau des cellules vivantes et mortes. Il n'est pas un intercalant de l'ADN, mais se fixe sur le sillon mineur de l'ADN double brin avec une préférence pour les séquences riches en adénine et en thymine. Une fois fixé sur l'ADN double brin, il est 30 à 40 fois plus fluorescent qu'en solution et émet une fluorescence maximale à 461 nm avec une excitation maximale à 350 nm. Le Hoechst, ne peut cependant pas être utilisé en imagerie « time-lapse ». La phototoxicité associée au Hoechst génère en quelques jours de l'apoptose (Purschke et al., 2010).

### **Protocole d'imagerie pour capsules cellulaires fixées**

Les capsules sont immergées dans du DMEM (glucose 1g/L) avec 8 $\mu$ M de Bodipy et 2 $\mu$ M de Hoescht pendant environ 1 heure à 4°C. Les capsules sont ensuite rincées avec du DMEM (glucose 1g/L) et conservées, à 4°C, à l'abri de la lumière. Les capsules peuvent être gardées ainsi pendant au moins 3 jours. Nous préparons tout d'abord une plaque 24 puits à fond de verre. Les surfaces de verre sont activées dans un *plasma cleaner* (PDC 002 - Harrick Plasma) à 600mTor pendant 60 secondes. Nous versons, en suivant, une solution de Poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, P4832) à 1.0 mL/25 cm<sup>2</sup>. Après 5 minutes, nous aspirons le liquide et rinçons les puits avec du PBS. Après séchage dans un incubateur à 37°C pendant 45 minutes, ces puits peuvent accueillir les capsules. Une fois en contact avec le fond, les capsules y adhèrent immédiatement : elles sont immobilisées et peuvent être imagées.

### **Protocole d'imagerie pour cellules vivantes à 2D**

Les motifs 2D sont préparés selon le protocole de la section 2.6.3. Ils sont ensuite en immersion

continue dans le milieu non-adipogénique des 3T3 F442A complétement avec 4 $\mu$ M de Bodipy. Ce milieu de marquage est renouvelé tous les 3 jours. Les cellules ont été imagées ainsi quotidiennement pendant 15 jours.

### **Préparation des coupes pour l'imagerie**

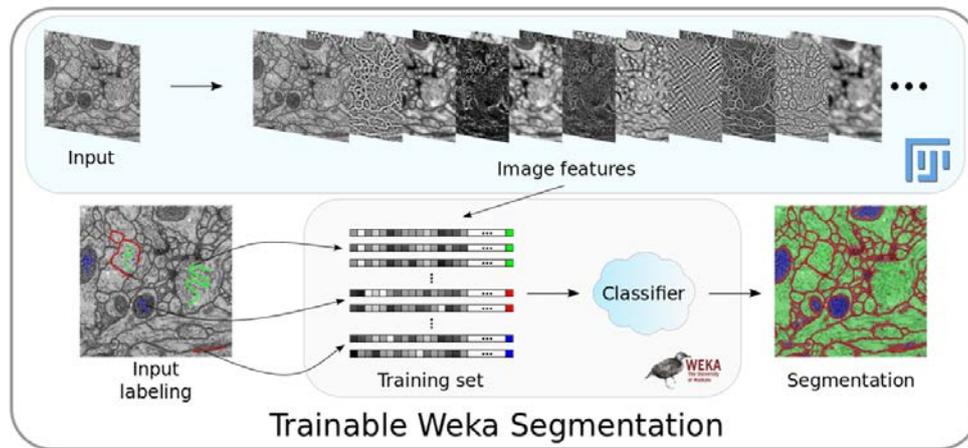
Après décongélation de la lame avec les coupes histologiques. Nous dessinons un cercle avec un feutre hydrophobe autour des coupes. Puis nous ajoutons sur les coupes des gouttes de DMEM 1g/L de glucose avec du Bodipy à 4 $\mu$ M (Thermofisher, D3921) et du Hoechst à (Thermofisher, H3570), pendant 30 à 40 minutes. Nous rinçons ensuite la coupe avec du milieu DMEM 1g/L de glucose. Puis nous retirons le maximum de liquide possible pour ajouter le milieu de montage « prolongGold » (Thermofisher, P36930) que l'on vient recouvrir d'une lamelle en verre.

### **Rendu 3D des Organoïdes**

Les représentation 3D les vidéos 8,9,18 et 19 ont été réalisées avec Imaris (Bitplane, Oxford Instruments)

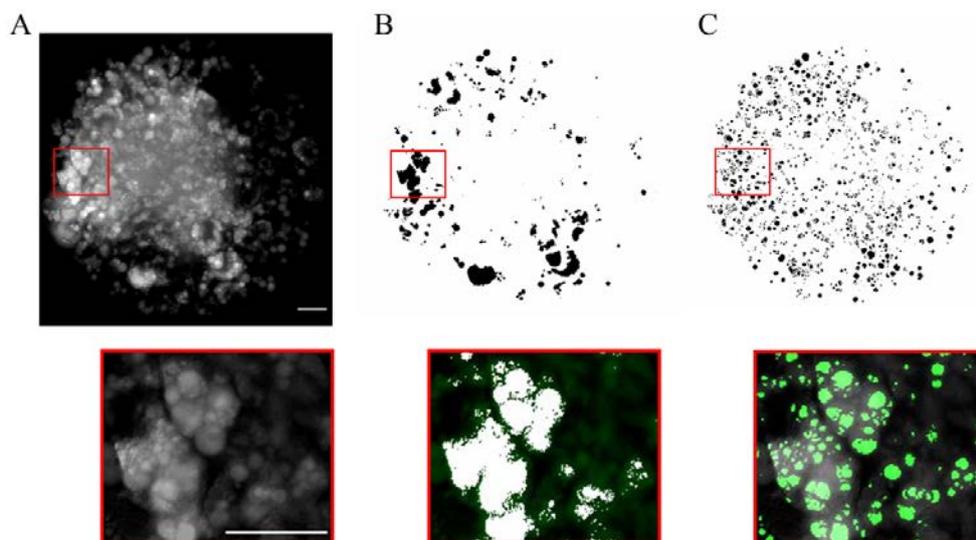
### **Segmentation des gouttelettes lipidiques**

Pour quantifier le nombre et la taille des gouttelettes lipidiques au sein d'un agrégat, il faut, pour chaque coupe optique, être capable de segmenter chaque gouttelette. Dans notre cas, une segmentation classique par seuillage n'est pas pertinente. En effet, comme nous pouvons le voir sur un exemple dans la Figure 35A, le bruit de fond ne permet pas de distinguer clairement le contour des gouttelettes, malgré un post traitement de l'image (comme l'utilisation d'un filtre « Rolling ball »). La présence de ce bruit de fond peut provenir de la fluorescence hors plan focal, ne permettant pas d'observer les plus petites gouttelettes. Un plugin de segmentation 3D tel que « DropletFinder » peut être utilisé ([https://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:analysis:droplet\\_counter:start](https://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:analysis:droplet_counter:start)). Cependant, nous avons remarqué que les résultats n'étaient pas robustes. En réalisant la segmentation 3 fois sur une même image, nous avons mesuré des différences de 300% sur le nombre de gouttelettes détectées, d'une segmentation à l'autre. Cette différence est liée à une prévisualisation lente de la segmentation 3D. Le contrôle visuel n'est donc pas optimal pour la modification de paramètres de segmentation tels que le seuillage ou encore la taille minimale des gouttelettes. Finalement, nous avons utilisé le plugin « Weka Segmentation » qui se base sur un algorithme de « machine learning » (Figure 2.33). Il permet de générer au minimum deux catégories de sélection dans l'image. Par exemple, avec l'outil traits, pour la catégorie 1, nous avons colorié les pixels liés aux gouttelettes. Pour la catégorie 2 nous avons colorié le fond de l'image, mais aussi zones de recouvrement entre les gouttelettes quand celles-ci sont trop proches les unes des autres. Une fois cette phase d'annotation terminée, nous lançons la phase d'entraînement. La classification successive de pixels permet à l'algorithme de catégoriser les pixels non annotés. Ainsi à la fin de l'entraînement, l'algorithme affiche sur l'ensemble de l'image, les zones de catégorie 1 et 2. Si les zones ne sont pas bien définies, il est possible d'augmenter les critères de sélection en ajoutant des tracés.



**Figure 2.33: Schéma explicatif du fonctionnement du plugin *Weka*.** Adapté du site officiel de Imagej

Cet algorithme permet donc de distinguer deux gouttelettes juxtaposées, ce qu'un simple seuillage d'intensité ne peut pas faire (Figure 2.3). *Weka segmentation* a aussi l'avantage de pouvoir segmenter des gouttelettes sur un bruit de fond très élevé. Ce plugin est donc adapté pour analyser les images que nous utiliserons, en présence de gouttelettes lipidiques.



**Figure 2.34: Méthode de segmentation des gouttelettes lipidiques.** (A) Image de pré adipocytes 3T3F442 en 2D marquée avec du Bodipy 505/515. (B) Masque de segmentation par simple seuillage d'intensité de l'image A. (C) Masque de segmentation généré par le plugin *Weka Segmentation*. Barre d'échelle : 50 µm



# 3

## Résultats et Discussion

---

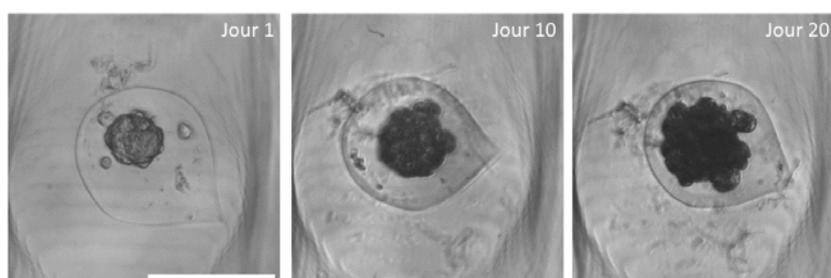
3.1	Deux observations surprenantes .....	87
3.1.1	Croissance lente des organoïdes adipocytaires .....	87
3.1.2	Production précoce de gouttelettes lipidiques en milieu non-adipogénique .....	87
3.2	Croissance d'organoïdes de préadipocytes encapsulés .....	88
3.2.1	Comparaison de trois protocoles d'imagerie .....	88
3.2.2	Cinétiques de croissance.....	89
3.3	Différenciation d'organoïdes de préadipocytes encapsulés.....	92
3.3.1	Problématique liée à la géométrie 3D pour l'imagerie en profondeur.....	93
3.3.2	Principe de détermination de la répartition et du nombre de gouttelettes lipidiques à partir de coupes histologiques.....	94
3.3.3	Évolution de la distribution de taille des gouttelettes lipidiques .....	97
3.3.4	Quantification de la production de lipides au cours du temps .....	99
3.4	Monocouches de préadipocytes confinées spatialement à 2D.....	100
3.4.1	Problèmes d'échappement cellulaire sur des substrats à motifs imprimés .....	100
3.4.2	Cinétique de croissance à 2D sur motifs topographiés .....	101
3.4.3	Impact du confinement 2D sur le cycle et la prolifération cellulaire.....	104
3.5	Différenciation adipocytaire par confinement à 2D .....	107
3.5.1	En milieu enrichi en insuline .....	107
3.5.2	En milieu non-adipogénique.....	108
3.6	Discussion .....	110

### 3.1 Deux observations surprenantes

#### 3.1.1 Croissance lente des organoïdes adipocytaires

Notre première expérience sur les organoïdes de préadipocytes a consisté à encapsuler des cellules 3T3F442A, à former des agrégats uniques par centrifugation douce (voir section 2.4.7) et à les laisser évoluer dans un incubateur en les imageant par microscopie en champ clair de temps en temps pour déterminer à la fois la fenêtre de temps sur laquelle les agrégats arrivent à confluence et la durée maximale de culture en capsule.

Les trois images de la Figure 3.1 montrent un agrégat de préadipocytes représentatif disposé dans un micro-puits (voir section 2.5.2) juste après encapsulation, après 10 jours et après 20 jours. On observe que l'augmentation de la taille de l'agrégat est modeste, et que la confluence n'est pas atteinte en 20 jours de culture.



**Figure 3.1: Agrégat préadipocytaire 3T3F442A en régime non adipogénique dans des puits d'agarose.**  
Barre d'échelle 200µm

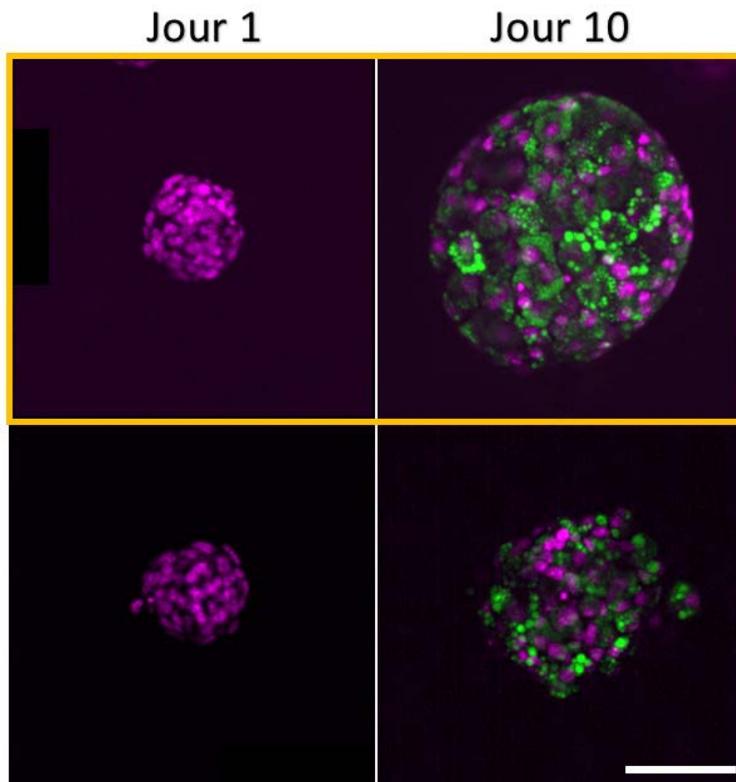
Plus quantitativement, une mesure de section A de l'agrégat et dérivation du rayon effectif  $R_{ag} = \sqrt{A/\pi}$  montre que l'agrégat de rayon initialement 44 µm atteint une taille de 72 µm au bout de 20 jours. Une extrapolation linéaire donne un taux de croissance  $dR_{ag}/dt = 1.4$  µm/jour, ce qui signifie que l'organoïde double de volume en 8 jours, alors que le temps de doublement à 2D était de 6-7h (voir section 2.3.2).

Sur d'autres expériences, nous avons pu la poursuivre jusqu'à 28 jours. Mais, de manière générale, au-delà de ce temps, deux problèmes apparaissent : i) des débris ont tendance à s'accumuler dans les micro-puits autour des capsules, et ii) parfois, sans que l'on ait bien réussi à en identifier la cause, l'alginate brunit fortement et devient cassant. Cette coloration a été rapportée dans la littérature lorsque l'alginate est porté à des températures élevées (130°C) pendant au moins 5 minutes (Báez et al., 2017). Le brunissement serait dû à la réaction de Maillard. Nous n'avons pas d'indication quant au processus en cours dans les capsules, cependant, il semblerait que ce processus soit étroitement lié à la présence des cellules dans la capsule. En effet, suite à des tests d'inclusion d'agrégats préadipocytaires dans un gel d'alginate, nous avons pu observer un gradient radial de brunissement autour des agrégats (voir Annexe 3). Ce brunissement ne nous permet pas de poursuivre l'acquisition en microscopie optique.

#### 3.1.2 Production précoce de gouttelettes lipidiques en milieu non-adipogénique

Les images de la figure 3.2 montrent un organoïde de préadipocytes 3T3F442A respectivement

en milieu normal et enrichi en insuline ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) après fixation. Nous avons incubé les organoïdes dans une solution de Bodipy ( $8\mu\text{M}$ , 1 heure). Ils ont été imagés par spinning disk directement après encapsulation (Jour 1) et au jour 10.



**Figure 3.2 : Organoïde préadipocytaire 3T3F442A avec et sans milieu adipogénique.** Encadré orange : organoïde en milieu adipogénique. Sans encadré : organoïde en milieu non-adipogénique. Barre d'échelle  $100 \mu\text{m}$

Comme attendu, l'organoïde en milieu adipogénique présente des gouttelettes lipidiques (GLs). En revanche, de manière surprenante, l'organoïde qui n'a jamais été en contact avec de l'insuline, bien que son volume soit inférieur, présente aussi des GLs, signe d'un début de différenciation. Le fait que la confluence n'a pas été atteinte après 10 jours indique qu'aucune contrainte extérieure, susceptible de déclencher la différenciation, ne s'exerce.

Pour tenter de mieux comprendre les phénomènes sous-jacents, nous allons conduire une étude quantitative de la dynamique de croissance et de différenciation des organoïdes (section 3.2) avant de revenir à la culture 2D (section 3.3) en guise de comparaison.

## 3.2 Croissance d'organoïdes de préadipocytes encapsulés

### 3.2.1 Comparaison de trois protocoles d'imagerie

Indépendamment de l'observation précédente d'une croissance très lente inattendue des organoïdes de préadipocytes, le suivi de la croissance et de la différenciation d'organoïdes suppose d'être capable d'imager ces échantillons pendant des durées de plusieurs semaines dans des conditions environnementales (température, atmosphère) contrôlées. Toutes les acquisitions d'images faites au cours de ce travail, en utilisant plusieurs modalités d'imagerie optiques, ont été réalisées en suivant trois protocoles différents. Dans le Chapitre 2, nous avons décrit les méthodes de microscopie utilisées. Ici, nous revenons sur quelques détails des

protocoles qui s'avèreront cruciaux. Tous les protocoles respectent les exigences de la sensibilité environnementale des préadipocytes (influence du nombre capsules par volume de milieu - Chapitre 2, section 2.4.1).

- Protocole 1 : imagerie en champ clair sur organoïdes vivants avec acquisition une fois par jour, hors incubateur, avec un stéréomicroscope portatif. Le temps d'acquisition à l'extérieur de l'incubateur est de l'ordre de la demi-heure à température ambiante. Cette manipulation est répétée chaque jour pendant 25 jours.

- Protocole 2 : imagerie en champ clair sur organoïdes vivants cultivés dans une chambre thermostatée adaptée au microscope.

- Protocole 3 : imagerie confocale sur organoïdes fixés. Une dizaine d'organoïdes sont prélevés et fixés une fois par jour pendant 25 jours.

### 3.2.2 Cinétiques de croissance

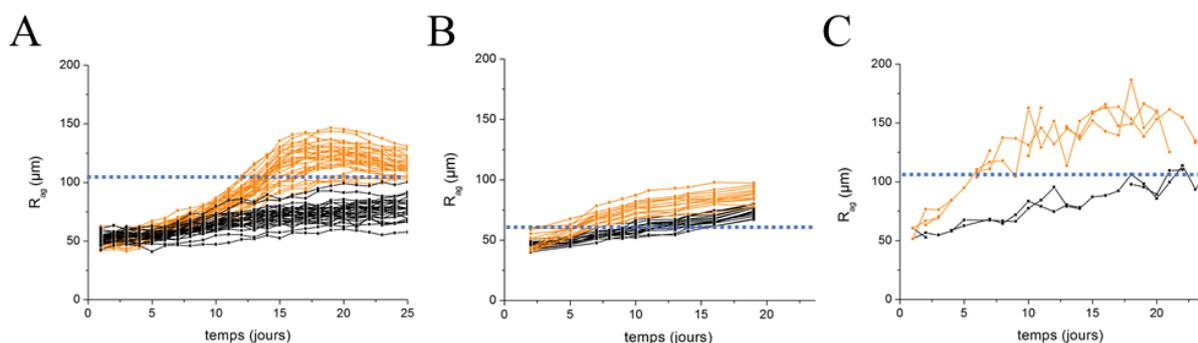
Les Vidéo 4 et Vidéo 5 montrent une reconstruction animée d'images de microscopie en fond clair sur la durée des expériences selon le protocole 1. On observe que la croissance des organoïdes est plus rapide et importante en présence d'insuline, conduisant même jusqu'à des explosions de capsules. Concernant les capsules à petit cœur, on observe aussi que la confluence est à peine atteinte pendant les derniers jours de l'acquisition en condition non-adipogénique, indiquant que l'impact éventuel de la compression sur la différenciation ne sera effectif que pendant les quelques derniers jours dans nos conditions d'acquisition.

La Figure 3.3 rassemble les courbes de croissance brutes du rayon des agrégats obtenues selon les différents protocoles en absence et en présence d'insuline. Dans ces expériences, la taille de cœur des capsules et la densité initiale en cellules sont modulées.

Les expériences effectuées selon le protocole 1, obtenues pour des capsules à grand cœur ( $R_{in} = 105 \pm 11 \mu\text{m}$ ), correspondent au suivi de  $N \approx 30$  agrégats disposés dans des micro-puits pour chaque condition. Nous rapportons ici deux séries d'expériences effectuées à plusieurs mois d'intervalle avec des préadipocytes au même nombre de passages.

Les expériences effectuées selon le protocole 2 l'ont été sur des capsules à petit cœur, dont le rayon interne est  $R_{in} = 59 \pm 6 \mu\text{m}$ . 30 agrégats ont été suivis dans chaque condition.

Enfin, les expériences effectuées selon le protocole 3 l'ont été sur deux lots de cellules différentes au même nombre de passages et issues de deux encapsulations différentes. Pour pouvoir rassembler ces échantillons, nous avons présélectionné à la main des capsules de taille similaire (Chapitre 2, section 2.5.3). Le rayon interne des capsules est  $R_{in} = 107 \pm 10 \mu\text{m}$ , il s'agit donc de capsules à grand cœur.



**Figure 3.3: Croissance du rayon équivalent des organoïdes pré-adipocytaires avec et sans milieu adipogénique en fonction du protocole utilisé.** En orange : organoïde avec milieu adipogénique. En noir : organoïde avec milieu non-adipogénique. (A) Protocole 1, (B) Protocole 2, (C) Protocole 3. Les pointillés bleus représente le rayon interne moyen des capsules.

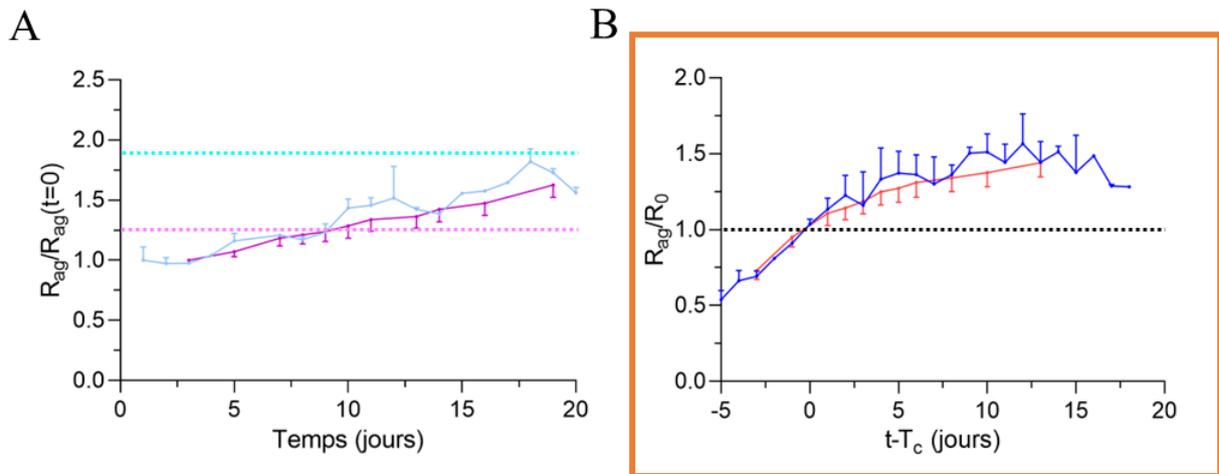
Nous pouvons noter une excellente reproductibilité entre les deux expériences indépendantes du protocole 3 (organoïdes fixés, Figure 3.3C). En ce qui concerne le protocole 1, si l'on ne considère qu'une seule encapsulation (Figure 3.3A), l'allure des courbes de croissance est bien conservée entre les puits, et les différences de densité cellulaire initiales ne se traduisent que par le fait que la confluence (en présence de l'insuline) n'est pas tout à fait synchronisée. Mais, entre deux séries d'encapsulation, nous observons des différences de comportement très importantes (données non montrées). En absence d'insuline, la croissance des organoïdes n'est détectable que vers le 15<sup>ème</sup> jour. En présence d'insuline, la croissance des organoïdes semble plus lente que dans les données obtenues selon le protocole 3 (dans la phase de croissance) et présente un rebond marqué. Celui-ci n'est pas observé clairement dans les expériences conduites selon les protocoles 2 et 3. Pour cette raison, nous avons décidé de ne pas tenir compte de ces expériences pour une analyse quantitative. Notre hypothèse est que la sortie de l'incubateur du porte-échantillon contenant les organoïdes placés en micro-puits, leur mise sous microscope et la prise d'images (pendant environ 30 min) à température ambiante par jour sont suffisantes pour perturber la croissance et différenciation via les fluctuations de température. Nous n'avons pas trouvé des résultats similaires dans la littérature, mais il a été rapporté que des hypothermies modérées (33°C) pouvaient affecter la voie de signalisation Akt médiée par l'insuline et conduire à des dysfonctions adipocytaires (Yamaoka et al., 2014).

Pour tenter de surmonter ces difficultés liées aux changements de température, j'ai participé au développement d'un dispositif appelé *IncubaScope*. Il s'agit d'un microscope compact assemblé pour que ses dimensions et ses caractéristiques techniques lui permettent d'être placé dans un incubateur. La réalisation a été achevée il y a peu de temps, ce qui ne m'a pas permis de l'utiliser directement pour mes expériences. L'article est reproduit en annexe « Publication 2 ».

Enfin, les données obtenues selon le protocole 2 semblent aussi très différentes. Dans ce cas, les capsules ont été constamment gardées sur la platine du microscope, dans une enceinte thermostatée conçue à cet effet. Même si la stabilisation en température et composition en gaz est a priori moins bonne que dans un incubateur de salle de culture, ces capsules n'ont pas subi des variations de températures aussi amples et répétées que dans le cas du protocole 1. Cependant, cette expérience est réalisée avec des capsules dont la taille du cœur est très réduite. Par souci de comparaison, la figure 3.4 fournit une nouvelle représentation des données en

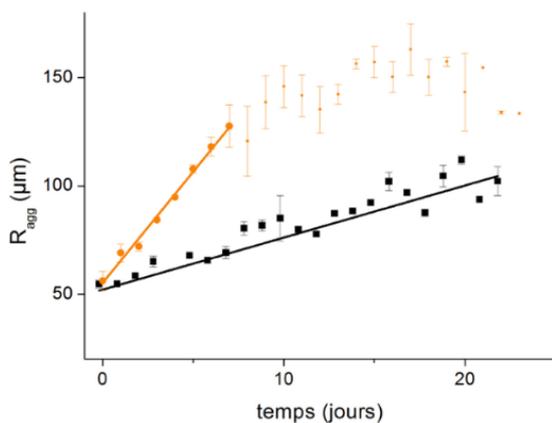
gardant que celles issues des expériences conduites selon les protocoles 2 et 3.

En condition adipogénique, qui est la situation « contrôle positif », la confluence est toujours atteinte. Aussi, les rayons des agrégats,  $R_{ag}$ , ont-ils été normalisés par le rayon initial de la capsule,  $R_0$  (i.e. rayon de l'agrégat à la confluence). Un ajustement temporel fixe aussi le temps de confluence  $T_c$  comme référence. Nous observons que le rayon de l'agrégat augmente linéairement avec le temps jusqu'à la confluence, puis subit un ralentissement après confluence. En condition non-adipogénique, puisque la confluence est rarement ou à peine atteinte, nous avons normalisé  $R_{ag}$  par le rayon initial des agrégats,  $R_{ag}^0$ . Là aussi une croissance linéaire du rayon de l'agrégat est observée sur toute la durée de l'expérience.



**Figure 3.4 : Croissance normalisée du rayon des agrégats 3T3F442A selon les protocoles 2 et 3, avec et sans milieu adipogénique.** (A) En milieu non adipogénique,  $R_{ag}/R(t=0)$  en fonction du temps. Protocole 3 (cyan) ; Protocole 2 (magenta). Les pointillés de couleurs correspondent au rayon moyen de confluence. (B) En milieu adipogénique,  $R_{ag}/R_{ag}^0$  en fonction du temps. Protocole 3 (bleu) ; Protocole 2 (rouge). Les pointillés en noirs correspondent au rayon moyen de confluence.

Dans les deux cas, les taux de croissance ont été quantifiés par un ajustement linéaire avant la confluence (Figure 3.5). En l'absence d'insuline,  $dR(t)/dt \sim 2.4 \mu\text{m} \cdot \text{jour}^{-1}$  soit  $0.1 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$ . En présence d'insuline,  $dR(t)/dt \sim 10.3 \mu\text{m} \cdot \text{jour}^{-1}$  soit  $0.4 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$ .



**Figure 3.5 : Ajustement linéaire de la croissance des agrégats des protocoles 2 et 3 avant confluence.** En milieu adipogénique (orange). En milieu non-adipogénique (noir). Traits pleins : courbes d'ajustement linéaire

Si les cellules se divisent de façon homogène dans tout le volume de l'organoïde, on s'attend à

une croissance exponentielle :  $N(t) \propto V(t) \approx V_0 e^{t/\tau}$  avec  $\tau_v$  le temps de doublement. Dans la limite  $t \ll \tau$ ,  $V(t) \approx V_0 t/\tau_v$  soit  $R(t) \approx R_0(t/\tau_v)^{1/3}$ .

A l'inverse, si les cellules ne se divisent qu'en surface, sur une couronne d'épaisseur  $\lambda$  avec le temps de doublement  $\tau_s$ , on aurait, avec l'hypothèse de non compressibilité cellulaire :

$$\frac{dN}{N} = \frac{dV}{V} = 3 \frac{dR}{R} = 3 \frac{\lambda}{R} \frac{1}{\tau_s} dt \quad (3.1)$$

soit :

$$R(t) = R_0 + \frac{\lambda}{\tau_s} t \quad (3.2)$$

En supposant que  $\tau_s = \tau_{2D} \approx 7h$ , les taux de croissance mesurés donneraient :

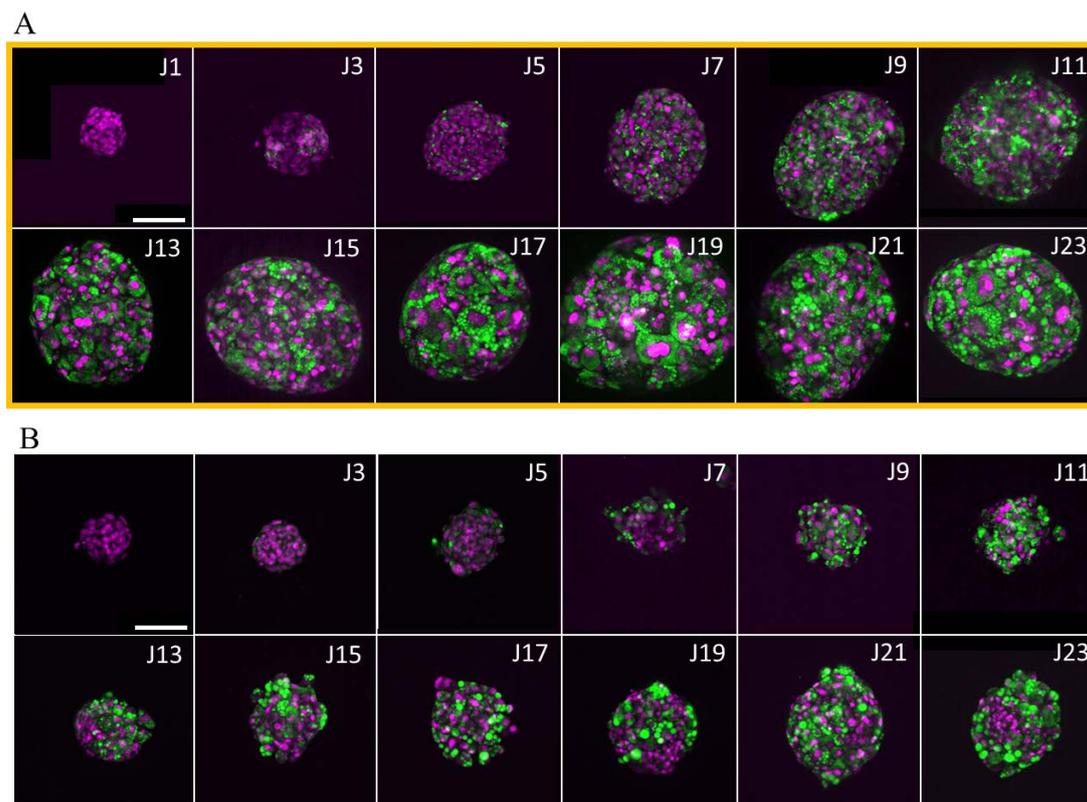
- en absence d'insuline,  $\lambda = 0.7 \mu\text{m}$ , soit environ 1/10 d'une taille cellulaire;
- en présence d'insuline :  $\lambda = 2.8 \mu\text{m}$ , soit environ 1/3 d'une taille cellulaire.

Ces valeurs montrent que le modèle de croissance surfacique n'est pas valable, compte-tenu des hypothèses sous-jacentes fortes. La première hypothèse est que le taux de doublement en agrégat 3D serait identique à celui trouvé à 2D. Si l'on fait l'hypothèse alternative que la croissance se produit sur une couronne d'épaisseur cellulaire, soit environ  $7 \mu\text{m}$ , on trouverait  $\tau_s = 70 \text{ h} = 3$  jours en l'absence d'insuline, et un peu moins d'un jour en présence d'insuline. Comme nous n'avons pas fait de mesure directe du taux de doublement à 3D, nous ne pouvons pas écarter ni valider cette possibilité. Toutefois, une hypothèse préliminaire à ce calcul simplifié consiste à considérer que le volume cellulaire reste constant. Or, ce n'est pas le cas puisque l'on a vu que les agrégats préadipocytaires se chargent de GLs dans les deux conditions de culture. Le contenu lipidique, variable d'une cellule à l'autre, peut doubler ou tripler le volume cellulaire (hypertrophie cellulaire). Une autre condition limite serait donc que la prolifération cellulaire a une contribution négligeable à l'augmentation observée du rayon de l'agrégat et que celle-ci est principalement due à l'augmentation du volume des GLs, signatures de la différenciation. Pour tester cette hypothèse en milieu non-adipogénique sur tout le cours de l'expérience et en milieu adipogénique une fois que l'expansion clonale est terminée, il nous faut quantifier la quantité de lipides stockée au cours de la croissance des organoïdes.

### 3.3 Différenciation d'organoïdes de préadipocytes encapsulés

La Figure 3.6 montre une série de projections de piles d'images prises en microscopie confocale d'organoïdes de préadipocytes fixés et marqués au Hoechst ( $2\mu\text{M}$ ) et au Bodipy ( $8\mu\text{M}$ ). Avant même toute quantification, il apparaît que la croissance est plus importante en milieu adipogénique. Toutefois, en l'absence d'insuline, des GLs apparaissent dès J5 et leur quantité augmente de façon significative au cours du temps.

Pour suivre la cinétique de différenciation, il faut pouvoir imager les organoïdes en profondeur et en faire une analyse quantitative. Dans les deux sous-sections suivantes je précise la problématique, détaille et justifie les hypothèses que nous avons dû faire.



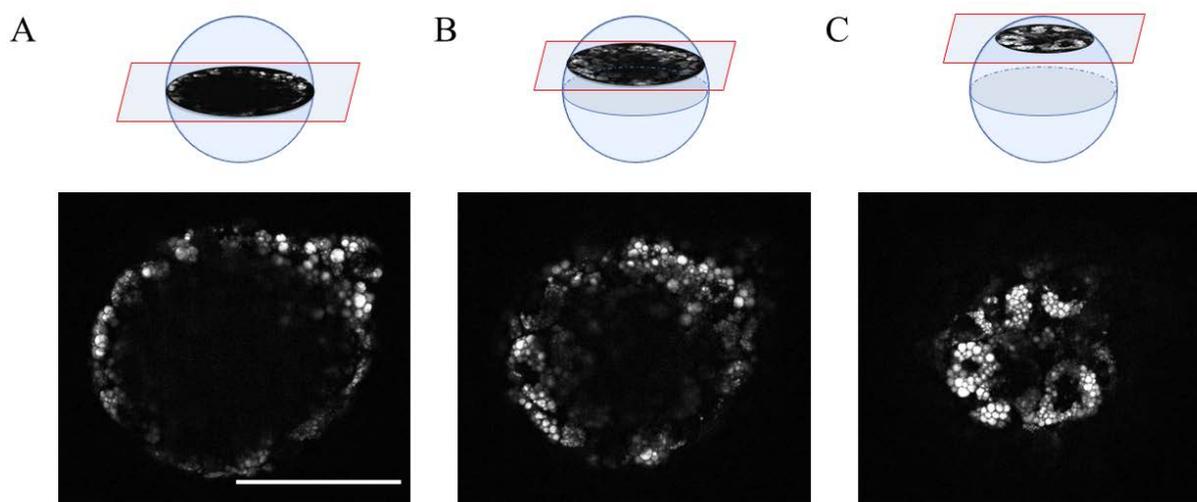
**Figure 3.6 : Images en microscopie confocale d'agrégats de préadipocytes fixés en fonction du nombre de jours de culture dans un milieu adipogénique et non adipogénique.** Projection d'intensité moyenne des piles d'images confocales. Marquage des noyaux par Hoechst (magenta) et des gouttelettes lipidiques par Bodipy (vert). (A) En milieu adipogénique. (B) En milieu non-adipogénique. Barre d'échelle : 100 $\mu$ m.

### 3.3.1 Problématique liée à la géométrie 3D pour l'imagerie en profondeur

Comme mentionné au chapitre 1, la visualisation de l'intérieur d'organoïdes est rendue difficile à cause du caractère fortement diffusant des tissus biologiques. On peut même anticiper que cette difficulté soit encore accrue dans des agrégats d'adipocytes remplis de gouttelettes lipidiques qui créent des hétérogénéités locales d'indice de réfraction. Des techniques de transparisation sophistiquées ont été développées (Richardson and Lichtman, 2015) alors que d'autres consistent seulement à remplacer l'eau des échantillons par un liquide d'indice de réfraction proche de celui des lipides (Ke et al., 2013). Nous avons choisi d'imprégner nos échantillons dans du glycérol, mais les résultats n'ont pas été concluants et les GLs semblent être des obstacles optiques trop diffusants. Nous avons donc décidé d'imager les organoïdes en conditions natives et de trouver d'autres approches pour mener une analyse quantitative et volumétrique en imagerie des organoïdes, moyennant des hypothèses et approximations décrites plus bas.

La Figure 3.7 montre trois coupes optiques d'un organoïde de préadipocytes différenciés, de 146  $\mu$ m de rayon, prises à trois altitudes différentes. On observe clairement que, près de l'apex de l'organoïde, les structures sont bien contrastées et visibles de manière homogène sur l'ensemble de la coupe, tandis que lorsque l'on s'approche de l'équateur, les GLs ne sont visibles en fluorescence que sur un anneau d'épaisseur de l'ordre de 14  $\mu$ m environ (voir Vidéo

6 et Vidéo 7). Il est très probable, compte tenu du caractère très diffusant des GLs que la lumière (excitation et/ou émission) n'atteigne pas le cœur de l'organoïde. Le rendu 3D réalisé sur les Vidéo 9 nous montre bien que seule la surface des agrégats est visible. Toutefois, nous ne pouvons pas totalement exclure la possibilité que les GLs ne sont pas réparties uniformément et soient localisées en périphérie des coupes, donc en surface de l'organoïde.



**Figure 3.7: Coupes optiques de différentes zones d'un organoïde de 3T3F442A en cours de différenciation.** (A) Coupes optiques équatoriales, à  $z=0\mu\text{m}$ . (B) Coupes optiques entre l'équateur et l'apex, à  $z=+73\mu\text{m}$ . (C) Coupes optiques près de l'apex, à  $z=+121\mu\text{m}$ . On considère ici un référentiel ayant l'équateur pour origine, et les dimensions positives sont dirigées vers l'objectif du microscope. Les GLs sont marquées par du Bodipy 505/515. Barre d'échelle :  $200\mu\text{m}$ .

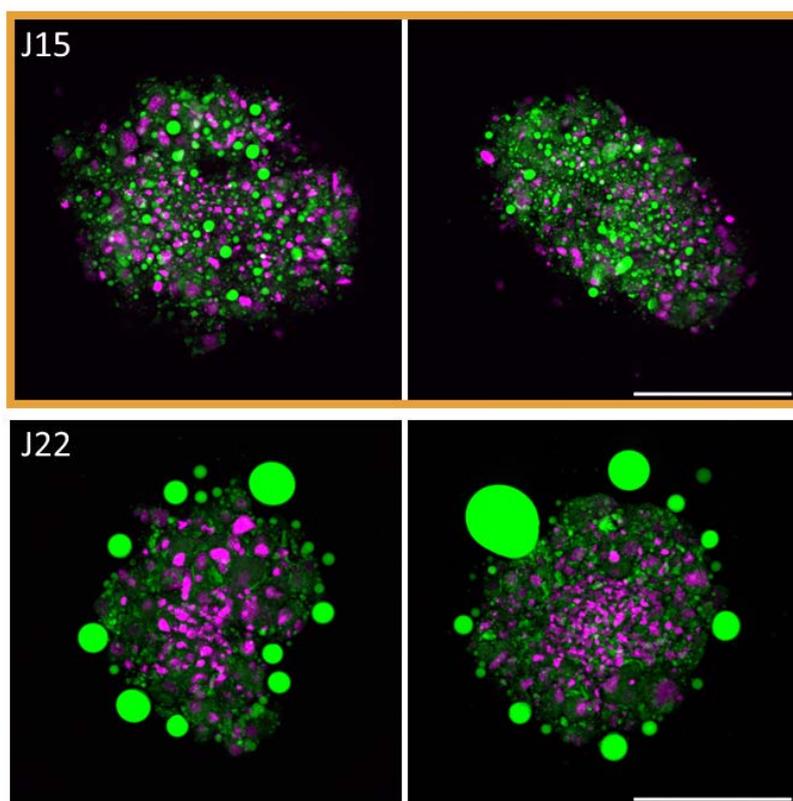
### 3.3.2 Principe de détermination de la répartition et du nombre de gouttelettes lipidiques à partir de coupes histologiques

Pour déterminer la répartition des GLs, plutôt que d'imager les organoïdes *in toto* par transparence, nous avons décidé d'effectuer des coupes physiques (non optiques) suivies d'un immuno-marquage (voir protocole, section 2.7.2). Ces coupes sont effectuées avec un microtome permettant de réaliser des tranches de section (coupes) de quelques microns d'épaisseur ( $10\mu\text{m}$  dans notre cas). Les coupes sont récupérées sur des lames de verre. Après marquage des noyaux et des GLs, elles sont ensuite être imagées au microscope sur toute leur épaisseur.

Les expériences ont été réalisées par Adeline Boyreau, ingénieure au laboratoire. Cette technique demande un certain savoir-faire pour ne pas endommager ou déformer les organoïdes au moment de la coupe. D'autre part, après la coupe, nous perdons l'information relative à la position de celle-ci dans l'organoïde. Nous avons donc pré-sélectionné des organoïdes ayant un rayon moyen similaire avant leur fixation, pour pouvoir remonter ensuite à des coupes quasi-équatoriales.

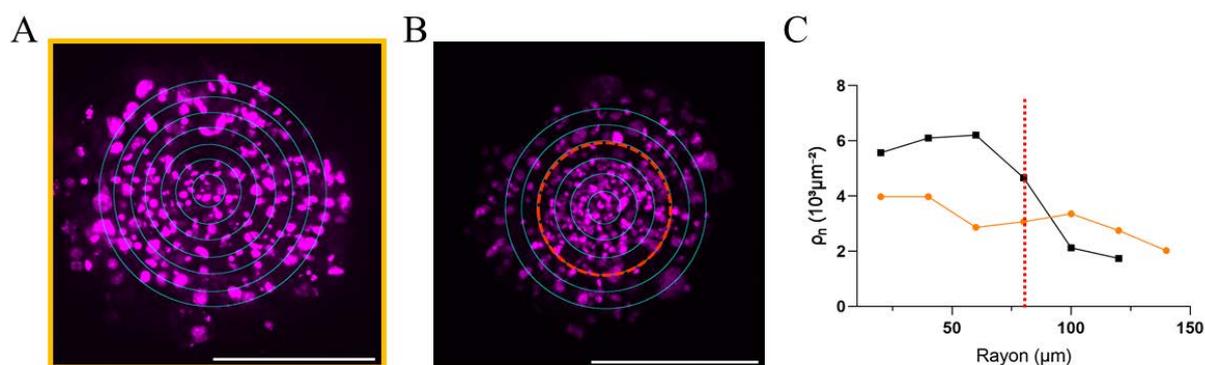
La Figure 3.8 montre quatre coupes représentatives d'agrégats adipocytaires dont deux cultivés en milieu avec insuline, et deux autres en milieu sans insuline, avec un marquage des noyaux (magenta) et des GLs (vert). Qualitativement, une répartition uniforme des GLs est observée pour une culture en milieu adipogénique, en accord avec des données précédemment rapportées

sur une lignée de préadipocytes similaires (3T3L1) (Klingelutz et al., 2018). En milieu sans insuline, comme nous l'avons montré en début de chapitre, les organoïdes présentent malgré tout des GLs. On retrouve ce résultat sur les coupes histologiques. Mais ces images sont très différentes des celles obtenues en milieu riche en insuline. En effet, sur la Figure 3.8 montrant des coupes représentatives, on observe de grosses GLs à la surface de l'organoïde et très peu au centre. On peut faire l'hypothèse que des GLs initialement présentes en périphérie de l'échantillon ont été expulsées à la suite de la fixation et de la coupe. Cela suggérerait que, dans le cas d'une culture en milieu normal, la production de GLs est restreinte aux zones périphériques.



**Figure 3.8 :** Coupes histologiques d'agrégats adipocytaires cultivés en milieu adipogénique ou non adipogénique. En encadré orange, en milieu adipogénique après 15 jours de culture. En-dessous, en milieu non adipogénique après 22 jours. Marquage des GLs au Bodipy (vert) et des noyaux au Hoechst (magenta). Barre d'échelle : 200  $\mu\text{m}$ .

Bien que n'ayant pas de preuve directe pour valider cette hypothèse, nous pouvons la conforter par l'observation de la répartition des noyaux cellulaires. En ne conservant que le canal « hoechst » sur les images de coupes d'organoïdes, on obtient les images de la Figure 3.9 en milieu adipogénique (Figure 3.9A) et non-adipogénique (Figure 3.9B). Qualitativement, il est frappant que l'organoïde en présence d'insuline présente une distribution homogène des noyaux tandis que ceux-ci semblent plus densément regroupés au centre de l'organoïde cultivé en absence d'insuline, avec comme corollaire, une déplétion des noyaux en périphérie. Plus quantitativement, nous avons analysé la densité surfacique radiale de noyaux  $\rho_n$ . Pour cela nous avons compté le nombre de noyaux pour chaque couronne d'intervalle radial de 20  $\mu\text{m}$ , en partant du centre de l'organoïde.



**Figure 3.9 : Répartition radiale des noyaux au sein d'agrégat de 3T3-F442A.** À gauche, coupes histologiques d'agrégats adipocytaires cultivés en milieu adipogénique (A) et non adipogénique (B), pendant 15 jours (A) ou 22 jours (B). Les couronnes de comptage d'une largeur de 20 μm sont indiquées en cyan. (C) Evolution de la densité surfacique cellulaire en fonction de la distance radiale en partant du centre. Barre d'échelle : 200 μm

De cette analyse, nous pouvons remarquer qu'en milieu adipogénique,  $\rho_n$  varie peu, quelle que soit la position radiale. En revanche, en milieu non adipogénique, la densité de noyaux  $\rho_n$  diminue brutalement d'un facteur 2 au-delà d'un rayon d'environ 80 μm pour cette coupe. Nous pouvons donc estimer que les GLs sont essentiellement concentrées dans une couronne périphérique d'environ 40 μm d'épaisseur, soit environ 1/3 du rayon de l'agrégat. Nous utiliserons ce résultat pour estimer par extrapolation la production de GLs dans des agrégats en condition de culture non-adipogénique.

Nous avons utilisé le plugin WEKA segmentation (voir Section 2.7.2) pour déterminer le nombre et la surface des GLs dans les deux conditions de culture. Comme le nombre de GLs visibles est assez faible à l'équateur de l'agrégat (Figure 3.7A), nous avons pris pour chaque agrégat trois coupes optiques différentes. Pour chaque coupe optique, nous mesurons le nombre et la surface des GLs. Nous mesurons ensuite, à la main, la surface de la couronne observable associée. Nous pourrions alors en déduire une densité surfacique du nombre et de la surface totale des GLs.

En milieu adipogénique, nous faisons l'hypothèse d'une distribution homogène des GLs. La mesure de la zone sur laquelle les GLs sont détectées et leur analyse en taille et nombre nous permet d'extrapoler et déduire la densité surfacique de GLs à partir de la mesure de la surface de la section de l'organoïde.

En milieu normal, à partir des densités surfaciques mesurées dans la couronne visible en microscopie confocale et de l'hypothèse (validée ci-dessus) que les GLs sont produites sur une couronne périphérique représentant environ 1/3 du rayon de l'agrégat, on en déduit le nombre et l'aire totale des GLs par section d'organoïde.

Les deux sous-sections suivantes présentent l'étude de la variation temporelle de la quantité de lipides produits et la distribution en taille des gouttelettes lipidiques. Ces deux quantités pourraient être mesurées simultanément si nous pouvions visualiser l'ensemble des agrégats avec une bonne résolution spatiale en profondeur. Ici, nous le ferons de façon indépendante. Tout d'abord, en utilisant le plugin de segmentation Weka, qui permet de bien segmenter les gouttelettes, mais conduisant éventuellement à une sous-estimation de la quantité de lipides, nous chercherons à déterminer le processus de production des GLs par le suivi de leur distribution de tailles. S'agit-il d'un processus de nucléation-croissance classique ou plutôt de coalescence de GLs ? Ensuite, par un seuillage direct, ne permettant pas une séparation efficace

des GLs mais une bonne détermination de leur aire totale, nous déterminerons la quantité de lipides totale par agrégat au cours du temps.

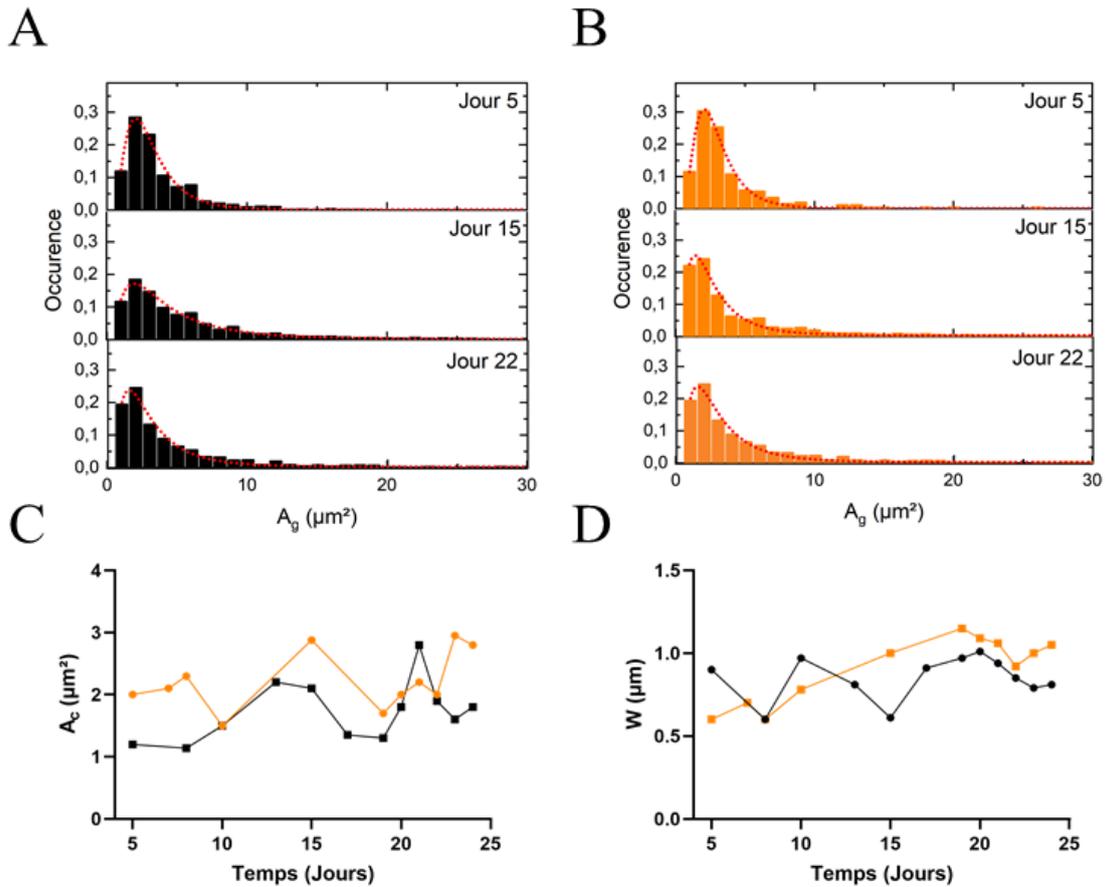
### 3.3.3 Évolution de la distribution de taille des gouttelettes lipidiques

Nous avons segmenté sur 3 coupes par organoïde et sur au moins 2 organoïdes différents, les GLs marquées par le Bodipy et nous avons mesuré leur aire apparente. Ceci a été réalisé pour chaque condition de culture et sur 24 jours de culture (1 image par jour). Ici, nous n'avons pas besoin d'extrapoler aux GLs non détectées, comme expliqué au paragraphe précédent, car l'objectif est d'obtenir une forme de distribution, où le nombre total d'occurrences est normalisé.

La Figure 3.10 donne trois exemples de distributions en milieux non-adipogénique et adipogénique. Cela correspond à la détection de 107 à 987 GLs par pas de temps pour chaque condition. Ces histogrammes sont piqués et dissymétriques suggérant un ajustement possible par une distribution log-normale, qui est beaucoup utilisée en biologie, chimie et physique, notamment dans les processus de nucléation et de croissance. Même si des corrections peuvent être apportées sur la signification des différents paramètres (Bergmann and Bill, 2008), nous resterons sur une forme standard, à savoir:

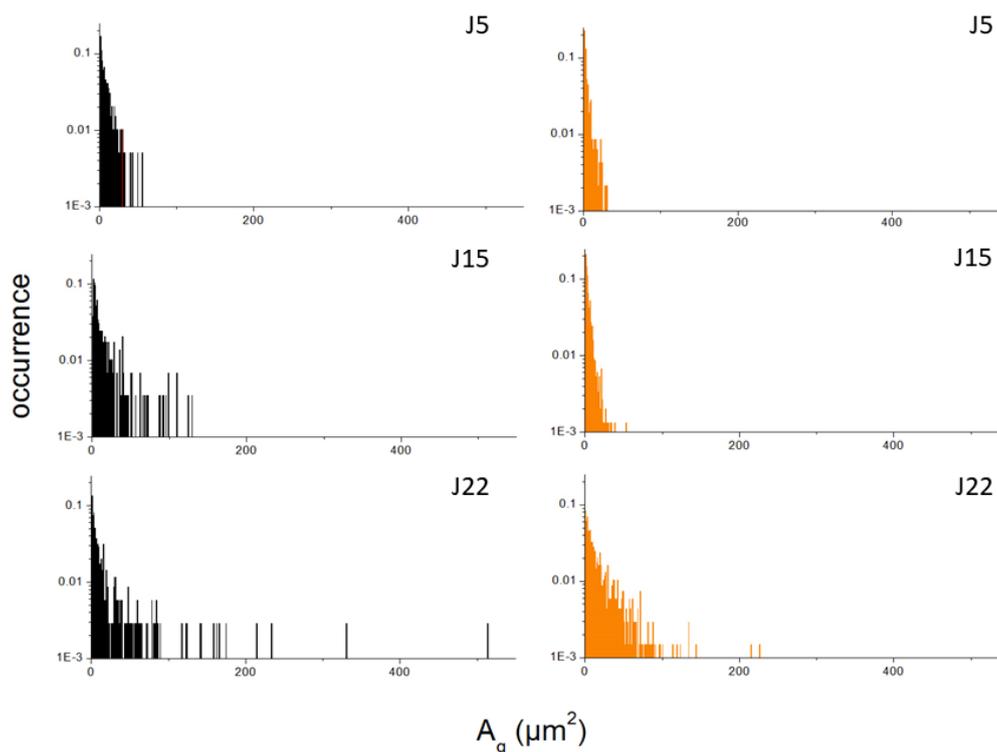
$$N_g = N_0 + \frac{I}{\sqrt{2\pi wA}} e^{-\left(\frac{\ln(A_g/A_c)^2}{2w^2}\right)} \quad (3.3)$$

avec  $N_g$  le nombre de GLs,  $A_g$  l'aire des GLs,  $A_c$  la valeur moyenne de  $A$ ,  $w$  la largeur de la distribution,  $I$  l'amplitude de la distribution,  $N_0$  la ligne de base en nombre de GLs.



**Figure 3.10 : Distributions normalisées, en milieux non-adipogénique et adipogénique, des aires de gouttelettes lipidiques avec ajustement log-normal.** (A) En milieu non-adipogénique, (B) En milieu adipogénique, les lignes en pointillés rouges sont les ajustements selon Eq. (12), (C) valeur de  $A_g$  la plus probable en fonction du temps. (D) Largeur  $w$  des distributions en fonction du temps. Milieu adipogénique (orange) ; Milieu non-adipogénique (noir).

Dans un processus de nucléation croissance, après l'apparition de petites GLs par nucléation, nous nous attendons à observer une distribution dont le pic se déplace vers les valeurs de  $A_g$  élevées au fur et à mesure de la croissance des GLs, voire à un élargissement des distributions en cas de nouvelles nucléations (pour les petites valeurs de  $A_g$ ) et d'évènements de coalescence (pour les grandes valeurs de  $A_g$ ). Pourtant, nous observons, sur la Figure 3.10A-B, que les formes des distributions normalisées sont très similaires, à la fois entre les deux conditions de culture et au cours du temps. Les tracés du pic et de la largeur de la distribution (Figure 3.10C-D) montrent en effet que la plupart des GLs détectées ont une aire de l'ordre de 2  $\mu\text{m}^2$ , qui évolue peu au cours du temps, et que la largeur à mi-hauteur de la distribution est également quasi-constante, à l'exception du milieu adipogénique où elle double en 24 jours. En observant les images de microscopie (Figure 3.6), il apparaît au cours du temps de grosses GLs. Mais, il s'agit d'évènements rares par rapport à la pléthore de micro-GLs nucléées. Ceux-ci sont écrasés par une représentation en échelle linéaire. Pourtant, ils vont a priori contribuer beaucoup à la production de lipides totale. Aussi, avons-nous représenté sur la Figure 3.11 ces mêmes distributions en échelle semi-logarithmique.

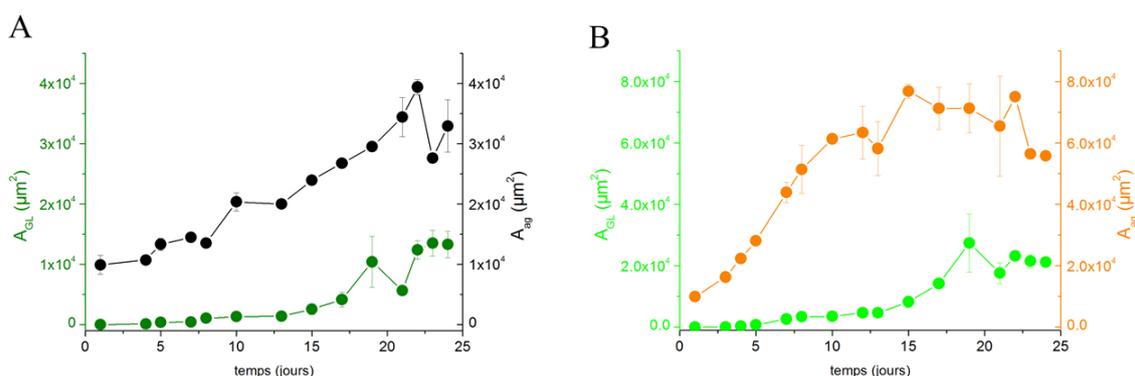


**Figure 3.11 : Distributions, en milieux non-adipogénique et adipogénique, des aires de gouttelettes en échelle semi-logarithmique.** En noir, milieux non-adipogénique et en orange, milieux adipogénique.

Il apparaît alors nettement que i) en milieu non-adipogénique, de plus en plus de GLs de taille pouvant excéder  $200 \mu\text{m}^2$  (i.e.  $8 \mu\text{m}$  de rayon) apparaissent, et ii) en milieu adipogénique, les grosses GLs (de plus de  $8 \mu\text{m}$  de rayon) sont quasi-inexistantes (à l'exception de 2 évènements à J22). Cette distribution log-normale sans grosses GLs et qui s'élargit au cours du temps suggère que l'adipogénèse est dominée par la nucléation et accompagnée d'une croissance modérée. En revanche, dans le cas de la différenciation spontanée (sans insuline), l'existence de ces nombreuses petites GLs accompagnées de quelques GLs gigantesques suggère un processus de coalescence favorisé.

### 3.3.4 Quantification de la production de lipides au cours du temps

Pour quantifier la production de GLs au cours du temps, nous utilisons un seuillage qui ne cherche pas distinguer toutes les GLs, car la segmentation s'accompagne d'une « érosion » inévitable et donc une sous-estimation de la quantité de lipides. Ici, à partir d'une coupe optique, nous déterminons, sur une couronne où les GLs sont bien visibles, l'aire totale des GLs, puis extrapolons à toute la section comme indiqué au paragraphe 3.2. La Figure 3.12 montre l'évolution temporelle de la surface totale de GLs sur une section équatoriale,  $A_{GL}$ , ainsi que l'aire de la section équatoriale de l'agrégat,  $A_{ag}$ , dans les deux conditions de culture, à savoir en présence et en l'absence d'insuline. Les organoïdes de préadipocytes en milieu adipogénique ont une croissance plus importante qu'en milieu normal, puisque la section équatoriale (ou l'aire projetée) est environ deux fois supérieure à la fin de l'expérience (jour 25). Également, bien que l'allure des courbes  $A_{GL}(t)$  soit similaire dans les deux conditions, la production de GLs est aussi environ deux fois plus importante en termes de surface, en présence d'insuline.



**Figure 3.12 :** Évolution temporelle de la surface totale AGL des GLs à l'équateur et de la surface de la section équatoriale de l'agrégat, Ag, avec et sans milieu adipogénique. (A) En milieu non-adipogénique. (B) Évolution en milieu adipogénique

Afin d'exploiter davantage ces courbes de croissance d'agrégat et de production de lipides, nous allons conduire une étude similaire à 2D en monocouche. Nous combinerons les résultats obtenus à 2D et 3D pour proposer, dans la section « Discussion », une explication globale du processus de différenciation sans induction chimique des préadipocytes.

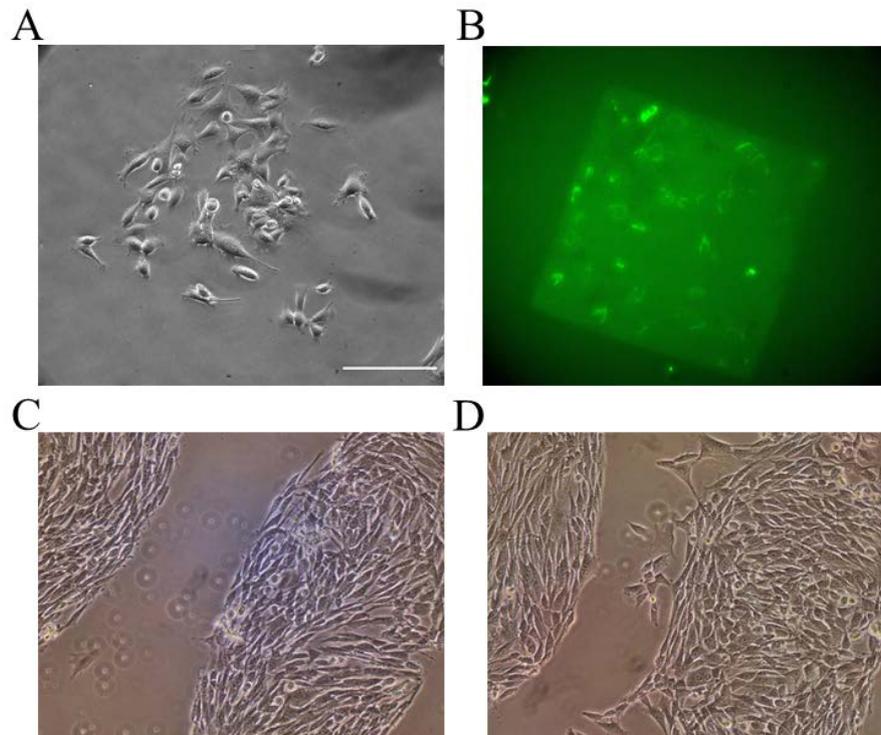
### 3.4 Monocouches de préadipocytes confinées spatialement à 2D

Pour contourner partiellement les difficultés d'imagerie à 3D, nous avons décidé d'étudier quantitativement la croissance d'une monocouche de préadipocytes à 2D et la production éventuelle de GLs en présence ou en l'absence de milieu adipogénique. Puisque le confinement dans la capsule n'est pas atteint en l'absence d'insuline, aucune force mécanique extérieure n'est appliquée. En revanche, l'encapsulation des préadipocytes 3T2-F4421 conduit immédiatement à la formation d'agrégats, ce qui pourrait être vu comme un état de compactage ou de confluence spatiale à 2D. Aussi avons-nous choisi d'ensemencer des préadipocytes sur des motifs adhérents 2D et d'étudier la prolifération, le devenir cellulaire et de suivre la différenciation adipocytaire.

#### 3.4.1 Problèmes d'échappement cellulaire sur des substrats à motifs imprimés

Nous avons imprimé des motifs adhérents de fibronectine selon le protocole décrit à la Section 2.6.2. Comme on le voit sur Figure 3.13A, les cellules adhèrent bien au substrat sur des zones semblant correspondre au motif imprimé (carré ici), et cela est confirmé par le marquage fluorescent de la fibronectine au Cy3 (Figure 3.13B). Si la densité cellulaire est augmentée à l'ensemencement ou si l'on attend suffisamment (pour rappel, le taux de doublement des F442A est d'une dizaine d'heures à 2D – voir Section 2.3.2), indiquant que les cellules sont à confluence ou confinées spatialement par le pattern (Figure 3.13C). Toutefois, malgré de légères améliorations du protocole (notamment dans le choix du substrat, la qualité du rinçage, remplacement du Pluronic F127, copolymère tribloc non-ionique de type PEO–PPO–PEO par du PEG-PLL (poly(l-lysine)-g-poly(éthylène glycol)), copolymère dibloc également utilisé pour créer des zones « cell-repellent », dont le bloc PLL est connu pour induire une forte adsorption électrostatique sur le verre ou le plastique), nous n'avons pas pu garder les cellules

confinées plus de 24h (voir Vidéo 10 ). Celles-ci finissent systématiquement par envahir les zones extérieures du pattern, recouvertes de Pluronic ou de PLL-PEG. Notons que cet effet de débordement des patterns a déjà été rapporté, mais souvent après des durées plus longues de culture (Lussi et al., 2006)

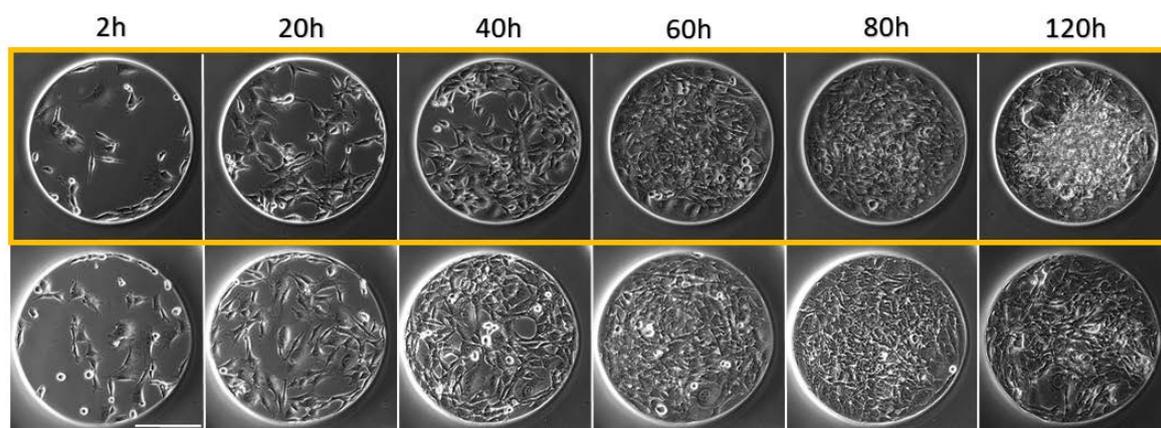


**Figure 3.13 : Confinement cellulaire à 2D par micro-impession d'îlots adhérents et échappement cellulaire à long terme.** (A) Image en contraste de phase de cellules 3T3F442A adhérant sur le pattern couvert de fibronectine, barre d'échelle : 200 $\mu$ m. (B) Image en épifluorescence du pattern de fibronectine conjugué Cy3 fluorescente. 3h après ensemencement. (C) Image en contraste de phase de cellules adhérant sur les patterns 10h après ensemencement. (D) Image de ces mêmes patterns 20h après ensemencement.

Il a donc fallu trouver un autre moyen pour confiner les pré-adipocytes à 2D sur une durée de culture plus longue. C'est pourquoi nous avons développé la fabrication de motifs topographiés par gaufrage détaillée à la Section 2.6.3.

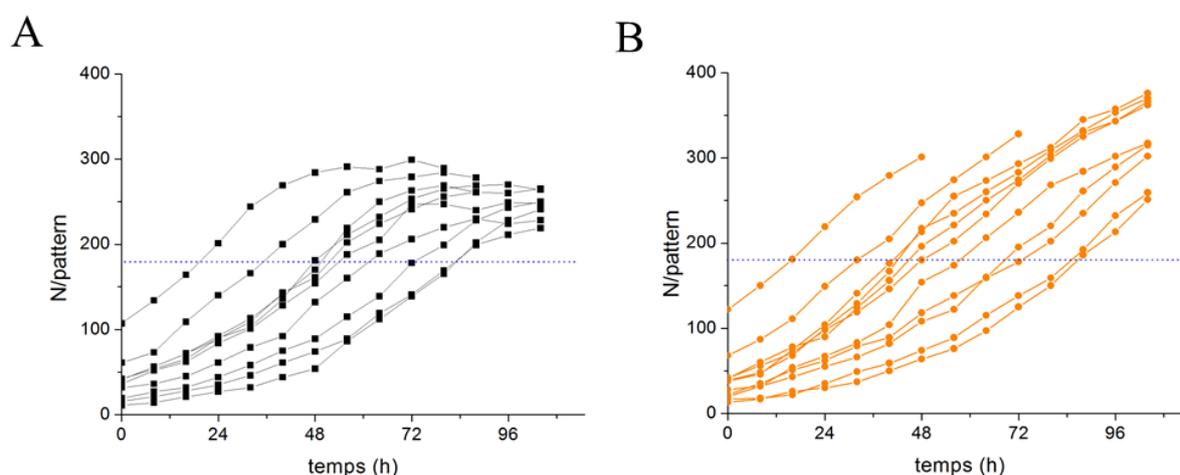
### 3.4.2 Cinétique de croissance à 2D sur motifs topographiés

Nous avons dans un premier temps mesuré la cinétique de croissance cellulaire sur des motifs topographiés 2D de forme circulaire, de manière à minimiser les effets singuliers observés parfois aux angles de patterns carrés ou polygonaux (Kilian et al., 2010). Le rayon des patterns utilisés est fixé à 250  $\mu$ m, ce qui correspond à une aire de  $1.96.10^5 \mu\text{m}^2$ , soit environ 0.2  $\text{mm}^2$ . Nous n'avons pas utilisé de marquage nucléaire pour éviter la cytotoxicité cellulaire. Afin d'éviter les variations de température, les cellules ont été imagées dans l'incubateur de microscope. Nous avons pris une image, en champ clair, de chaque pattern toutes les 2 heures. La Figure 3.14 montre quelques images représentatives au cours du temps dans les deux conditions. A partir des images en champ clair, le comptage a été réalisé manuellement toutes les 8h. Au-delà d'environ 350 cellules par motif, le comptage n'est plus possible (voir Vidéo 11 et Vidéo 12).



**Figure 3.14 : Croissance des pré adipocytes en 2D sur des patterns circulaires.** (A) Images en lumière blanche des préadipocytes en fonction du temps. En haut, en présence d'insuline (encadré orange). En bas, en l'absence d'insuline. Barre d'échelle : 200 $\mu$ m.

Nous avons tracé le nombre de cellules en fonction du temps (Figure 3.15). Nous avons pris une dizaine de motifs pour chaque condition de culture (milieu non-adipogénique versus adipogénique). Un autre paramètre expérimental a été, de fait, varié, à savoir le nombre initial de cellules par motif. Cela est obtenu automatiquement en raison de l'hétérogénéité inévitable de densité cellulaire au moment de l'ensemencement. Malgré cette diversité des conditions initiales qui conduit à une non-superposition des courbes, les allures des cinétiques de croissance sont similaires pour une même condition de culture, mais très dissemblables en présence ou en absence d'insuline.



**Figure 3.15 : Courbes de croissance du nombre de cellules N sur patterns avec et sans milieu adipogénique.** (A) Evolution temporelle du nombre de cellules dans un milieu non-adipogénique. (B) Evolution temporelle du nombre de cellules dans un milieu adipogénique.

En milieu normal, sur la durée de 4 jours de culture, un plateau est observé (Figure 3.15A), en accord avec l'arrêt de croissance imposé par les contraintes spatiales (inhibition de contact). Comme dans le chapitre 2, l'allure de ces courbes suggère qu'elles peuvent être ajustées par une fonction logistique de la forme :

$$\frac{\tilde{N}(t)}{\tilde{N}_0} = \frac{1}{\left(1 - \frac{\tilde{N}_0}{K}\right)e^{-kt} + 1} \quad (3.4)$$

Avec  $k = 1/\tau$  le taux de prolifération  $\tilde{N}(t)$  et  $\tilde{N}_0$  les densités de cellules à  $t$  et  $t=0$ , i.e. le nombre de cellule par unité de surface  $K$  la densité de capacité de charge (« capacity density ») définie comme la densité à laquelle l'inhibition de contact fait chuter le taux de croissance net à zéro. (Rappel :  $\tilde{N}(t)/N_0$  est solution de l'équation différentielle  $\frac{d\tilde{N}(t)}{dt} = k\tilde{N}(t)\left(1 - \frac{\tilde{N}(t)}{K}\right)$ )

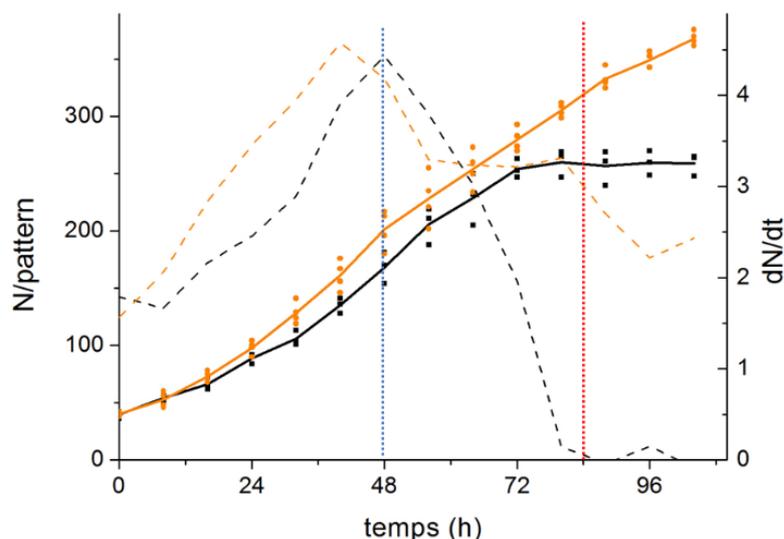
Remarquons que les notations ont été modifiées par rapport au chapitre 2, par convenance pour la suite.

En revanche, en milieu enrichi en insuline, le nombre de cellules  $N(t)$  continue à augmenter significativement au-delà de la confluence, avec un taux de croissance un peu réduit, comme en témoignent les ruptures de pente observées sur les courbes de la Fig. 3.15B. Cet effet pourrait a priori correspondre à l'expansion clonale attendue au cours de la différenciation de pré-adipocytes en adipocytes. Dans un protocole de différenciation adipogénique « classique », les pré-adipocytes sont cultivées en milieu normal jusqu'à la confluence, où il y a arrêt de croissance. C'est à ce moment que le cocktail d'hormones (l'insuline ici) est ajouté, ce qui se traduit par une réentrée des progéniteurs d'adipocytes dans le cycle cellulaire pendant quelques cycles. Cette expansion clonale marque la transition entre la phase de prolifération et celle de différenciation. Dans notre cas, l'insuline est présente depuis le début, ce qui peut expliquer qu'aucun arrêt de croissance proprement dit n'est observé.

Dans les deux conditions de culture, on observe que les courbes sont décalées temporellement en fonction de la densité initiale de cellules. Par exemple, pour le milieu normal, plus la densité de cellules par pattern  $\tilde{N}_0$  est élevée, plus le plateau est atteint rapidement.

Pour une étude plus quantitative, nous avons retenu des motifs pour lesquels le nombre initial de cellules est similaire ( $\tilde{N}_0=37\pm 5$  cellules/pattern) (Figure 3.16). Sur la courbe moyenne, on retrouve les caractéristiques générales. La dérivée de  $\tilde{N}(t)$ , tracée en pointillés, montre que la croissance s'arrête en, milieu normal à  $T_c \sim 84$ h, et correspondant à  $\tilde{N}_c = K = 255$  cellules/pattern, soit une aire cellulaire  $A_c = 730 \mu\text{m}^2$ . Remarquons qu'une estimation visuelle, telle qu'on le fait habituellement pour le passage de cellules en culture, nous aurait conduit à estimer la confluence à  $T_p \sim 48$ h. D'une part, cela signifie qu'on sous-estime généralement le temps de confluence visuellement en salle de culture. Mais d'autre part, on observe que ce temps  $T_p$  correspond au maximum du taux de croissance.

A partir de ce point,  $T_p$ , et jusqu'à  $T_c$ , soit la durée du cycle cellulaire augmente, soit une fraction croissante de cellules se retrouvent en état de croissance arrêtée. Dans les deux cas, dès  $T_p$ , identifié comme le temps caractéristique de « pré-confluence », les cellules commencent à interagir, ce qui affecte la durée de leur cycle. A ce stade, l'aire cellulaire est de l'ordre de  $A_p = 1170 \pm 70 \mu\text{m}^2$ .



**Figure 3.16 : Croissance du nombre de cellules par pattern, avec et sans milieu adipogénique.** En tracé plein, l'évolution temporelle du nombre de cellules par pattern. En tracé pointillé, la dérivée  $dN/dt$ . Trait pointillé bleu et rouge correspondent aux temps  $T_p$  et  $T_c$  (voir texte pour détails).

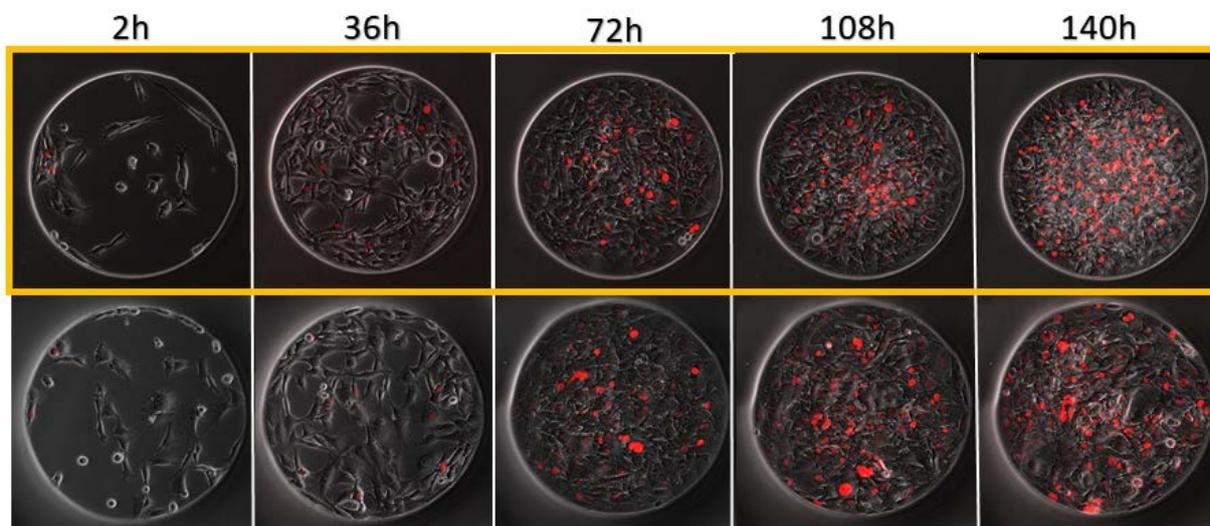
En milieu enrichi en insuline, non seulement la croissance initiale est identique à celle des pré-adipocytes en milieu normal, confirmant que l'insuline n'affecte pas le cycle cellulaire avant la confluence, mais un maximum de taux de croissance est également observé à  $T_p$ . Pour  $t > T_p$ , l'absence de plateau indique, qu'en présence d'insuline, l'encombrement cellulaire conduisant à l'arrêt de croissance est partiellement levé. En effet, en poursuivant l'analyse aussi longtemps qu'il est possible de distinguer les cellules, soit jusqu'à  $t \sim 100h$ , le nombre de cellules continue à croître. A l'issue de ces expériences de 100h, l'aire maximale atteinte est  $A_{max} = 380 \pm 10 \mu m^2$ , soit une compaction de près de 25%. Comme on le voit sur les photographies de la figure 3.14, on ne peut pas exclure qu'à ces temps tardifs, les pré-adipocytes activés par l'insuline commencent à se chevaucher et former des multicouches, ce qui peut biaiser l'estimation de la densité cellulaire. Mais, on observe également que certaines cellules sont plus petites. Un changement de phénotype pourrait donc en partie expliquer ce dépassement de la confluence en présence d'insuline. Cette dernière phase de croissance, ou expansion clonale, a été identifiée comme aboutissant à un arrêt de croissance définitif, qui est un prérequis pour la différenciation terminale (Tang et al., 2003).

### 3.4.3 Impact du confinement 2D sur le cycle et la prolifération cellulaire

Pour tenter de mieux comprendre ces phases d'arrêt de croissance et d'expansion clonale en situation confinée sur pattern, nous avons utilisé les mêmes cellules pré-adipocytaires exprimant le senseur FUCCI (Fluorescence Ubiquitin Cell Cycle Indicator) (données par E. Honoré). Le principe du senseur FUCCI pour suivre le cycle cellulaire a été expliqué brièvement à la Section 2.2.

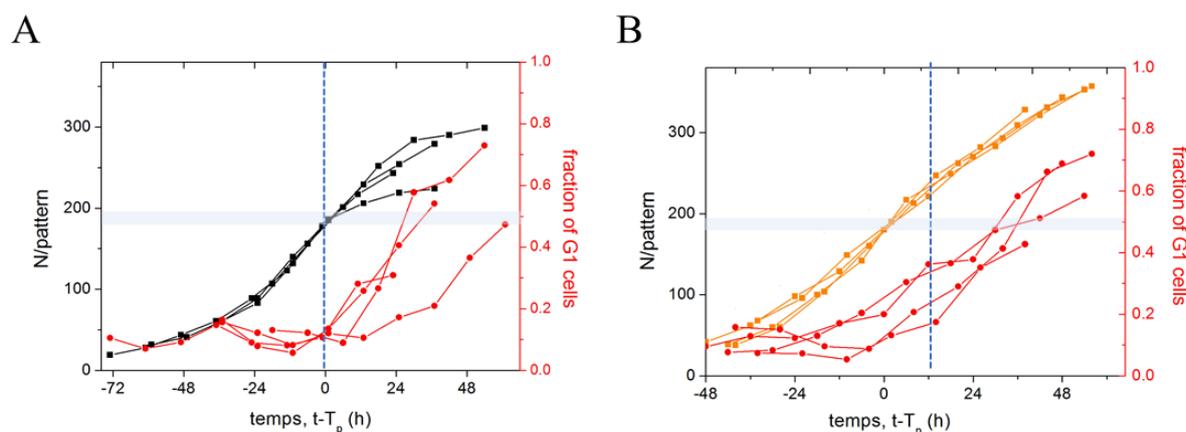
Le signal de fluorescence dans le vert avec une excitation à 488 nm permettant de visualiser les cellules en phase S-G2-M était assez faible entre nos mains et sur nos microscopes. Nous nous sommes donc focalisés sur la fraction des cellules émettant dans le rouge, c'est-à-dire celles en phase G0-G1. La figure 3.17 montre des images de microscopie superposées en champ clair et en fluorescence prises au cours du temps pendant environ 4 jours (voir également Vidéo 13 et Vidéo 14). Nous avons compté les cellules en champ clair, comme à la section précédente,

ainsi que les cellules « rouges » en phase G0-G1 (ou bloquées au checkpoint G1/S). Comme la densité initiale de cellules était différente, nous avons aligné la référence des temps sur  $T_p$  (défini précédemment).



**Figure 3.17 :** Images composites « champ clair/fluorescence » des préadipocytes Fucci sur patterns 2D. En rouge, les cellules en phase G0-G1. Rayon des patterns: 250µm.

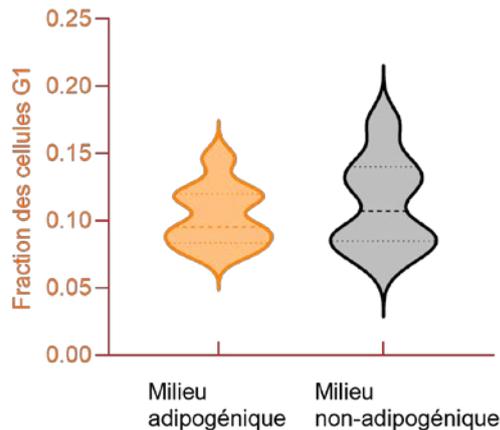
La figure 3.18 représente le nombre de cellules par pattern et la fraction de cellules en phase G1 en fonction de  $(t-T_p)$  en absence et en présence d'insuline. Plusieurs remarques peuvent être faites.



**Figure 3.18 :** Nombre de cellules par pattern et fraction de cellules en phase G1 en fonction de  $t-T_p$ . (A) en milieu non-adipogénique et (B) en milieu adipogénique. Les pointillés bleus correspondent au temps de confluence. La zone grisée correspond à la taille initiale des capsules

Tout d'abord, aux temps courts, i.e. peu après ensemencement, nous observons que la fraction de cellules G1 est de l'ordre de 0.105 (Figure 3.19). Or, dans la littérature, depuis les expériences pionnières sur le senseur Fucci (Sakaue-Sawano et al., 2008), il est rapporté que la durée des phases G1 représente environ 40% de la durée totale du cycle (Piwko et al., 2010; Zerjatke et al., 2017). En fait, cela est valable pour des cellules somatiques dont le temps de division est de l'ordre de la journée. Ici, les progéniteurs adipeux ont une durée de cycle

beaucoup plus courte (10-15h). Les seules données dans la littérature que nous avons trouvées concernent des cellules souches embryonnaires (ES), qui ont aussi un taux de prolifération rapide (16h). Cela est accompagné d'une phase G1 tronquée, de l'ordre de 15-20% de la durée totale du cycle. Cette brièveté de G1 contribuerait à isoler les cellules souches de signaux de différenciation promiscuitaires (Calder et al., 2013; Suvorova et al., 2012). Il est donc raisonnable de supposer ici que la phase G1 des pré-adipocytes est également raccourcie, d'une durée totale de 1.5-2h, compatible avec la fraction de cellules FUCCI rouges mesurée à l'ensemencement.



**Figure 3.19 : Fraction de cellules en phase G1 aux temps courts.** En orange : milieu adipogénique. En noir : milieu non-adipogénique.

Ensuite, on observe sur la figure 3.18 que la fraction de cellules en phase G1 augmente à partir de  $T_p$ . L'effet est très net en milieu non-adipogénique, et un peu plus diffus en milieu enrichi en insuline. Comme anticipé à partir du suivi de la dynamique de croissance cellulaire au paragraphe précédent, on peut en conclure que soit la durée de la phase G1 est allongée, éventuellement concomitamment avec toute la durée du cycle, soit une fraction croissante de cellules reste bloquée en phase G1. Une façon de conclure aurait été de suivre l'ensemble du cycle cellulaire (en microscopie de fluorescence à deux couleurs), mais cela n'a pas été faisable dans nos conditions expérimentales. Pour revenir aux cellules souches embryonnaires, il a été établi une relation entre la durée de la phase G1 et la différenciation (Calder et al., 2013). Il a été toutefois démontré que le gain de marqueurs de différenciation semble coïncider avec l'allongement de la phase G1, même si une grande variation est observée dans le seuil nécessaire pour modifier la longueur de la phase G1. Ainsi, pour les deux conditions de culture, à ce stade, nous pourrions faire les hypothèses que : i) en l'absence d'insuline, les préadipocytes, commençant à ressentir l'encombrement des voisins, restent bloqués au « checkpoint » de G1, et ii) en présence d'insuline, la phase G1 est allongée, ce qui serait aussi compatible avec le ralentissement de la croissance observée sur la Figure 3.16, et témoignerait du début de la différenciation adipocytaire. Outre le fait que l'insuline active la voie IGF (insulin-like growth factor), des marqueurs d'adipogénèse ont été bien identifiés. Parmi ceux-ci : pref-1 (preadipocyte factor-1), C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein), et PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ). (Niemelä et al., 2007). Toutefois, plutôt que de conduire des tests biochimiques, certes classiques pour des biologistes expérimentés, mais inhabituels pour nous, nous avons préféré utiliser un signal de lecture (readout) « visuel », à savoir la production GLs, comme pour l'analyse à 3D rapportée à la section 3.3

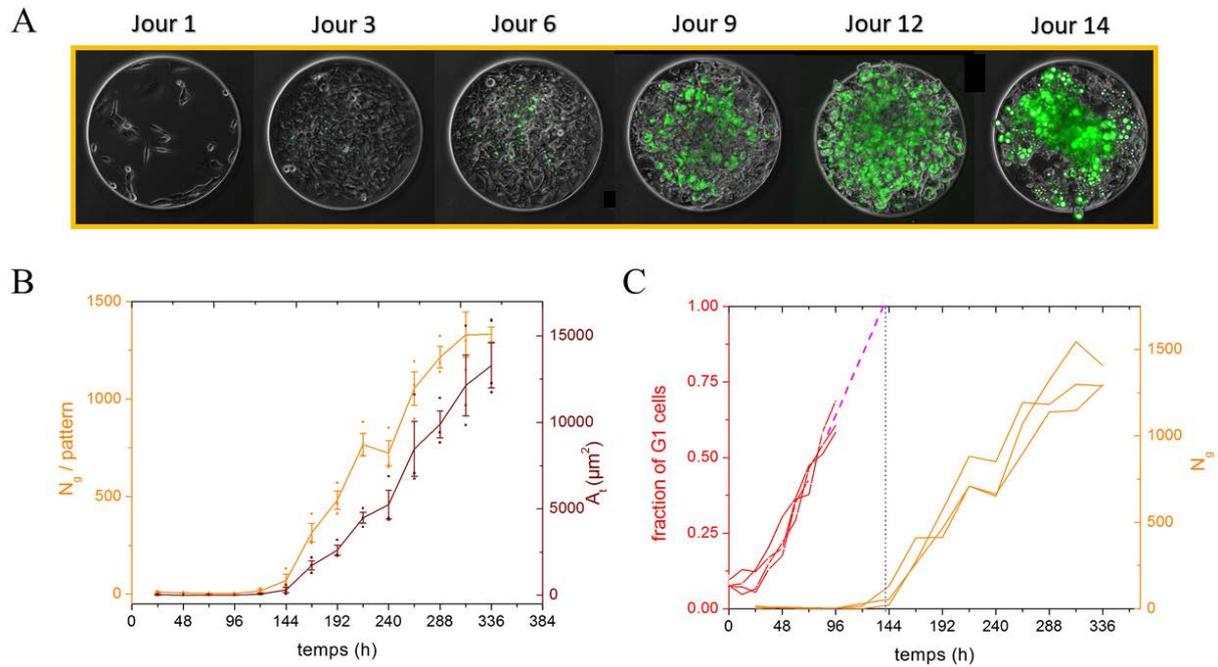
### 3.5 Différenciation adipocytaire par confinement à 2D

Nous avons à nouveau utilisé du Bodipy ex505/em515 (8  $\mu$ M dans les milieux de culture).

#### 3.5.1 En milieu enrichi en insuline

Nous avons commencé par le cas contrôle de préadipocytes cultivés en milieu adipogénique (insuline à 0.01ml/ml, renouvelée avec le milieu pendant la durée de la culture). La Figure 3.20A regroupe des images représentatives d'un pattern au cours du temps, où l'image acquise en fluorescence est superposée à celle en champ clair,. On observe l'apparition de quelques taches vertes dès J3, mais c'est surtout à partir de J6 que les GLs apparaissent nettement et en nombre croissant, jusqu'à recouvrir à J14 une fraction importante du motif. Il est à noter que nous sous estimons la quantité de GLs. En effet, l'accumulation de GLs est telle qu'il devient difficile de distinguer les GLs dans le plan de focalisation initiale sur la monocouche cellulaire (voir Vidéo 15 ).

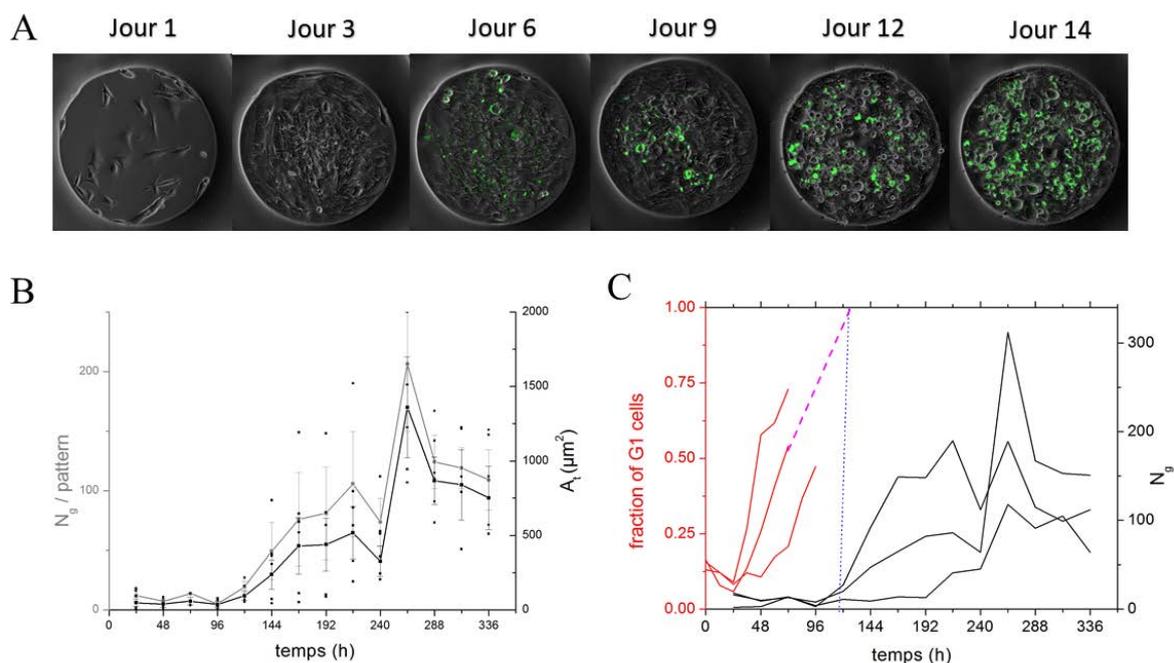
La Figure 3.20B, représente le nombre de GLs,  $N_g$ , et leur aire projetée totale,  $A_t$ , moyennés sur environ 5 patterns fonction du temps. On observe que ces deux quantités commencent à augmenter, de manière corrélée, à partir de J6. Comme indiqué précédemment, avant J6,  $N_g$  est typiquement inférieur à 10, donc non strictement nul. Pour bien mettre en évidence les échelles de temps, nous avons fait figurer sur le graphique plusieurs courbes représentatives de  $N_g(t)$  et de la fraction de cellules en phase G1,  $x_{G1}$ , (Figure 3.20C). Il apparaît nettement que l'augmentation de  $x_{G1}$  (à  $T_p$ ) n'est pas concomitante avec l'apparition des GLs. Un délai d'environ 5 jours est observé. Toutefois, si l'on extrapole l'augmentation de  $x_{G1}$ , il est frappant de constater que l'augmentation de  $N_g$  aurait lieu au moment où  $x_{G1}=1$ , c'est-à-dire quand toutes les cellules sont arrêtées en phase G1, après plusieurs cycles post-confluents, comme rapporté classiquement dans la littérature.



**Figure 3.20 : Évolution temporelle du nombre  $N_g$ , de l'aire totale projetée  $A_t$  des gouttelettes lipidiques par pattern et de la fraction de cellules en G1, en milieu adipogénique.** (A) Image composite «champ clair/fluorescence» d'un pattern au cours du temps (en vert, marquage Bodipy). (B) Evolution du nombre et de l'aire projetée totale des GLs en fonction du temps. (C) Évolution du nombre de GLs par pattern et de la fraction de cellules en phase G1. La ligne pointillée en magenta est un guide pour l'œil qui permet une extrapolation. La ligne pointillée bleue indique le temps au bout duquel toutes les cellules sont en phase G1.

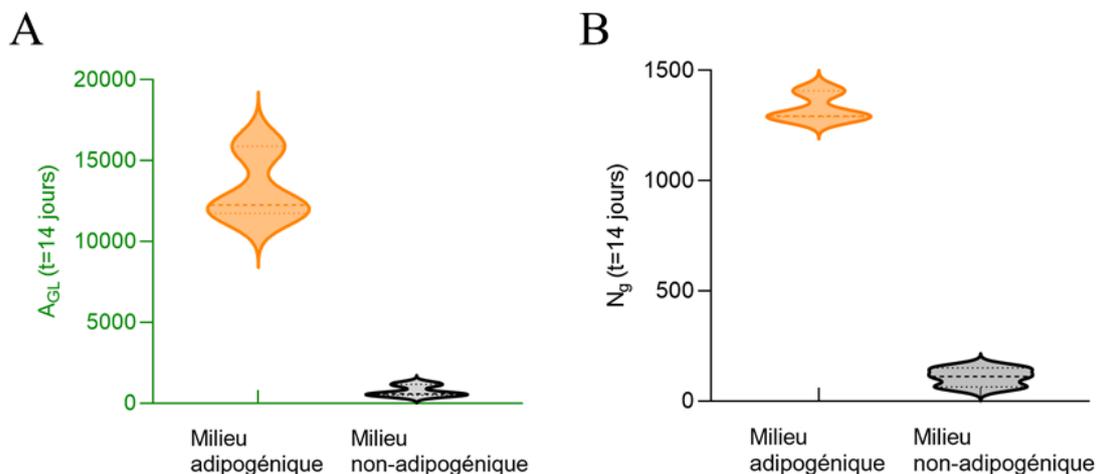
### 3.5.2 En milieu non-adipogénique

En milieu non adipogénique, les images ont été prises sur la même durée que précédemment, soit 14 jours (Figure 3.21A). De manière surprenante, à J5-6, des GLs sont détectables et leur nombre,  $N_g$ , augmente au cours du temps, de même que l'aire projetée totale par pattern,  $A_t$  (Figure 3.21B, voir également Vidéo 16). Les courbes moyennées apparaissent plus bruitées qu'en présence d'insuline. Cela vient notamment du fait que, même si l'effet visuel semble nous indiquer une production nette et importante au cours du temps, les mesures quantitatives indiquent que les valeurs de  $N_g$  et  $A_t$  en milieu non-adipogénique sont d'un ordre de grandeur inférieur aux valeurs obtenues en milieu adipogénique (Figure 3.22).



**Figure 3.21 : Évolution temporelle du nombre  $N_g$ , de l'aire totale projetée  $A_i$ , des gouttelettes lipidiques par pattern et de la fraction de cellules en G1, en milieu non-adipogénique.** (A) Image composite « champ clair/fluorescence » d'un pattern au cours du temps (en vert, marquage Bodipy). (B) Evolution du nombre et de l'aire projetée totale des GLs en fonction du temps. (C) Évolution du nombre de GLs par pattern et de la fraction de cellules en phase G1. La ligne pointillée en magenta est un guide pour l'œil qui permet une extrapolation. La ligne pointillée bleue indique le temps au bout duquel toutes les cellules sont en phase G1.

De même que pour le milieu adipogénique, le début de l'augmentation de GLs semble coïncider avec le moment où toutes les cellules sont en phase G1 ( $x_{G1}=1$ ), soit J=5-6.



**Figure 3.22 : Nombre et aire projetée totale des gouttelettes par pattern aux temps longs (Jour 14).** En orange : milieu adipogénique. En noir : milieu non-adipogénique. (A) Aire projetée totale des gouttelettes moyenne par pattern. (B) Nombre de gouttelettes moyen par pattern.

Ces expériences montrent donc que les préadipocytes 3T3-F442A peuvent se différencier spontanément, sans ajout d'insuline, 2-3 jours après confluence. Même si cette production de GLs est moins massive et rapide que lorsque la différenciation est induite chimiquement, il est indéniable que des contraintes géométriques (i.e. confinement spatial) peut suffire à déclencher

l'adipogénèse.

Avant de revenir aux organoïdes pour essayer d'interpréter les observations et mesures effectuées en 3D à la lumière de ces résultats en 2D, plusieurs remarques peuvent être faites. Premièrement, cette adipogénèse spontanée ne peut pas provenir d'une « contamination » par de l'insuline, car les expériences avec et sans insuline, ont été faites séparément et répétées trois fois.

Deuxièmement, nous les avons réalisées sur deux lots de 3T3-F442A et nous avons fait attention à ce que le nombre de passages soit toujours inférieur à 9. Cela ne peut donc pas être causé par une variabilité d'état initial des cellules.

Troisièmement, dans le contexte de la mécanotransduction, il a été montré que les préadipocytes sont à la fois sensibles à la rigidité du substrat et aux forces externes, ce qui pourrait suffire à expliquer une différenciation spontanée due à la rigidité du substrat du pattern. Cependant, il a été montré que les préadipocytes sont à la fois sensibles à la rigidité du substrat et aux forces externes. Mais, d'une part, ce sont des substrats mous (module d'Young de l'ordre de 2 kPa) qui sont rapportés adipogéniques dans le sens où l'expression de marqueurs de l'adipogénèse est augmentée (Young et al., 2013), alors que les substrats utilisés dans nos expériences sont du verre ou du plastique. D'autre part, on ne peut ignorer l'hypothèse de Geffen selon laquelle il existerait une boucle de rétroaction positive qui accélérerait la différenciation entamée et se ferait de proche en proche à cause de la rigidité apparente locale des GLs (Shoham et al., 2015) (voir section 1.3.2). Toutefois, même si nous n'avons pas conduit d'étude quantitative systématique, il nous est toujours apparu que l'apparition des GLs était répartie relativement uniformément sur toute la surface du pattern, suggérant une invalidation de cette hypothèse à 2D. Enfin, il est rapporté que des étirements cycliques (Yang et al., 2012) et des compressions statiques (Hossain et al., 2010) inhibent l'adipogénèse. Ici, ce confinement spatial, qui ne correspond pas à de la compression proprement dite nous montre l'effet opposé, à savoir une adipogénèse favorisée.

Quatrièmement, en cherchant dans la littérature si de telles différenciations spontanées avaient déjà été rapportées quelques jours après confluence, nous avons trouvé les travaux de Howard Green datant des années 1970 (Green and Kehinde, 1975) mentionnant que les préadipocytes 3T3-L1 (très similaires au F442A) peuvent se différencier en milieu de culture après confluence en l'absence de facteurs de croissance mais avec 20-30% de sérum (SVF). C'est ce que, depuis, d'autres auteurs voulant mettre en avant de nouvelles lignées de préadipocytes, considèrent comme différenciation spontanée (Gregoire et al., 1998). Dans notre cas, nous avons toujours utilisé un milieu contenant 10% de sérum. Ainsi, ces observations sont, à notre connaissance, inédites.

### 3.6 Discussion

Résumons ici les expériences réalisées et les résultats obtenus dans ce chapitre à 2D en monocouche et à 3D en organoïde. Nous avons pu :

#### 1) à 3D:

- observer que les organoïdes non stimulés par des facteurs adipogéniques n'atteignent quasiment jamais la confluence en 25 jours de culture, et donc ne sont pas soumis à des

contraintes mécaniques de compression.

- observer que la croissance des organoïdes stimulés est plus rapide et conduit à un remplissage de la capsule puis à une compression au bout d'environ 7 jours.
- de nombreuses séries d'expériences ont été écartées en raison de ce que nous avons interprété comme une grande sensibilité aux variations de température des organoïdes d'adipocytes.
- suivre la croissance  $R(t)$  du rayon d'organoïdes de pré-adipocytes 3T2-F442A encapsulés en présence ou en l'absence de milieu adipogénique (insuline).
- suivre la production de gouttelettes lipidiques et son évolution temporelle, via l'aire totale de gouttelettes  $A_{GL}(t)$  à l'équateur des organoïdes, ainsi que la distribution de taille des GLs.

## 2) à 2D :

- suivre la prolifération cellulaire  $N(t)$  sur des motifs adhérents de taille fixée.
- suivre la fraction de cellules en phase G1 au cours du temps, donnant une indication sur la variation du cycle cellulaire ou sur la fraction de cellules en arrêt de prolifération
- définir un temps de pré-confluence  $T_p$  à partir duquel la fraction de cellules G1 commence à augmenter
- définir un temps de confluence  $T_c$  correspondant à l'état où toutes les cellules sont arrêtées en phase G1.
- suivre la variation du nombre de cellules  $N_g(t)$  chargées d'une ou plusieurs GLs.

Nous souhaitons maintenant utiliser l'ensemble de ces résultats pour expliquer quantitativement, moyennant des hypothèses que nous tenterons de justifier, les mécanismes en jeu et le déroulé global de ce processus de croissance et différenciation de pré-adipocytes à 3D en présence et en l'absence de facteurs adipogéniques.

La Figure 3.23 représentait l'aire de la section équatoriale des agrégats,  $A_{ag}(t)$ , et l'aire totale des GLs dans la même section,  $A_{GL}(t)$ , pour les deux conditions de culture.  $A_{ag}(t)$  a été obtenue directement par analyse d'image. De là nous avons déduit le rayon moyen de l'agrégat  $R_{ag}(t) = \left(\frac{A_{ag}(t)}{\pi}\right)^{1/2}$ . On obtient donc de même le volume de l'agrégat  $V_{ag}(t) = \frac{4}{3}\pi R_{ag}(t)^3$ . Nous avons aussi l'aire des GLs,  $A_{GL}(t)$ , dans le plan équatorial, extrapolé à partir des images sur la couronne visible sur la base de l'hypothèse de distribution restreinte à 1/3 du rayon de l'agrégat en périphérie en milieu non-adipogénique.

Dans une section équatoriale, la fraction surfacique de GLs est donc :

$$\phi_s(R_{ag}) = \frac{A_{GL}}{A_{ag}} = \frac{A_{GL}(R_{ag})}{\pi R_{ag}^2} \quad (3.5)$$

Pour en déduire une fraction volumique, nous faisons l'hypothèse que toutes les gouttelettes de la section équatoriale ont un rayon moyen  $\tilde{r}_{GL}$ . Nous avons vu (Figure 3.10C) que la distribution en taille de GLs était en effet piquée autour de  $\tilde{r}_{GL} \approx 1 \mu\text{m}$  et que les grosses GLs de queue de distribution n'apparaissent que dans les derniers jours de façon significative.

Dans une tranche d'épaisseur  $\tilde{r}_{GL}$  autour de l'équateur de l'agrégat, la fraction volumique de GLs est donc :

$$\phi_V = \frac{\frac{4}{3}\pi\tilde{r}_{GL}^3 N}{\pi R_{ag}^2 \tilde{r}_{GL}} \quad (3.6)$$

avec N le nombre de GLs

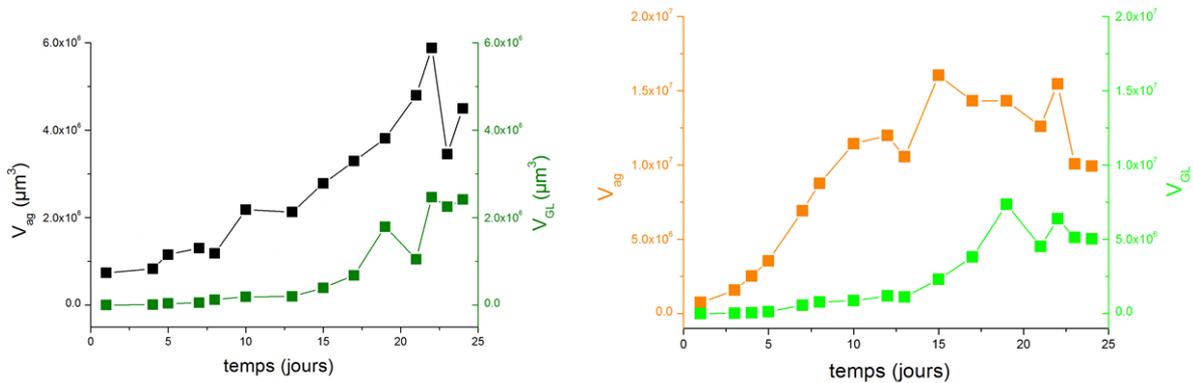
Or  $A_{GL} = N\pi\tilde{r}_{GL}^2$ , donc :

$$\phi_V = \frac{4 A_{GL}(R_{ag})}{3 \pi R_{ag}^2} \quad (3.7)$$

Par suite, le volume total de GLs dans l'organoïde est :

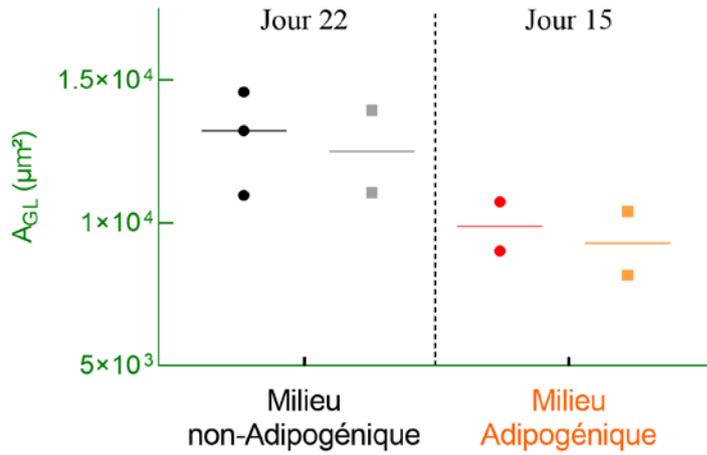
$$V_{GL} = \int_{-R_{ag}}^{+R_{ag}} \phi_V \pi (R_{ag}^2 - z^2) dz = \frac{16}{9} A_{GL} R_{ag} \quad (3.8)$$

La Figure 3.23 représente les variations ainsi calculées de  $V_{ag}(t)$  et  $V_{GL}(t)$ .



**Figure 3.23 : Évolution temporelle calculée (à partir de Fig. 3.12 et 3.10) du volume total  $V_{GL}$  des GLs et du volume de l'agrégat  $V_{ag}$ .** (A) En milieu non-adipogénique. (B) Évolution en milieu adipogénique

A la vue de ces graphes, on confirme que la production de GLs seule ne peut rendre compte de la croissance des organoïdes. Pour vérifier que cela ne provient pas d'une analyse d'image biaisée, nous avons comparé les données de  $A_{GL}$  obtenue par imagerie *in toto* avec celles déduites des coupes histologiques (Figure 3.8). Celles-ci n'ont été effectuées qu'à un seul temps, respectivement au jour J15 en présence de milieu adipogénique et au jour J22 en l'absence d'insuline. La Figure 3.24 ci-dessous montre les valeurs de  $A_{GL}$  obtenues, ce qui suggère que nos extrapolations à partir de l'analyse d'images *in toto* sont justifiées et ne sous-estiment pas significativement la quantité de lipides produite.



**Figure 3.24 : Validation de la méthode d'extrapolation pour l'estimation de l'aire totale  $A_{GL}$  des GLs.** Aire totale de GLs mesurée sur des coupes histologiques d'agrégats (noir/rouge) et l'aire extrapolée à partir de coupes optiques (gris/orange) en milieu non-adipogénique/adipogénique.

Pourtant, nous avons vu que les étapes initiales de croissance des agrégats, i.e. en l'absence de GLs détectées, est beaucoup trop lente pour être expliquée de manière satisfaisante par une croissance volumique avec un taux de doublement similaire à celui mesuré à 2D, ni même par un modèle de croissance surfacique sur une couronne d'épaisseur cellulaire (section 3.2.2).

Ici, notre première hypothèse sera que les régimes de prolifération cellulaire et de différenciation sont découplés et séparés temporellement. Cela est supporté par la littérature sur la différenciation adipogénique (Section 1.3.1) et par nos observations montrant que quelques GLs commencent à être détectées à partir du jour 5 de culture puis augmentent significativement en nombre à partir des jours 7-10 (en fonction des conditions de culture). Nous allons donc considérer dorénavant que les étapes précoces de la croissance des organoïdes de préadipocytes (du jour 0 au jour  $J^*$ , compris a priori entre 5 et 10, mais à déterminer plus précisément) est contrôlée uniquement par la prolifération et que les étapes plus tardives (à partir du jour  $J^*$ ) ne sont dues qu'à l'adipogénèse.

Le modèle simple de croissance de population  $\frac{dN}{dt} = kN$  appliqué à la croissance volumique  $V(t)$  d'un sphéroïde ou organoïde (en l'absence d'apoptose ou nécrose) sous la forme  $\frac{dV}{dt} = kV$  suppose que le volume cellulaire moyen  $v$  peut être considéré comme constant. Ce n'est plus le cas ici. De manière générale, nous devons considérer des variations en  $N$  et en  $v$  :

$$\frac{dV}{dt} = \frac{d(Nv)}{dt} = V \frac{dN}{dt} + N \frac{dv}{dt} \quad (3.9)$$

Par souci de simplification, sur la base de l'hypothèse précédente selon laquelle les régimes de prolifération ( $N$  variable,  $v$  constant) et de différenciation ( $N$  constant,  $v$  variable) sont découplés, nous considérerons :

- 1/  $\frac{dV}{dt} \approx v_0 \frac{dN}{dt}$  pour  $t < J^*$  avec  $v_0$  le volume cellulaire moyen d'un pré-adipocyte non différencié.
- 2/  $\frac{dV}{dt} \approx N^* \frac{dv}{dt}$  Pour  $t > J^*$  avec  $N^*$  le nombre de cellules à  $t = J^*$ .

Détaillons ces deux situations :

### Régime de prolifération

$V(t) = v_0 N(t)$ . On peut toujours s'attendre à une croissance décrite, de manière générique, par :  $\frac{dN}{dt} = kN$ . Mais ici, le paramètre  $k \approx 1/\tau_d$  (avec  $\tau_d$  le temps de doublement) n'est plus constant.

En supposant que les observations à 2D (Figure 3.20) restent valables à 3D, nous avons vu que le nombre de cellules bloquées à l'interface G1/S (et donc ne proliférant plus) augmente linéairement avec le temps (entre  $T_p$  et  $T_c$ ). Cela revient donc à dire que le nombre de cellules prolifératives, contribuant à la croissance de l'organoïde, décroît comme  $1 - \frac{t}{T}$  avec  $T = T_c - T_p$ .

En culture 3D, les cellules sont immédiatement mises en contact dès l'encapsulation (Jour J0). On fait donc l'hypothèse que  $T_c^{2D} = t_0^{3D}$ . Dès l'encapsulation et la formation de l'agrégat cellulaire, une fraction de cellules se bloque en G1.

Donc :

$$\frac{dV}{dt} = v_0 \frac{dN_p}{dt} \quad (3.10)$$

avec  $N_p$  le nombre de cellules prolifératives. On a alors :

$$\frac{dN_p}{dt} = kN_p \text{ et } N_p = N \left(1 - \frac{t}{T}\right) \quad (3.11)$$

Soit,

$$\frac{dV}{dt} = v_0 k \left(1 - \frac{t}{T}\right) N \quad (3.12)$$

Tout se passe donc comme si le taux de croissance effectif diminuait linéairement au cours du temps jusqu'à la confluence et le début de la différenciation. Résoudre (3.9) revient donc à résoudre :

$$\frac{dN}{N} = k \left(1 - \frac{t}{T}\right) dt \quad (3.13)$$

La solution est:

$$N(t) = N_0 e^{kt \left(1 - \frac{t}{2T}\right)} \quad (3.14)$$

Soit,

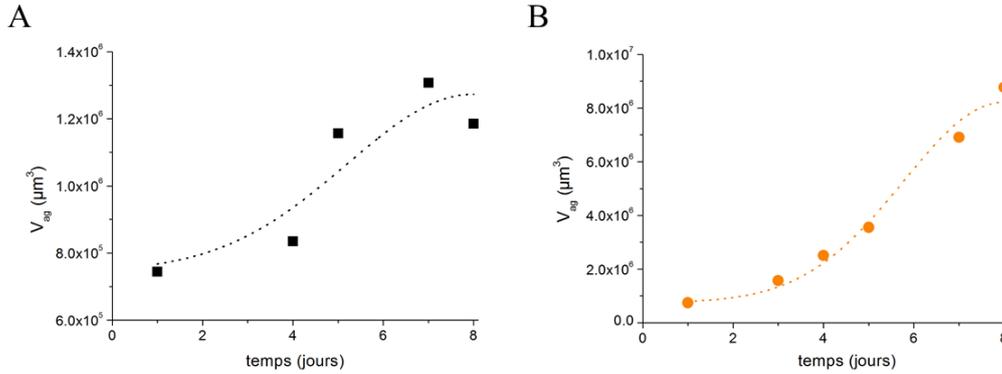
$$V(t) = V_{(t=0)} + \Delta V e^{kt \left(1 - \frac{t}{2T}\right)} \quad (3.15)$$

Étant donné le faible nombre de points expérimentaux dans ce régime de prolifération, un ajustement avec tous les paramètres de (3.15) libres n'est pas raisonnable.

Sur la Figure 3.25, nous avons représenté  $V_{ag}(t)$  pour  $0 < t \leq 8 \text{ jours}$ , en considérant que  $T=J^*=8 \text{ jours}$ .  $V_{(t=0)}$  et  $T=J^*$  ont donc été fixés, les deux autres paramètres,  $\Delta V$  et  $k = \frac{1}{\tau_d}$  ont été

laissés libres. L'ajustement obtenu est satisfaisant et nous obtenons :  $k = \frac{1}{14} h^{-1} (= \frac{1}{0.6} \text{ Jour}^{-1})$

en milieu adipogénique et  $k = \frac{1}{23} h^{-1}$  ( $= \frac{1}{0.96} Jour^{-1}$ ) en milieu adipogénique. Ces valeurs sont 2 à 3 fois supérieures (seulement) à celles obtenues à 2D (contrairement à celles déduites en début de chapitre). On peut donc les considérer comme acceptables.



**Figure 3.25 : Ajustement de la croissance volumique des agrégats en régime de prolifération.** (A) En milieu non-adipogénique et (B) En milieu adipogénique. En pointillé, la courbe d'ajustement

### Régime de différenciation adipocytaire

L'équation (3.9) de croissance volumique se réduit à

$$\frac{dV}{dt} = N^* \frac{dv}{dt} \quad (3.16)$$

Ici  $v$  est le volume cellulaire moyen. Il s'agit donc de la moyenne sur le volume  $v_0$  des cellules non différenciées à  $t$  ( $N_{nd}(t)$ ) et celui  $v_d$  des cellules en cours de différenciation ( $N_d(t)$ ) :

$$v(t) = \frac{v_0 N_{nd}(t) + v_d(t) N_d(t)}{N^*} \quad (3.17)$$

avec  $N^* = N_{nd} + N_d$

Soit,

$$v(t) = v_0 + \frac{(v_d(t) - v_0) N_d(t)}{N^*} \quad (3.18)$$

D'après les courbes 3.18 obtenues à 2D et que l'on suppose valables à 3D,  $N_d$  augmente linéairement avec le temps à partir de  $T_c = J^*$ . Bien qu'il devrait y avoir un effet de saturation correspondant à la différenciation de toutes les cellules de l'organoïde, on suppose que cet effet n'est pas atteint sur la durée de l'expérience.

On écrit donc :

$$N_d(t) = \beta t \quad (3.19)$$

Soit

$$\frac{dN_d}{dt} = \beta \quad (3.2)$$

Avec  $\beta$  le taux de croissance (observé) constant.

L'équation (3.16) peut aussi être réécrite sous la forme :

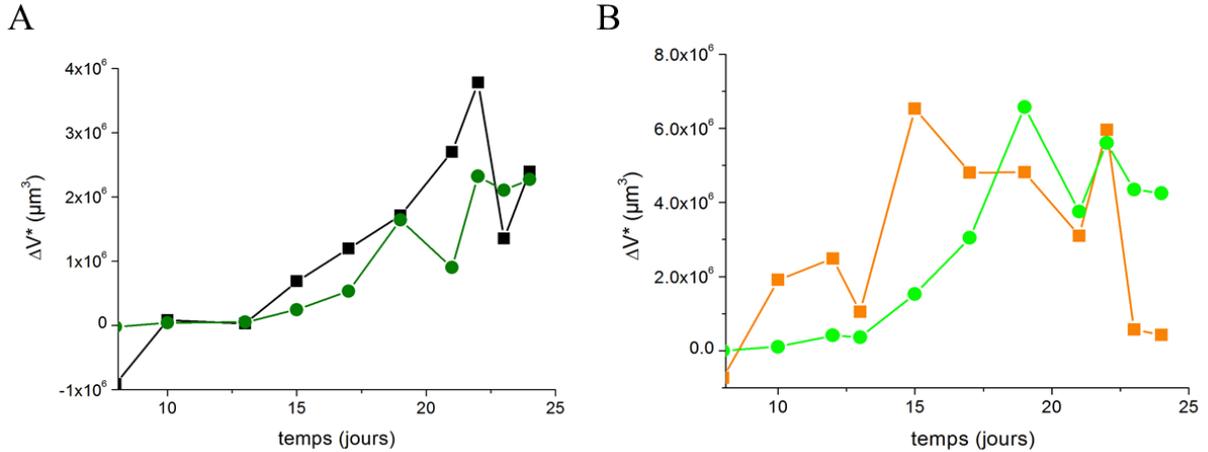
$$\frac{1}{N^*} \frac{dV}{dt} = \frac{N_d(t)}{N^*} \frac{dv_d}{dt} + \frac{(v_d(t) - v_0)}{N^*} \frac{dN_d}{dt} \quad (3.21)$$

Soit

$$\frac{dV}{dt} = \beta t \frac{dv_d}{dt} + \beta (v_d(t) - v_0) \quad (3.22)$$

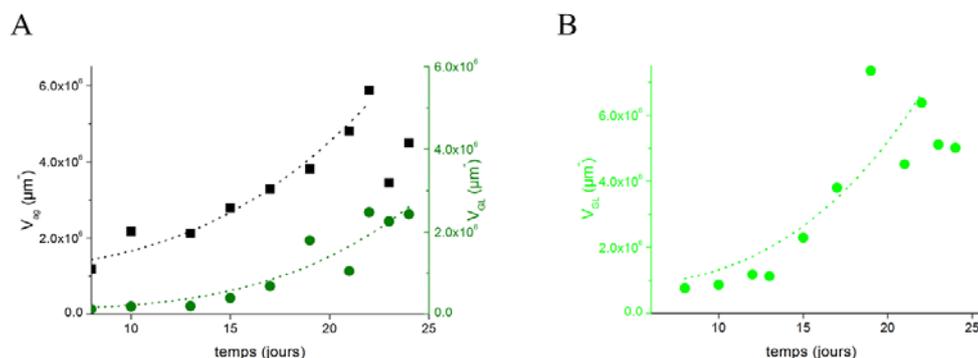
Si la production de lipides s'effectuait essentiellement par croissance de GLs (après une nucléation homogène ou hétérogène), on aurait pu écrire, en s'inspirant de la croissance de gouttelettes d'eau par condensation que la croissance du rayon est proportionnelle à l'aire de la gouttelette (soit  $\propto r^2$ ), c'est-à-dire pour le volume que  $\frac{dv}{dt} \propto v^{4/3}$ . Or, nous avons vu que la nucléation des GLs semble être dominante. Trouver une dynamique de croissance pour  $v_d(t)$  n'est donc pas évident. Plutôt que de le faire de manière non physique (ou non supportée par des observations supplémentaires claires), nous préférons ajuster directement de façon empirique nos données.

Tout d'abord, nous avons représenté  $\Delta V_{GL}^*$  et  $\Delta V_{ag}^*$ , les variations de volume de GLs et de l'agrégat par rapport à leurs valeurs à  $T=J^* \approx 8$  jours. La figure 3.26A, en condition non adipogénique, montre que  $\Delta V_{GL}^*$  et  $\Delta V_{ag}^*$  sont presque superposables au-delà de  $t=J^*$ , ce qui confirme bien que ce régime est principalement contrôlé par la différenciation adipocytaire.



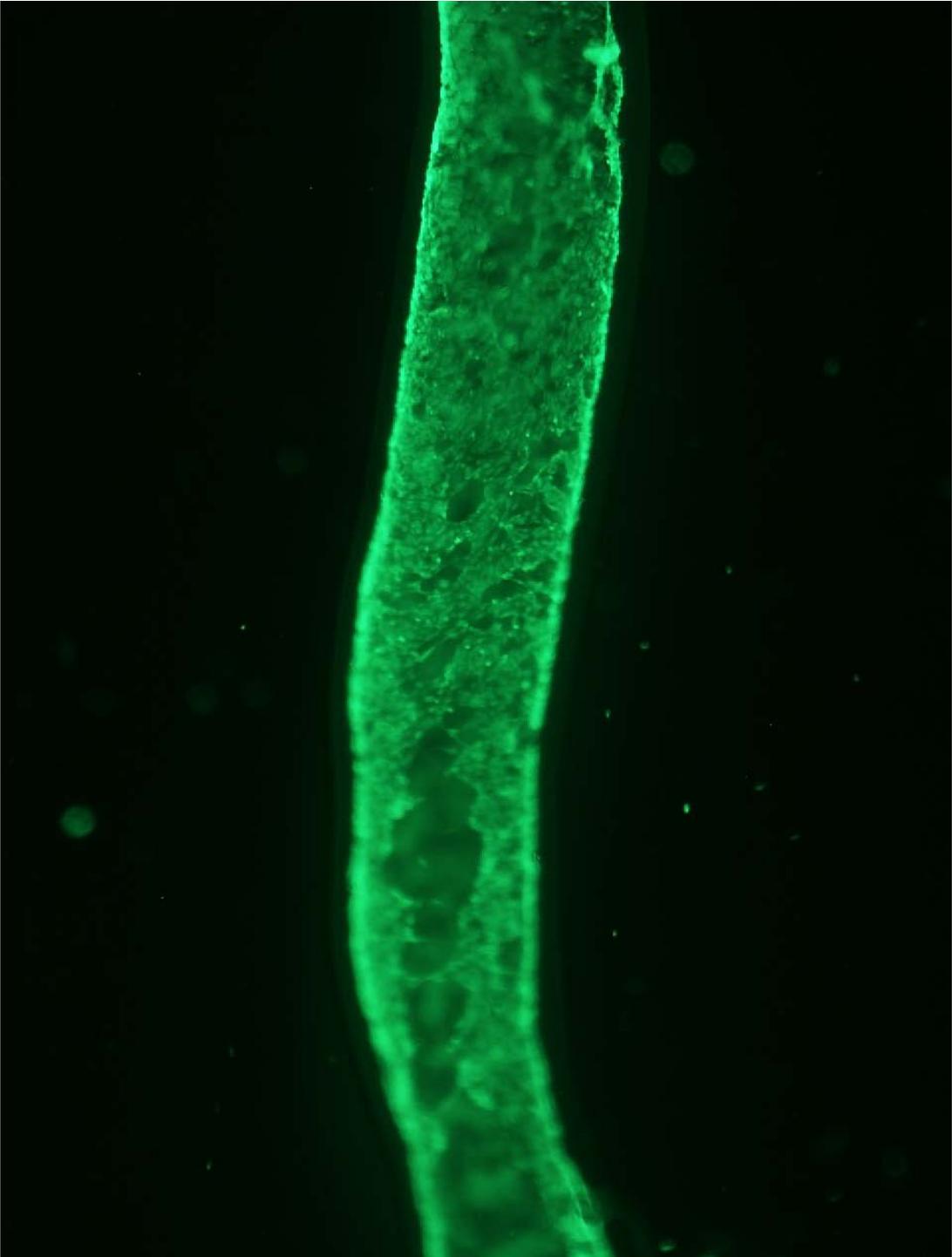
**Figure 3.26 : Variations volumiques des GLs et de l'agrégat à partir du jour 8.** (A) En milieu non adipogénique  $\Delta V_{GL}^*$  (vert olive) et  $\Delta V_{ag}^*$  (noir), (B) En milieu adipogénique,  $\Delta V_{GL}^*$  (vert clair) et  $\Delta V_{ag}^*$  (orange),

Les meilleurs ajustements des données brutes par une loi de puissance (avec exposant variable) sont montrés sur la Figure 3.26A en condition non-adipogénique. On trouve que  $V_{ag} \sim t^{2.9 \pm 0.3}$   $V_{GL} \sim t^{3.6 \pm 0.8}$ , ce qui suggère une variation en  $t^3$ . De l'équation (3.22), cela signifierait que  $v_d(t) \sim t^2$ .



**Figure 3.27 : Ajustement par loi de puissance des variations volumiques des GLs et des agrégats.** (A) En milieu non adipogénique,  $\Delta V_{GL}^*$  (vert olive) et  $\Delta V_{ag}^*$  (noir). (B) En milieu adipogénique,  $\Delta V_{GL}^*$  (vert clair). En pointillé, les courbes d'ajustement par une loi de puissance.

En ce qui concerne la condition adipogénique, le graphe 3.26B montre que les variations de  $\Delta V_{GL}^*$  et  $\Delta V_{ag}^*$  sont moins superposables. Un ajustement de  $V_{GL}$  par une loi de puissance donne encore un exposant  $3.0 \pm 0.9$  (Figure 3.27B). Mais on peut noter un début de plateau à partir du jour 20. Cet effet de saturation pourrait être dû au fait que l'adipogenèse est complète. Mais il faut aussi garder à l'esprit que les organoïdes de préadipocytes stimulés par l'insuline atteignent la confluence vers J10-15 (Section 3.2). Cela pourrait d'ailleurs expliquer l'effet de saturation observé sur  $V_{ag}$  à partir de J15, voire même une décroissance en fin de culture (à partir de J20). La variation de  $V_{ag}$  dans ce régime de différenciation n'a donc pas été ajustée par une loi de puissance. Ici, sous la compression provoquée par la dilatation de la capsule, on peut anticiper que les gouttelettes d'huile sont « plus incompressibles » que les cellules elles-mêmes. L'essentiel de la contrainte mécanique serait donc pris par les cellules, ce qui pourrait même engendrer une apoptose accélérée (d'où la décroissance du volume en fin d'expérience).



# 4

## Variantes autour de la technique d'encapsulation

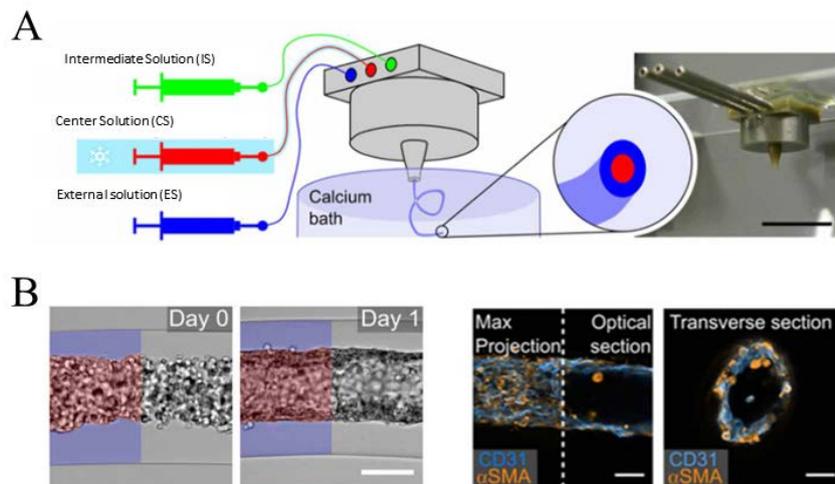
---

4.1	Introduction .....	120
4.2	Doubles coques et coques composites : utilisation de plusieurs polymères répondant à des stimuli de réticulation différents.....	122
4.2.1	Formation de tubes et de capsules à paroi double couche .....	123
4.2.2	Formation de tubes et de capsules à paroi composite .....	124
4.3	Coques « bi-réticulées » : utilisation de polymères doublement réticulables.....	126
4.3.1	Formation de tubes à paroi mixte bi-réticulée .....	126
4.3.2	Formation de capsules à paroi mixte bi-réticulée .....	128
4.4	Formation de capsules multi-compartimentées .....	129
4.5	Récapitulatif .....	131

## 4.1 Introduction

Ce chapitre exploratoire présente des expériences qui ont initialement été réalisées dans le cadre d'un projet annexe de mon travail de thèse au sein de notre groupe. Les premières expériences ont été réalisées avec l'expertise de Naveen Vijayan Mekhileri, post-doc et spécialiste de la bio-impression. Ces travaux exploitent en partie les stratégies de formation d'hydrogels développées en bio-impression. Celles-ci reposent, pour beaucoup, sur la réticulation de gels par photopolymérisation.

Le projet de Naveen consistait à générer des tissus *in vitro* millimétriques, donc nécessitant une vascularisation multiéchelle où un réseau de tubes endothéliaux se connecte à un vaisseau principal permettant la connection avec le mode extérieur, c'est-à-dire en particulier la perfusion. Les vaisseaux de perfusion sont des « vesseloïdes » développés récemment dans le groupe (Andrique et al., 2019) (Figure 1). La technique de formation des vesseloïdes utilise le même dispositif microfluidique de coextrusion que pour les capsules. Une différence essentielle est que le dispositif, au lieu d'être suspendu au-dessus du bain de calcium, y est immergé de manière à supprimer l'instabilité de Rayleigh en diminuant l'énergie interfaciale du jet. Une deuxième différence est la présence d'une matrice extracellulaire ancrée à la paroi interne du tube, comme réalisé précédemment pour les capsules (Alessandri et al., 2016).



**Figure 4.1: Vesseloïdes - Auto-organisation d'une coculture de cellules musculaires lisses et cellules endothéliales en vaisseaux sanguins matures artificiels.** (A) Système d'encapsulation tubulaire existant, barre d'échelle 1cm, extrait de (Andrique et al., 2019). (B) A gauche, tube creux rempli de cellules après encapsulation tubulaire (jour 0) ou après 1 jour de culture (jour 1) Barre d'échelle, 200  $\mu$ m. A droite, imagerie confocale des immunomarquages des vaisseaux. Immunomarquage DAPI (gris, noyaux) CD31 (bleu, marqueur endothélial), et SMA (orange, actine musculaire lisse). Barres d'échelle 50  $\mu$ m.

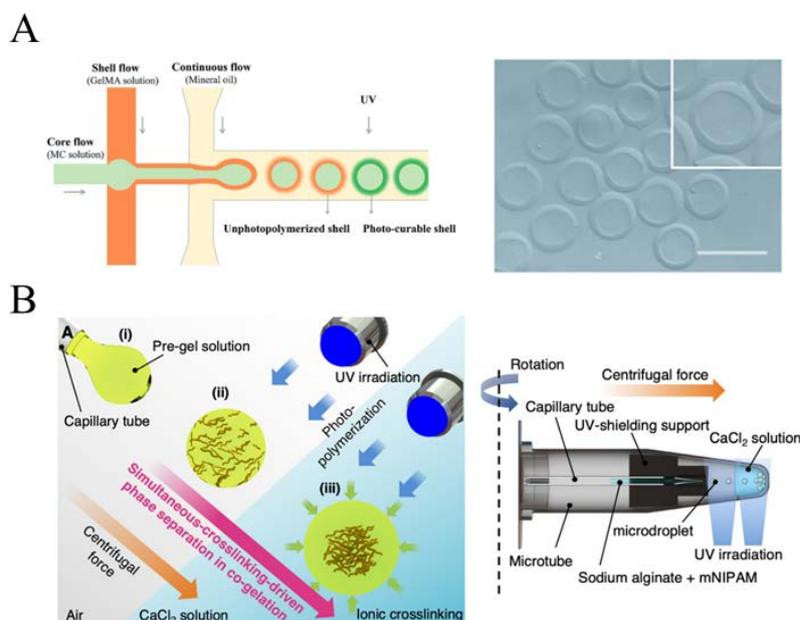
Le rôle de cette ECM, en l'occurrence le Matrigel, permet une adhésion des cellules, puis la formation d'un lumen. Ceci est une manière de transformer l'alginate qui est « cell-repellent » en un hydrogel composite « cell-adherent ». Jusqu'à présent, la formation d'organoïdes notamment s'est fortement appuyée sur le Matrigel (Chaudhuri et al., 2016; Gjorevski et al., 2016), un dérivé d'une lignée de cellules cancéreuses murines, pour fournir une combinaison de facteurs biochimiques et de contraintes biophysiques capables de déterminer le destin des cellules et l'organisation des tissus. Cependant, le Matrigel n'est pas bien défini chimiquement, ce qui entraîne une variabilité (Soofi et al., 2009; Vukicevic et al., 1992) et entrave le transfert

vers la clinique.

En bio-impression, le GelMA, composé basé sur la gélatine fonctionnalisée par des groupes photo-sensibles (Chapitre 1, Section 1.5.3) est beaucoup utilisé comme scaffold en bioimpression (Lin et al., 2013) et la gélatine peut servir d'ECM dans de nombreux cas, comme substitut partiellement hydrolysé du collagène.

C'est dans ce contexte que nous avons cherché à utiliser les propriétés du GelMA pour le substituer au Matrigel.

Nous nous appuyons également sur quelques rapports de la littérature. En effet, des systèmes microfluidiques d'encapsulation en PDMS ont permis de former des capsules de GelMA (Lee and Cha, 2018; Wang et al., 2019) (Figure 4.2A). Ce sont des systèmes de type immersif : la formation des capsules a lieu entièrement dans la puce micro fluidique. La formation de capsules creuses de GelMA nécessite ici l'ajout d'une solution visqueuse dans la partie « Core flow » (Figure 4.2A). qui ralentit sa diffusion vers le cœur de la capsule avant qu'il ne gélifie. Dans notre cas, le système de coextrusion de base utilise de l'alginate pour former des capsules creuses. L'idée est d'y ajouter la GelMA afin de rendre la capsule adhérente. A notre connaissance, le système qui se rapproche le plus de ce que nous souhaitons faire est décrit dans (Kurashina et al., 2021). Il est présenté dans la figure 2C-D. Brièvement, l'encapsulation se fait par centrifugation, et le mélange de polymères utilisés pour former la bille composite est alginate/NiPAM.



**Figure 4.2 : Systèmes d'encapsulation par irradiation UV.** (A) Schéma du système microfluidique pour la génération de capsule de GelMA à cœur liquide. A droite, image en fond clair de capsules creuses de GelMA. Barre d'échelle 400  $\mu\text{m}$ . Extrait de (Wang et al., 2019). (B) Principe de la synthèse par double réticulation (ionique et lumière) d'une bille composite. A droite, dessin du dispositif de formation de microgouttes avec double réticulation. Extrait de (Kurashina et al., 2021) .

Dans tout ce chapitre, la stratégie est donc d'explorer les possibilités de formation de capsules et de tubes par double réticulation, à savoir sous irradiation UV et dans un bain de calcium, pour enrichir les propriétés des capsules. Cela demande d'utiliser au moins deux polymères dont le mode de réticulation est différent, ou comme nous le verrons, de rassembler au sein d'un même polymère les deux effets.

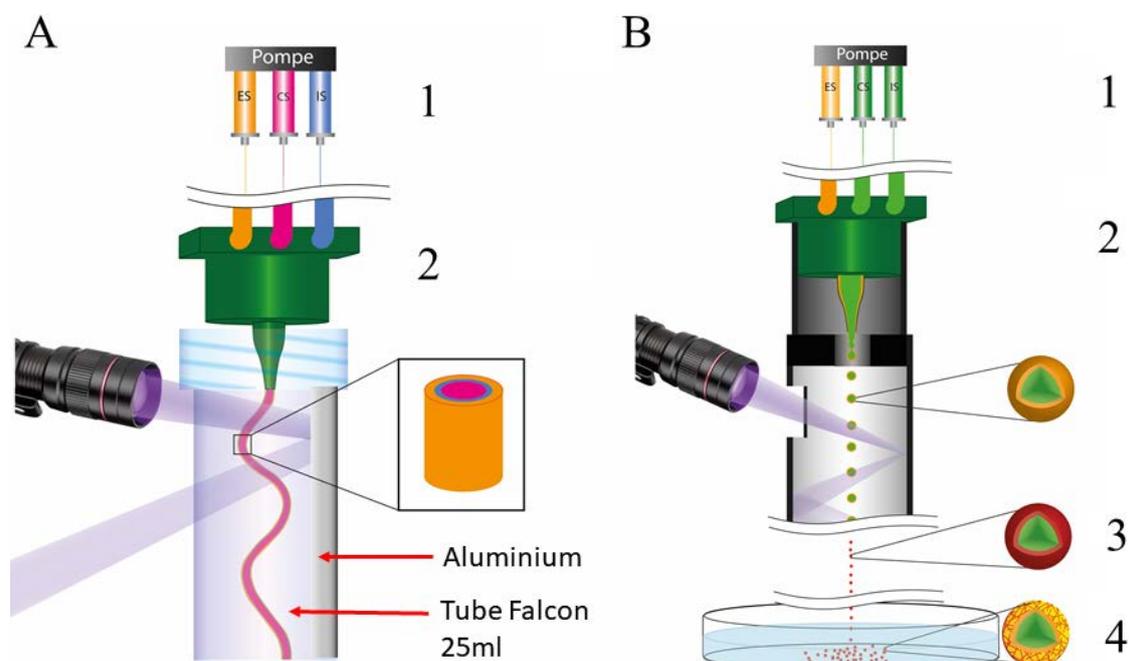
## 4.2 Doubles coques et coques composites : utilisation de plusieurs polymères répondant à des stimuli de réticulation différents

- Pour la formation de tubes, qui n'exige pas que l'état de surface de la pointe du co-extrudeur soit aussi bon que pour les capsules sphériques, nous utilisons une puce tout-plastique développée précédemment dans le groupe (Alessandri et al., 2016) et utilisée pour la préparation de vesseoïdes (Andrique et al., 2019).

Plus précisément, nous avons fabriqué une puce de diamètre de sortie d'environ 400 $\mu$ m. Celle-ci est immergée dans un bain de calcium dans un falcon 25ml ou 50ml. Alors que le Matrigel nécessitait un système de refroidissement pour le maintenir à l'état liquide au cours de l'extrusion, ici, dans l'optique de remplacer le Matrigel par du GelMA (que nous avons synthétisé, voir annexe 4), nous avons retiré le système refroidissement de la solution centrale (rappel :le GelMa réticule à  $T < 35^{\circ}\text{C}$ ). Nous avons également ajouté une lampe à LED de longueur d'onde 405 nm (UWAVE, UTARGET 405 nm) focalisée sur la sortie de la puce. La puissance au point de focalisation a été fixée à environ 800 mW/cm<sup>2</sup> dans l'air. Pour obtenir une réticulation plus homogène, une feuille d'aluminium, jouant un rôle de miroir a été placée à l'opposé de la lampe (Figure 4.3A).

- Pour les capsules, le principe est aussi de générer une double réticulation. L'adaptation du système existant a demandé quelques ajustements.

La difficulté principale ici est que l'on souhaite réticuler le GelMA contenu dans les gouttes uniquement lorsque celles-ci sont formés, c'est-à-dire à la fois pas à l'intérieur de la puce, ni avant que l'instabilité de Rayleigh ne se produise. Pour cela, nous avons imprimé une chambre en plastique en forme de tube, qui est emboîtée au corps de la puce. La première partie de cette pièce permet de limiter l'exposition de la pointe en verre aux UV. Elle englobe la partie supérieure de la puce, ne laissant qu'un petit orifice de quelques millimètres pour que le jet formé en sortie de pointe puisse sortir. La deuxième partie de la chambre, qui contient une fenêtre de 0.5 mm<sup>2</sup>, sert à amplifier l'exposition des capsules aux UV en permettant une réflexion sur le papier d'aluminium recouvrant la partie interne de la chambre (voir Vidéo 17 ). Il est utile, à ce niveau, de faire une remarque sur le temps d'exposition et l'énergie reçue par le fluide. En effet, avec une vitesse de chute d'environ 1.5 m/s (pour un débit de 8 mL/h et un diamètre de tube de 400  $\mu$ m) et une exposition de 1900 mW/cm<sup>2</sup> sur une longueur de 5 mm, les capsules sont exposées pendant 3 ms. Or dans la littérature, les conditions d'exposition classiquement utilisées en bioimpression avec du GelMA sont de l'ordre de 20 secondes pour 58 mW/cm<sup>2</sup> (Wang et al., 2019) soit, en terme d'énergie, une exposition totale 70 fois supérieure. L'ajout de ce papier aluminium permet donc d'augmenter le temps d'exposition, ce qui ne garantit pas pour autant que cela soit suffisant pour que la photo-réticulation soit complète. En espérant que les capsules soient pré-réticulées aux UV, on s'attend à ce qu'elle termine sa réticulation ionique dans le bain de calcium.



**Figure 4.3 : Dessin du principe de fonctionnement des méthodes d'encapsulations par photo-réticulation.** (A) Dessin du dispositif d'encapsulation tubulaire par photo-réticulation, 1/ Pousse seringue avec ses 3 solutions ES, CS et IS, 2/ puce immergée dans une solution de calcium avec le faisceau UV traversant la paroi du tube Falcon. (B) Dessin du dispositif d'encapsulation par photo-réticulation. 1/ Pousse seringue, 2/ puce avec chambre en plastique, début de la photoréticulation des capsules formées, 3/ Capsules photoréticulées. 4/ Réticulation finale de la capsule dans le bain de calcium.

Afin de mettre en évidence la présence du GelMA il nous arrivera d'utiliser du EZBlue (Sigma-Aldrich, G1014), qui a la particularité de se fixer aux groupes amines du GelMA et de lui donner une coloration bleue.

Dans toutes les expériences que nous allons décrire, nous conserverons le LAP (lithium phenyl-2,4,6-triméthylbenzoylphosphinate) comme photoinitiateur à une fraction à 0.5% m/v. Les autres paramètres (nature des solutions, concentrations, etc...) seront variés. Les concentrations seront toujours exprimées en m/v.

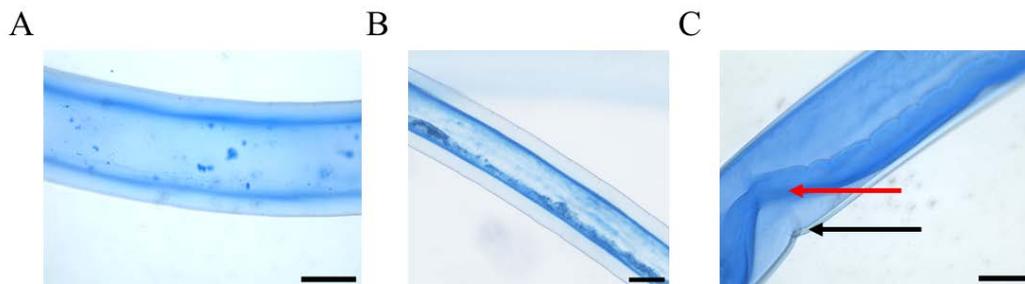
#### 4.2.1 Formation de tubes et de capsules à paroi double couche

Le GelMA seul n'est pas suffisamment visqueux et ne conduit pas à des gels suffisamment rigides pour former correctement des tubes ou des capsules qui ne se détruisent pas à l'impact. Nous l'avons combiné avec de l'alginate. La première expérience consiste à former des tubes et des capsules avec une coque double couche : une couche extérieure d'alginate qui a un rôle « protecteur » et une couche interne de GelMA, qui assurera l'adhésion des cellules. Nous avons donc remplacé la solution intermédiaire (IS) qui servait de barrière contre la diffusion du calcium par du GelMA 5%. La solution externe (ES) reste inchangée : 2% d'alginate. Enfin, ces expériences de mise au point sont effectuées en l'absence de cellules dans la solution centrale (CS) qui ne contient que du sorbitol 300 mM (Tableau 2, expérience 1).

Comme nous pouvons le voir légèrement sur la Figure 4.4A, le GelMA forme un bloc diffus remplissant le tube. Dans les expériences suivantes, nous avons introduit du Pluronic F127 (Chapitre 1, Section 1.5.1) dans la solution centrale. Nous espérons qu'il pourra jouer un rôle de « barrière visqueuse » afin de limiter la diffusion du GelMA au centre du tube. Puisque le

Pluronic est liquide à basse température ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ) et que du GelMA l'est à température supérieure à  $\sim 35^{\circ}\text{C}$ , le contrôle thermique de la réticulation commune est compliqué, ce qui semble générer des irrégularités sur la couche interne du GelMA (Figure 4.4B). Nous avons également remarqué que la couche de GelMA se détache de la couche d'alginate (Figure 4.4C). Cela suggère que l'ancrage du GelMA sur l'alginate est faible.

Dans cette configuration, la formation de capsules, plus exigeante au niveau du processus d'encapsulation, n'a pas fonctionné. Aucune capsule, même déformée, n'a été obtenue au cours de nos multiples essais. Pour des raisons que nous n'avons pas identifiées, la présence de GelMA en IS semble interférer avec la réticulation de l'alginate.

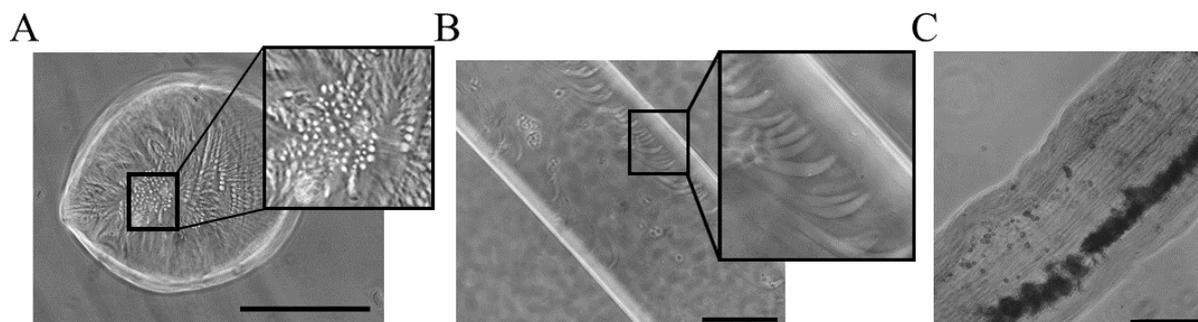


**Figure 4.4 : Tube à coque double couche.** (A) Tube d'alginate avec cœur de GelMA. (B) Tube à coque double couche formée avec du Pluronic en CS, de l'Alginate en ES et du GelMA en IS. (C) Tube de même type que (B) avec la flèche rouge la couche de GelMA se décollant et en noire la couche d'Alginate. Barres d'échelle 200  $\mu\text{m}$ .

### 4.2.2 Formation de tubes et de capsules à paroi composite

Puisqu'un des objectifs est de former des tubes et des capsules sphériques adhérentes pour les cellules et que nous venons de voir que la stratégie « double couche » a échoué en raison d'un mauvais ancrage entre les deux hydrogels, nous avons décidé de mélanger les deux solutions d'alginate (1.5 %) et de GelMA (5%) dans l'ES pour former une coque composite (Tableau 2, expérience 2). Les polymères sont mélangés à l'aide d'un agitateur en maintenant la solution à  $37^{\circ}\text{C}$  pour garder le GelMA liquide.

Les premiers tubes et capsules obtenus avec ces conditions comportent des trous dans la coque (Figure 4.5A et B). Cela suggère que la GelMA n'a pu former que de petits îlots réticulés. Bien qu'aucune étude quantitative systématique n'ait été menée, mon impression, au moment où je réalisais les expériences est que ces îlots, réticulé par UV en plein vol, sont expulsés de la coque lors de la réticulation ionique de l'alginate. Afin de réticuler plus rapidement le GelMA, nous avons presque doublé la puissance de la lampe à LED (de  $\sim 800\text{mW}/\text{cm}^2$  à  $\sim 1400\text{mW}/\text{cm}^2$ ) dans le cas des tubes. Nous n'observons alors plus ces trous. En revanche, nous obtenons un tube avec une paroi déformée (Figure 4.5C). La double réticulation semble aussi générer des stries dans la coque du tube. Dans le cas des capsules, l'augmentation de la puissance de la lampe n'a rien changé.

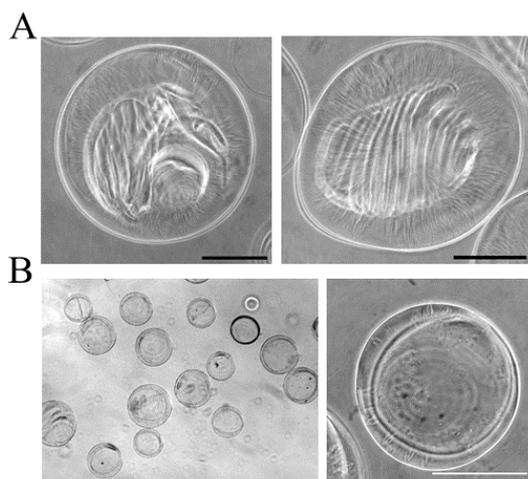


**Figure 4.5 : Encapsulation à double réticulation avec coque composite Alginate/GelMA.** Image en contraste en phase. (A) Image d'une capsule à coque composite doublement réticulée. (B) Tube à coque composite doublement réticulée. Exposition UV à 800 mW/cm<sup>2</sup>. (C) Même type de tube que (B) avec une exposition UV à 1400 mW/cm<sup>2</sup>. Barres d'échelles 200 µm

Pour les capsules, outre le fait que le temps d'exposition est plus faible que pour les tubes, la gestion de l'impact dans le bain de calcium est critique. Malgré la présence de surfactant (Tween80), ces capsules composites résistent mal à l'impact. En effet, nous n'avons pas réussi à former des capsules, telles que celle montrée à la Figure 4.5A de manière systématique. La présence du GelMA dans la coque semble interférer avec la réticulation ionique de l'alginate. Afin de remédier à ce problème, nous avons ajouté un troisième hydrogel dans la coque. Nous avons sélectionné le PEGDA (Chapitre 1, Section 1.5.2) qui forme un réseau plus dense donc plus rigide que l'alginate ou le GelMA. Dans cette nouvelle série d'expériences, les compositions des différentes phases sont donc : ES, alginate 1.5%, PEGDA 10%, GelMA 5%. Le but est donc de pré-réticuler le GelMA et le PEGDA en vol, avant l'impact des capsules dans le bain et réticulation de l'alginate par le calcium (Tableau 2, expérience 3).

Le résultat est surprenant (Figure 4.6B). Nous remarquons tout d'abord des trous comme précédemment. Mais de manière plus frappante encore, il apparaît une structure non homogène à l'intérieur de la capsule. Cette structure correspond au PEGDA réticulé, facilement reconnaissable par son côté réfringent. Il semblerait donc que pendant l'encapsulation, le PEGDA soit aussi expulsé de la coque.

Comme à la section précédente, nous avons ensuite ajouté du Pluronic F127 à 15% en CS à la place du sorbitol pour générer une « barrière visqueuse » et tenter de conserver le PEGDA à la paroi malgré la séparation de phase (Tableau 2, expérience 4). Nous obtenons alors des capsules sphériques. Cependant, la coque est formée de deux couches distinctes, dont l'une (interne) est le PEGDA. Outre le fait que le PEGDA subisse une séparation de phase à la réticulation avec nos deux polymères favoris (GelMA et Alginate), le PEGDA a aussi une taille de maille réduite, qui ne permettrait pas la diffusion de tous les nutriments. Aussi, avons-nous abandonné l'utilisation de PEGDA.



**Figure 4.6 : Capsules à coque composite Alginate/PEGDA/GelMA.** (A) Images en contraste de phase de capsules avec coque composite formées avec du Sorbitol en CS. Barres d'échelles 100  $\mu\text{m}$ . (B) Image en contraste de phase de capsules avec coque composite formées avec du Pluronic F127 en CS. Barre d'échelle 200  $\mu\text{m}$ .

### 4.3 Coques « bi-réticulées » : utilisation de polymères doublement réticulables

Afin d'augmenter l'ancrage du GelMA à l'alginate, nous avons opté pour une fonctionnalisation de l'alginate par des groupes méthacrylates de manière à permettre la formation de liaisons covalentes entre les deux polymères.

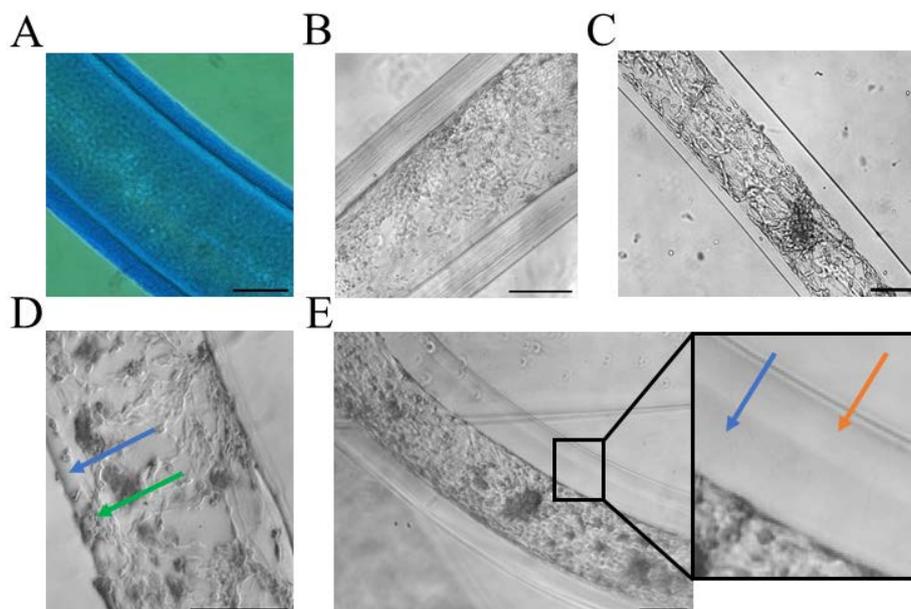
L'AlgMA n'étant alors pas encore commercialisé, il nous a fallu le synthétiser. Le protocole est décrit en annexe 4. Le GelMA subit donc une transition Sol-Gel sous l'effet de la température et forme un gel chimique sous irradiation UV. L'AlgMA gélifie à la fois par réticulation ionique (calcium) et sous UV.

#### 4.3.1 Formation de tubes à paroi mixte bi-réticulée

Pour la formation de tubes, nous utilisons de l'AlgMA à 1.5% et de la GelMA à 5% en ES (Tableau 2, expérience 6). Le marquage EZBlue permet de mettre en évidence la répartition homogène du GelMA dans la coque composite (Figure 4.7A). Nous avons ensuite ajouté des cellules (HUVECs, C-12205, PromoCell) (Figure 4.7B). Les cellules adhèrent bien à la surface interne de la coque composite.

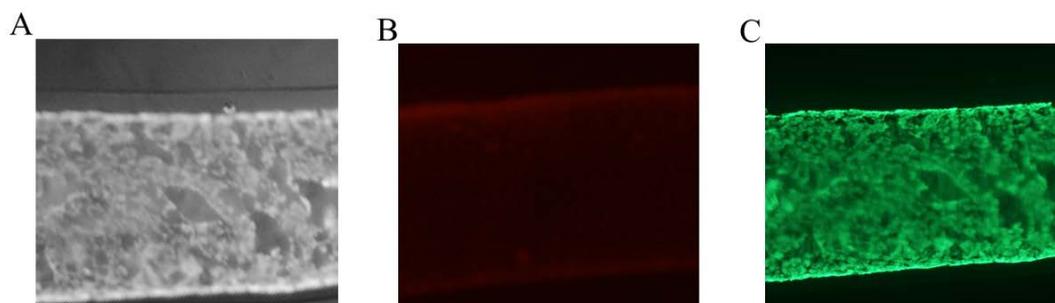
Étant donné que les hydrogels composant la coque sont tous les deux réticulables aux UV, nous avons réitéré l'expérience en remplaçant le bain de calcium à 100 mM par du milieu DMEM 1g/L de glucose. Le DMEM contient environ 1 mM de calcium, ce qui limite beaucoup la formation d'un gel par réticulation ionique n'est alors plus possible. Même si la réticulation de la paroi du tube est donc alors principalement obtenue par irradiation UV, le résultat obtenu s'avère également satisfaisant. Les HUVECs adhèrent correctement sur la coque du tube.

Cependant, l'inconvénient de cette approche où GelMa et AlgMA sont mélangés est que la paroi interne, mais aussi la paroi externe, deviennent adhérentes pour les cellules. La présence de quelques cellules en dehors des tubes à l'encapsulation conduit au bout de quelques jours de culture à un recouvrement de la paroi externe du tube (Figure 4.7D).



**Figure 4.7 : Tubes à coque composite AlgMA/GelMA adhérent.** (A) Tube à coque composite doublement réticulé. En bleu marquage au EZBlue. (B) Même tube qu'en (A) avec des HUVECS adhérant sur la paroi interne du tube. (C) Tube à coque composite formé uniquement par photoréticulation, contenant des HUVECS adhérant sur la paroi interne du tube. (D) Même type de tube que (C) après 4 jours de culture. La flèche bleue montre la coque composite et la flèche verte pointe des cellules adhérant à l'extérieur de la coque. (E) Tube à coque double couche uniquement photoréticulé, avec des HUVECS 5 jours après l'encapsulation. La flèche orange correspond à la couche extérieure du tube composée d'AlgMA. La flèche bleue correspond à la couche interne de la coque composée d'AlgMA/GelMA. Barres d'échelle : 200 µm.

Pour lever cette difficulté pratique, nous avons produit des tubes à double coque : la coque extérieure se compose uniquement d'AlgMA à 2% et la paroi intérieure est composée d'AlgMA à 1.5% + GelMA à 5% (Figure 4.7E). Comme l'alginate natif, l'AlgMA est « cell-repellent ». Donc les cellules n'adhèrent qu'à l'intérieur du tube. Cette double coque est stable dans le temps, aucun décollement n'a été observé après 8 jours de culture. Nous avons de plus réalisé un marquage Live/Dead (Calceine AM, propidium iodide), jours après la formation du tube. Comme nous pouvons le voir dans la Figure 4.8, il n'y a pas/peu de mort cellulaire. Nous pouvons également constater que les cellules adhèrent sur pratiquement toute la surface interne du tube d'un diamètre ~500 µm. Cette approche pourrait donc permettre de reformer des vesseloides sans utiliser de Matrigel.

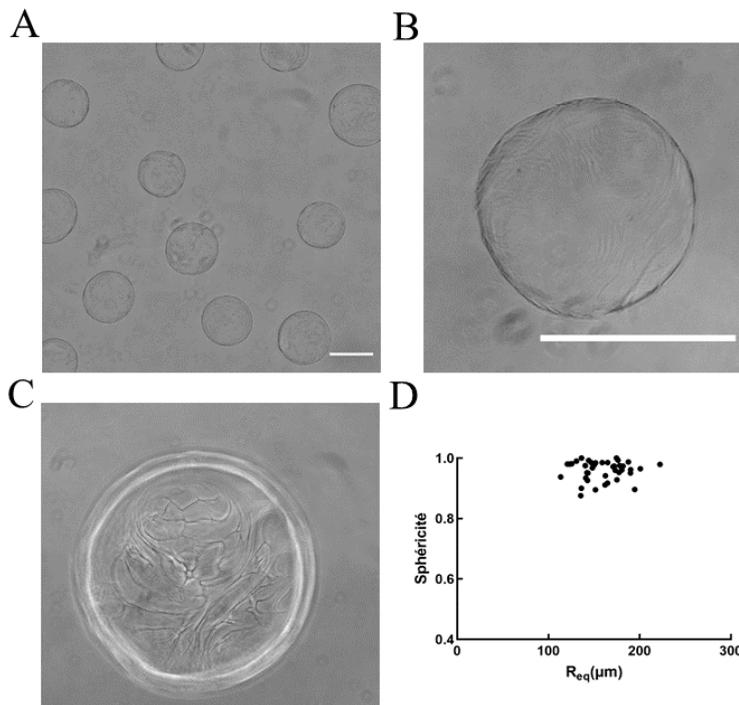


**Figure 4.8 : Contrôle live/dead sur HUVECs dans un tube composite AlgMA/GelMA.** (A) image en lumière blanche et fluorescence du tube d'HUVEC. (B) Image en fluorescence du marquage propidium iodide sur le tube d'HUVECs. (C) Image en fluorescence du marquage Calceine AM sur le tube d'HUVECs

### 4.3.2 Formation de capsules à paroi mixte bi-réticulée

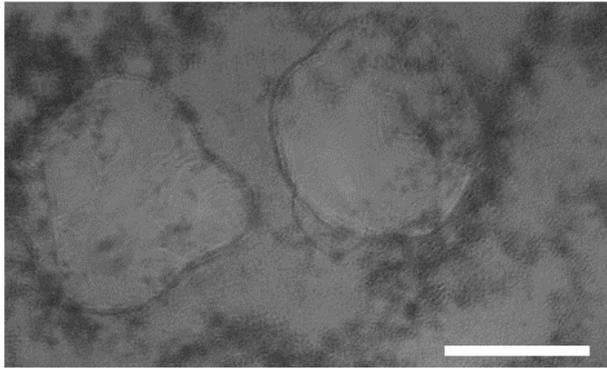
Nous avons tenté de transférer cette même approche pour la formation de capsules.

Tout d'abord, nous avons réalisé des capsules avec une coque qui ne contenait que de l'AlgMA 2% (Tableau 2, expérience 5). Les capsules obtenues sont remarquablement sphériques (Figure 4.9A-B). Une quantification par analyse d'image (Figure 4.9D) montre même une meilleure sphéricité (entre 0.85 et 1) que pour les capsules obtenues avec de l'alginate natif en présence d'un champ électrique (voir Section 2.4.4, Figure 2.16). La pré-rigidification de la capsule en vol semble donc éviter une déformation liée à l'impact du bain de calcium. Toutefois, on notera que la surface extérieure des capsules présente des « pliures » (Figure 4.9C), qui pourraient être liées à des réorganisations dues à la double réticulation de l'AlgMA.



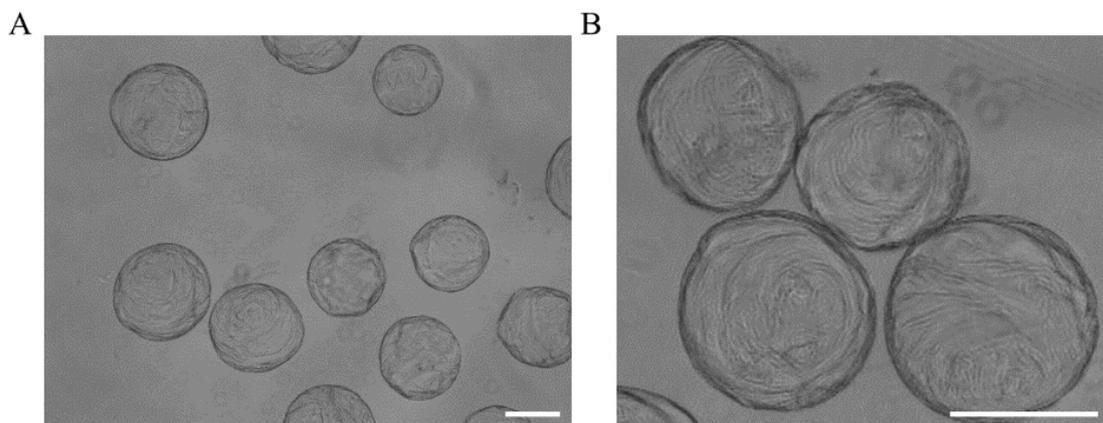
**Figure 4.9 : Capsules d'AlgMA à double réticulation.** (A et B) Image en contraste de phase de capsules d'AlgMA, Barre d'échelle 200 μm. (C) Image en contraste de phase de la surface d'une capsule d'AlgMA après double réticulation. (D) Sphéricité des capsules d'AlgMA (N=45). Barres d'échelle 200 μm.

Tout comme pour les tubes, nous avons essayé de former des capsules directement dans un bain de milieu DMEM, 1mM calcium. Les capsules sont alors réticulées principalement par irradiation UV. Cependant, cela ne suffit pas à former des capsules. Il semblerait qu'elles se désagrègent durant l'impact du bain de milieu. Afin de vérifier si le temps d'exposition aux UV était malgré tout suffisant pour former une structure partiellement réticulée, nous avons incubé ces capsules dans du PBS pendant 1 heure sous agitation, de manière à casser les liaisons ioniques du gel. Sur la Figure 4.10, on voit qu'il reste bien un fantôme de structure réticulée.



**Figure 4.10 : Dégradation par agent chélatant d'une capsule doublement réticulée.** Barre d'échelle 200  $\mu\text{m}$

Pour en revenir à l'objectif initial, nous avons renouvelé cette expérience en ajoutant le GelMA à l'AlgMA. Les capsules sont bien fermées, creuses et sphériques (Figure 4.11). En revanche, on observe des plis et des aspérités à la surface des capsules, vraisemblablement dues au mélange des deux polymères. Nous avons ensuite encapsulé, à l'occasion d'une expérience rapide, des 3T3 F442A dans ces mêmes conditions. Nous avons pu remarquer que, quelques heures plus tard, les cellules commençaient à adhérer sur la surface interne de la capsule. Cette approche, qui n'a pas pu être approfondie pour des raisons de temps, nous semble cependant prometteuse.



**Figure 4.11 : Capsule à coque composite algMA/GelMA doublement réticulée.** Barre d'échelle 200  $\mu\text{m}$ .

En bref, tous ces expériences dans lesquelles nous avons tâtonné et exploré plusieurs pistes nous ont montré que l'utilisation de mélanges de polymères conduit le plus souvent à des séparations de phase au moment de la réticulation. Cela nous a conduits, dans une dernière partie, à tenter de tirer profit de ces propriétés de « non-mélange » pour produire des capsules multicompartimentées.

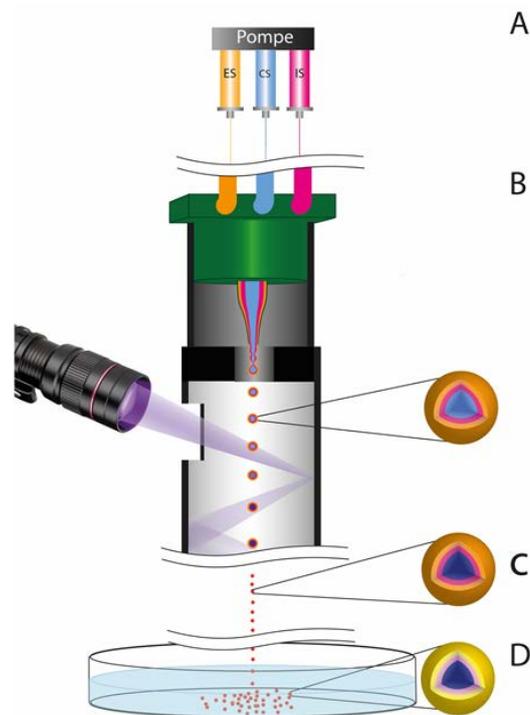
#### 4.4 Formation de capsules multi-compartimentées

- La formation de structure multi-compartimentées a fait l'objet de nombreuses études tels que la reproduction de l'architecture compartimentée des cellules eucaryotes (Lu et al., 2017; Shetty et al., 2021), ou encore la co-culture compartimentée (Wu et al., 2017).

- L'objectif est ici de générer non pas des billes mais des capsules multi-compartimentées. Pour cela nous avons générer une bille de GelMA encapsulée dans une sphère creuse d'Alginate avec

un espace annulaire liquide. Plusieurs raisons ont motivé ces développements. Tout d'abord, nous savons que la formation d'agrégats de plus de typiquement 300  $\mu\text{m}$  de rayon génère un cœur nécrotique à cause d'une limitation en nutriments. La structure annulaire proposée permettrait de générer des agrégats plus étendus sans nécrose. Si nous prenons l'exemple d'une capsule de 450  $\mu\text{m}$  de rayon contenant une bille de GelMA de 150  $\mu\text{m}$  en son centre en comparaison d'une capsule de rayon 300  $\mu\text{m}$  en comparaison, le volume libre accessible aux cellules prolifératives serait 3 fois supérieur. Ensuite, une capsule multi-compartmentée permettrait d'encapsuler des populations cellulaires différentes, l'une dans l'espace annulaire et l'autre ensemencée dans la bille de GelMA, pour étudier des problèmes de compétition tissulaire à 3D.

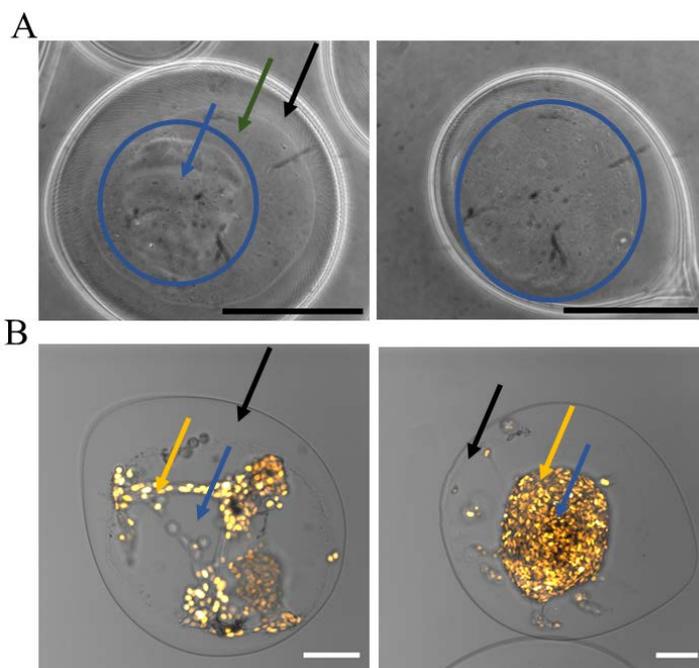
- Expérimentalement, nous avons utilisé de l'Alginate à 2% en ES, du Sorbitol à 300 mM ou une suspension cellulaire en IS et du GelMA à 10% en CS (Tableau 2, expérience 7). Le dessin de principe de l'encapsulation est représenté sur la Figure 4.12.



**Figure 4.12 : Dessin du principe de formation de capsules multi-compartmentées.** A) Pousse seringue avec ses 3 solutions ES, CS et IS, B) puce avec chambre en plastique, photoréticulation du cœur des capsules formées, C/ Capsules photoréticulées. D) Réticulation de la coque de la capsule dans le bain de calcium

La Figure 4.13 montre quelques capsules représentatives (avec (Figure 4.13A) et sans (Figure 4.13B) cellule). Nous pouvons observer clairement la bille de GelMA à l'intérieur de la capsule d'Alginate (Figure 4.12A et B). En présence de cellules, les quelques expériences effectuées montrent que les cellules adhèrent sur la bille de GelMA (Figure 4.12C et D). Sur ces images, la bille transparente de GelMA n'est pas visible. La Vidéo 9 nous permet de voir de manière

plus évidente l'étalement des cellules sur cette structure 3D.



**Figure 4.13 : Capsules multi-compartimentées.** (A) Capsules multi-compartimentées. La bille de GelMA est surlignée en bleu ; la flèche verte montre l'espace annulaire libre ; la flèche noire montre la paroi d'Alginate. Barres d'échelle 200  $\mu\text{m}$ . (B) Même type de capsule que (A) avec des cellules 3T3-F442A marquées au Syto 13 (en jaune). La flèche bleue montre la bille de GelMA, la flèche noire indique la coque d'Alginate et la flèche jaune vise les cellules . Barre d'échelle 50  $\mu\text{m}$ .

## 4.5 Récapitulatif

Le tableau suivant récapitule les différentes expériences que nous avons réalisées dans le cadre de ce chapitre portant sur l'utilisation d'une réticulation photo-induite pour enrichir les propriétés de nos capsules.

Solution Expériences	ES		CS		IS	
	Solution	Réticulation	Solution	Réticulation	Solution	Réticulation
1	Alginate 2%		Sorbitol /Cellales	/	GelMA 5% + LAP 0.5%	
2	Alginate 1.5 % GelMA 5% + LAP 0.5%		Sorbitol /Cellules	/	Sorbitol	/
3	Alginate 1.5% GelMA 5% + PEGDA 10% + LAP 0.5%		Sorbitol	/	Sorbitol	/
4	Alginate 1.5% GelMA 5% + PEGDA 5% + LAP 0.5%		Pluronic F127		Sorbitol	/
5	AlgMA 2% + LAP 0.5%		Sorbitol	/	Sorbitol	/
6	AlgMA 1.5% + GelMA 5% + LAP 0.5%		Sorbitol /Cellules	/	Sorbitol	/
7	Alginate 2%		GelMA 5% + LAP 0.5%	/	Sorbitol /Cellules	/

**Tableau 2 : Récapitulatif des différentes variantes de la technique d'encapsulation**

Tout d'abord, nous avons vu qu'une condition nécessaire à la formation de tubes et de capsules

à base de GelMA est l'utilisation d'un second hydrogel également photo-réticulable, faute de quoi l'ancrage ou l'interpénétration entre les deux composés gélifiés est insuffisant. Nous avons pu voir que l'AlgMA est un bon candidat pour la formation des coques composites « cell-adhesive » à base de GelMA.

Cette méthode offre de nombreuses perspectives. En effet, alors que les propriétés mécaniques et chimiques des coques d'alginate natif sont, de manière inhérente, peu modulables, nous pouvons à présent élargir la gamme de propriétés des coques composites, en termes de rigidité, perméabilité, dégradabilité, fonctionnalité chimique...

Toutes les expériences rapportées dans ce chapitre sont restées à un niveau exploratoire et très qualitatif. Nous pensons cependant avoir atteint des preuves de concept qui renouvelle la technologie des capsules cellulaires et l'ouvre potentiellement vers de nouvelles applications.

# 5

## Conclusion et Perspectives

---

L'objectif principal de ces travaux de recherche était, par l'utilisation combinée de la Technique des Capsules Cellulaires et d'imagerie optique avancée, d'**étudier l'impact de contraintes mécaniques sur l'adipogenèse de cellules souches adipeuses en culture 3D**. Nous inspirant de travaux précédents en mécanobiologie montrant que des forces extérieures ou une sensibilité à la rigidité du substrat pouvaient induire la différenciation de cellules souches individuelles étalées sur un substrat, nous souhaitions effectuer une étude quantitative de la différenciation de préadipocytes en condition de confinement 3D dans les capsules creuses d'alginate, mais en l'absence d'agents chimiques adipogéniques. Notre hypothèse de travail initiale était que, par prolifération, l'agrégat préadipocytaire atteindrait la confluence, serait comprimé par la capsule et qu'éventuellement, cette compression quantifiable par la mesure de la dilatation de la capsule suffirait à déclencher la différenciation, qui se manifeste notamment par l'apparition massive de gouttelettes lipidiques. La croissance des organoïdes et leur caractérisation morphométrique a été réalisée par videomicroscopie optique à champ clair. La progression dans le cycle cellulaire ainsi que la production de gouttelettes lipidiques ont été suivies en épifluorescence et microscopie de fluorescence par sectionnement optique.

Nous avons cependant dû rapidement revisiter notre hypothèse de travail, car les pré-adipocytes si prolifératifs à 2D, semblaient proches de la quiescence à 3D, si bien que les organoïdes de préadipocytes ne parvenaient jamais, dans des durées d'expérimentation raisonnables (environ 1 mois), à atteindre la confluence, donc à être soumis à des forces compressives. Cela nous a conduits à nous poser la question d'une telle différence de prolifération entre des cultures à 2D et 3D, d'autant plus que la différenciation semblait se faire spontanément à 3D après un certain délai. Par une étude comparative à 2D sur des motifs adhérents et à 3D dans les capsules, en nous appuyant sur l'établissement de protocoles bien contrôlés, l'acquisition d'une grande quantité d'images et leur analyse détaillée, **nous avons montré que la seule agrégation à 3D des préadipocytes en milieu non-adipogénique simulait en quelque sorte, de manière efficace, une confluence 2D, et suffisait à inhiber la prolifération, puis à déclencher une différenciation spontanée.**

Notre étude quantitative a aussi mis en évidence une différence marquée dans la répartition et la taille des GLs en milieu adipogénique et celle en milieu non adipogénique. La différenciation spontanée a la particularité de générer des GLs géantes, provenant d'une coalescence favorisée entre GLs, réparties à la périphérie de l'agrégat.

Dans la continuité de ce projet, alors que nous nous sommes focalisés sur la production de gouttelettes lipidiques comme seul « readout » de la différenciation, nous pensons maintenant, avec le recul, qu'il serait important de quantifier l'apparition des marqueurs précoces de la différenciation (par western blot par exemple), ainsi que la sécrétion des facteurs adipogéniques. Un dosage ratiométrique de la quantité de lipides par unité de tissu serait un bon indicateur complémentaire de notre estimation par microscopie, même si, comme nous l'avions mis en avant, l'information spatiale de la répartition des gouttelettes lipidiques serait perdue. Une étude pourrait également être faite sur l'objectif premier de ce projet, i.e. regarder l'impact de contraintes mécaniques sur l'adipogenèse. Plus particulièrement, sur cette différenciation précoce liée au compactage 3D. Il serait intéressant d'étudier si celui-ci inhiberait cette différenciation spontanée ou au contraire l'exacerberait.

Nous avons vu que la compression d'organoïdes préadipocytaires ne peut être générée par la seule utilisation des capsules creuses d'alginate. Des essais exploratoires nous ont montrés que l'inclusion complète des organoïdes dans un gel d'alginate était gênée par le brunissement de l'alginate (voir annexe 3). La stratégie serait donc de générer une compression par des méthodes tels que la pression osmotique ou encore par gonflement de gels confinés (autre que l'alginate). Cela permettrait i) d'induire de manière contrôlée la compression, ii) de l'appliquer directement après formation de l'agrégat, réduisant ainsi le temps nécessaire d'observation.

Cherchant dès le début du projet à trouver une stratégie qui nous permette de comprimer coûte que coûte les agrégats en 3D, nous avons commencé par faire quelques développements technologiques sur la méthode d'encapsulation cellulaire. Outre l'ajout d'un champ électrique qui améliore la monodispersité et sphéricité des capsules, nous avons par exemple développé ces capsules à coque épaisse ou petit cœur. Ensuite, nous avons réalisé un travail exploratoire pour élargir les applications de la technique des capsules, en jouant en particulier sur la formulation de la coque polymère. En nous inspirant de la bio-impression, nous avons réalisé des capsules tubulaires et sphériques à base d'hydrogels photoréticulables. La grande diversité des polymères photoréticulables disponibles, nous a permis de moduler les propriétés mécaniques (rigidité, visco-élasticité) et chimiques (bio-adhésion) des capsules.

Pour conclure, ces travaux proposent une ouverture vers une plus grande modularité des conditions de culture cellulaire en 3D pour l'étude des forces mécaniques sur la croissance et la différenciation des cellules souches, embryonnaires ou induites à la pluripotence.

# **Annexe 1: Protocole d'extraction de Fraction Stromale Vasculaire (SVF) sur des souris**

---

- Le tissu adipeux est extrait dans la zone sous cutanée et sur les testicules d'une souris.
- Il est ensuite pesé, placé dans un tube de 50 ml, puis dans 3 mL de milieu de digestion par gramme, à 37°C. Ce milieu de digestion est composé de Collagénase I (Sigma-Aldrich, 17018029, concentration finale 1,5 mg/ml), de Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich, A8531-1VL, concentration finale à 20 mg/mL), de tampon HBSS et de Dispase II (Sigma-Aldrich, D4693-1G, 2.5 U/ml).
- Le tube est agité à 37°C entre 45 et 60 minutes. La réaction est ensuite stoppée par ajout de Sérum de Veau Fetal (FCS) à 10% v/v.
- On filtre ensuite le tissu adipeux digéré avec un tamis de 200 µm pour retirer les parties non digérées. Nous laissons sédimenter quelques minutes. Le mélange est maintenant biphasique. Nous récupérons la phase inférieure que nous plaçons dans un nouveau tube et jetons la phase supérieure blanche restante.
- Afin de récupérer les SVF, nous centrifugeons la suspension à 400G pendant 10 minutes. Nous resuspendons le culot de cellules dans 10 mL de milieu DMEM 1g glucose/L avec 2 mM de L-Glutamine (Sigma-Aldrich, G7513-20ML), de 15 mM d'Hepes (Thermofisher, 15630106), et 20 µg/mL la Gentamicine (Thermofisher, 15710064).
- Nous filtrons ensuite la suspension à travers un filtre 100 µm puis une seconde fois à travers un filtre 40 µm.
- Nous centrifugeons une nouvelle fois la suspension à 400G pendant 10 minutes.
- Nous reprenons le culot cellulaire dans 1 mL de tampon de lyse de globules rouges pendant 1 minute.
- Nous stoppons la réaction en ajoutant 9mL de DMEM à 10% de SVF, 10 µg/mL de gentamicine, 15 mM d'Hepes, 2 mM de L-Glutamine.
- Les cellules sont maintenant prêtes à être ensemencées à une concentration de 25 000 cellules / cm<sup>2</sup>.



## Annexe 2: "Macro" de segmentation

---

**Indication avant utilisation :** Créer un premier dossier, au préalable, contenant un dossier appelé « position » suivi du numéro de la position (du puits d'agarose). Veillez à ce que toutes les images d'une même position (en fonction du temps) soient dans le dossier associé.

Si vous avez sauvegardé toutes vos positions dans un même dossier, et que vous avez veillé à ce qu'ils soient dans l'ordre chronologique, vous pouvez utiliser le programme en python se trouvant à la fin de cette annexe.

### Macro :

chemin1=" "; // chemin où se trouvent les agrégats à analyser et où vont être créés les dossiers pour chaque position  
for (position=1; position<=20; position++) // indiquer le nombre de positions (=nombre d'images par jour)

```
{
    requires("1.33s");
    print(position);
    dir = getDirectory(chemin+"/position"+position);
    setBatchMode(true);
    count = 0;
    countFiles(dir);
    n = 0;
    processFiles(dir);
    function countFiles(dir) {
        list = getFileList(dir);
        for (i=0; i<list.length; i++) {
            if (endsWith(list[i], "/"))
                countFiles(""+dir+list[i]);
            else
                count++;
        }
    }
}
function processFiles(dir) {
    list = getFileList(dir);
    for (i=0; i<list.length; i++) {
        if (endsWith(list[i], "/"))
            processFiles(""+dir+list[i]);
        else {
            showProgress(n++, count);
            path = dir+list[i];
            processFile(path);
        }
    }
}
selectWindow("Results");
```

```
    saveAs("Measurements", dir + "Results.csv");
    run("Clear Results");
}
function processFile(path) {
    if (endsWith(path, ".tif")) {
        open(path);
        run("16-bit");
        run("Pseudo flat field correction", "blurring=50 hide");
        run("Size...", "width=2880 height=2048 depth=1 constrain average interpolation=Bilinear");
        setAutoThreshold("MaxEntropy");
        run("Convert to Mask");
        run("Rotate 90 Degrees Right");
        run("Analyze Particles...", "size=2000-250000 circularity=0.10-1.00 show=Outlines display
exclude add");
        run("Rotate 90 Degrees Left");
        title=getTitle();
        selectWindow(title);
        saveAs(path+"seg");
        close();
    }
}
```

### Code Python:

```
import scipy
import numpy as np
from natsort import natsorted

chemin1="" # chemin du dossier contenant les images
chemin2="" # chemin de sauvegarde
listdir=os.listdir(chemin1)

liste=natsorted(listdir)
longueurliste=len(liste)

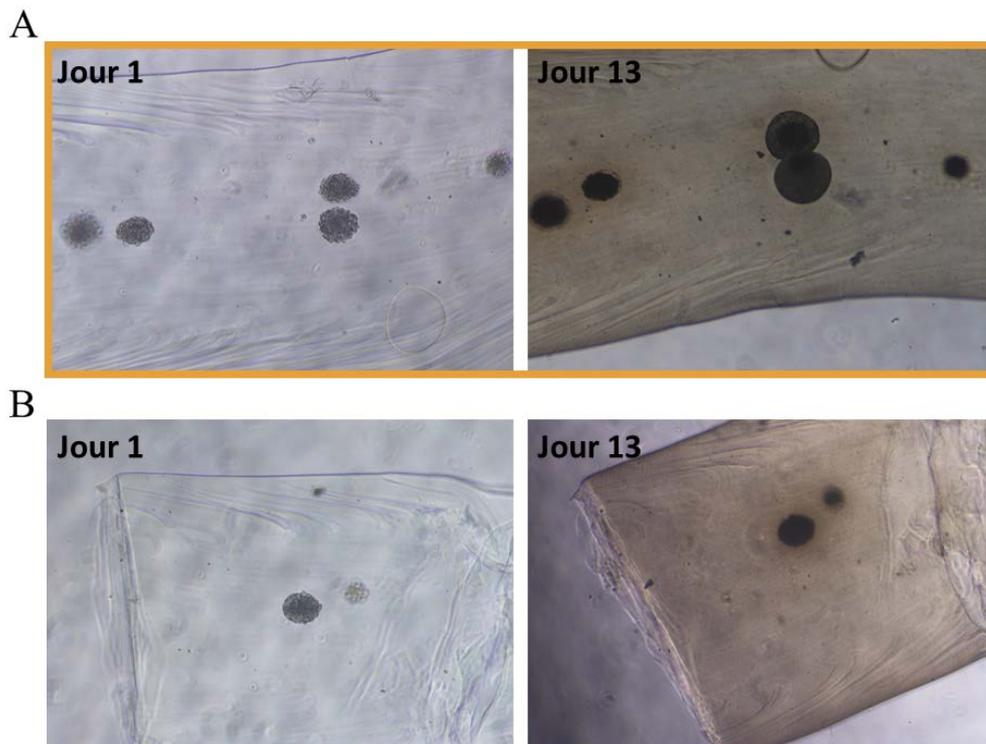
Position=[]
Positions=[]
print(liste)

for x in range(0,32): # indiquer le nombre de positions prises par jour
    z=x+1
    chemin3= chemin2 + str(z)
    if not os.path.exists(chemin3):
        os.makedirs(chemin2+ str(z))
    for y in range(0,longueurliste,32):
        nb=x+y

    if not os.path.exists(chemin3+'/'+liste[nb]):
        shutil.copy(chemin1+'/'+liste[nb], chemin3 )
```

## Annexe 3: Brunissage de l'alginate

---



**Annexe 3 : Brunissage d'un tube d'alginate 13 jours après inclusion d'organoïde préadipocytaire en milieu adipogénique et non-adipogénique. (A) En milieu adipogénique, (B) en milieu non-adipogénique.**

## Annexe 4: Fabrication hydrogels

---

### Synthèse de la Gélatine Méthacrylate

La gélatine méthacrylate (GelMA) a été préparée comme décrit dans (Van Den Bulcke et al., 2000).

- La gélatine (peau de porc, type A, force de gel 300 bloom, G2500, Sigma-Aldrich) est dissoute dans de l'eau déionisée à une concentration de 10% (p/v) dans un bain-marie à 50 °C.
- Tout en agitant vigoureusement, 0,6 g d'anhydride méthacrylique (276685, Sigma-Aldrich) est ajouté pour chaque 1 g de gélatine dissoute à un taux de 0,5 mL/min. Après 1 heure, le mélange réactionnel est dialysé (MWCO 12 000-15 000, Medicell Membranes) dans de l'eau ultrapure pendant 7 jours à 40°C.
- Le mélange est ensuite filtré (filtres jetables stériles Rapid-Flow, 595-3320, Thermo Scientific) et lyophilisé pendant une semaine. La mousse poreuse blanche obtenue est stockée à -20°C jusqu'à utilisation ultérieure.

Le degré de fonctionnalisation (DoF) du GelMA a été déterminé en quantifiant le pourcentage de réduction des groupes NH<sub>2</sub> libres dans la GelMA causé par la fonctionnalisation méthacryloyle. La réduction des groupes NH<sub>2</sub> libres dans la GelMA par rapport à la gélatine non modifiée est déterminée à l'aide du test à la ninhydrine décrit dans (Loessner et al., 2016).

- La ninhydrine (2,5 mg/ml, 151173, Sigma-Aldrich) est dissoute dans une solution de 1/3 de citrate de sodium monobasique 0,5 M et 2/3 parts de glycérol (G5516, Sigma-Aldrich).
- A 950 µl de cette solution, on a ajouté 50 µl de GelMA (100mg/ml) ou de gélatine (à des concentrations variables (0-100mg/ml)).
- Les échantillons sont chauffés à 85°C pendant 12 minutes et laissés refroidir à température ambiante pendant 30 minutes.

L'absorption à 570 nm (iMark, Bio-Rad) est mesurée et le DoF est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{DoF of GelMA} = (\text{absorption of Gelatin} - \text{absorption of GelMA}) / (\text{absorption of Gelatin}) \times 100 \%$$

Le pourcentage de DoF du GelMA, que nous avons synthétisé est d'environ 90 %.

### Synthèse de l'Alginate Méthacrylate

La synthèse de l'alginate méthacrylate (AlgMA) a été adaptée de (Rouillard et al., 2011).

- L'alginate (FMC Biopolymer) a été dissout dans 20 mL d'eau déionisée pour obtenir une solution d'alginate à 2,5% (p/v).
- Après ajout de 20 ml d'anhydride méthacrylique (276685, Sigma-Aldrich), la solution est maintenue à température ambiante à un pH compris entre 7 et 8 en ajoutant 30 mL de NaOH 5M (Sigma) ont été ajouté goutte à goutte sur 72 h.
- L'AlgMA est ensuite dialysé (MWCO 12 000-15 000, Medicell Membranes) dans de l'eau ultrapure pendant 6 jours, puis filtré (filtres jetables stériles Rapid-Flow, 595-3320, Thermo Scientific) et lyophilisé pendant une semaine.
- La mousse poreuse blanche obtenue est stockée à -20°C jusqu'à utilisation ultérieure.

Le DoF n'a pas été mesuré. Il est estimé entre 20 et 40%.

# **Publication 1**

---

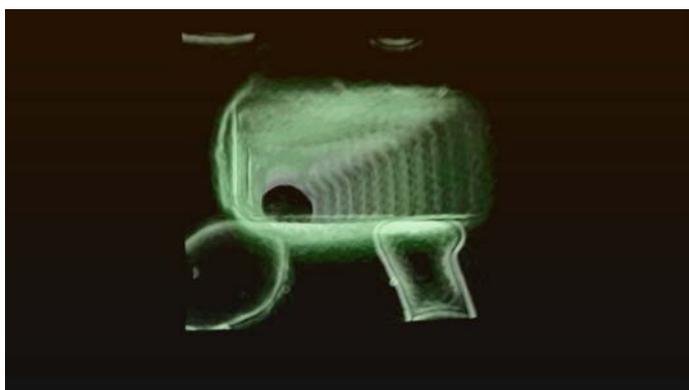
# **Publication 2**

---

# Liste des vidéos

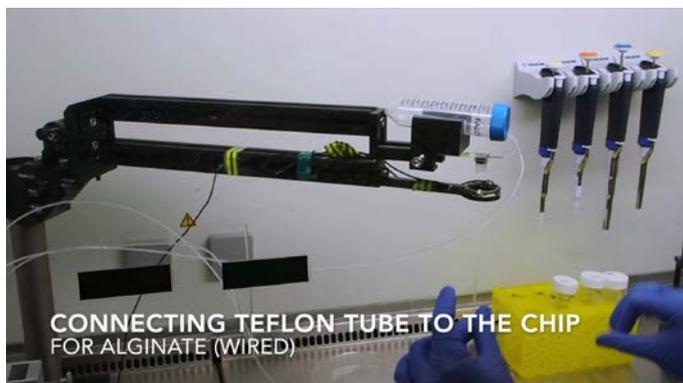
---

## Vidéo 1 :



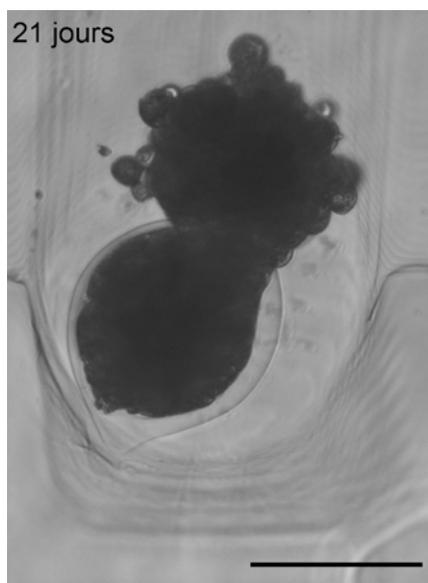
**Vidéo 1:** Rendu 3D d'un puits d'agarose réalisé avec un tampon type Universlide. (voir [vidéo](#)).

## Vidéo 2 :



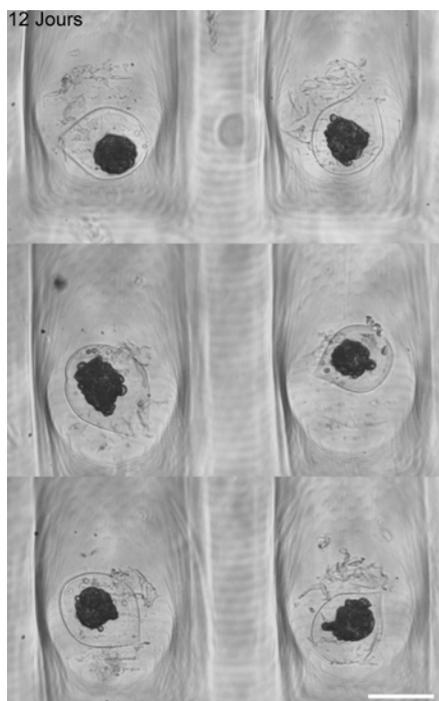
**Vidéo 2 :** Vidéo des différentes étapes de l'encapsulation de capsule sphérique. (voir [Vidéo](#))

**Vidéo 3 :**



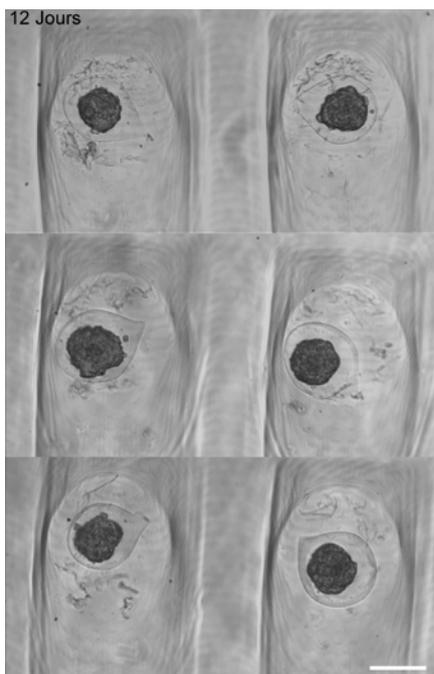
**Vidéo 3 : Rupture d'une capsule d'alginate due à la croissance d'un agrégat.** Vidéo d'une capsule de 3T3-F442A en champ clair à différent jour (voir [vidéo](#)).

**Vidéo 4:**



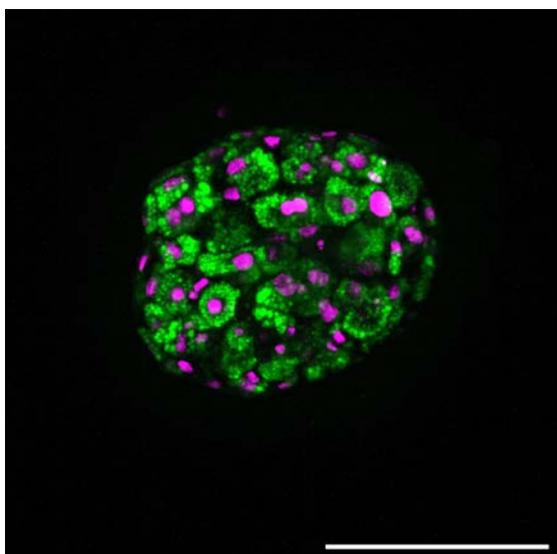
**Vidéo 4 : Croissance d'agrégats préadipocytaire 3T3F442A dans des puits d'agarose en milieu non adipogénique.** (voir [vidéo](#) 4). Barre d'échelle 200µm

**Vidéo 5 :**



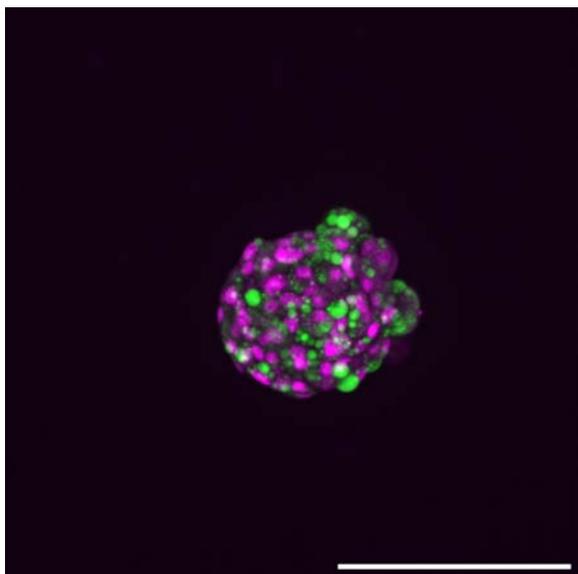
**Vidéo 5 : Croissance d'agrégats préadipocytaire 3T3F442A dans des puits d'agarose en milieu adipogénique.** (voir [vidéo 5](#)). Barre d'échelle 200µm

**Vidéo 6 :**



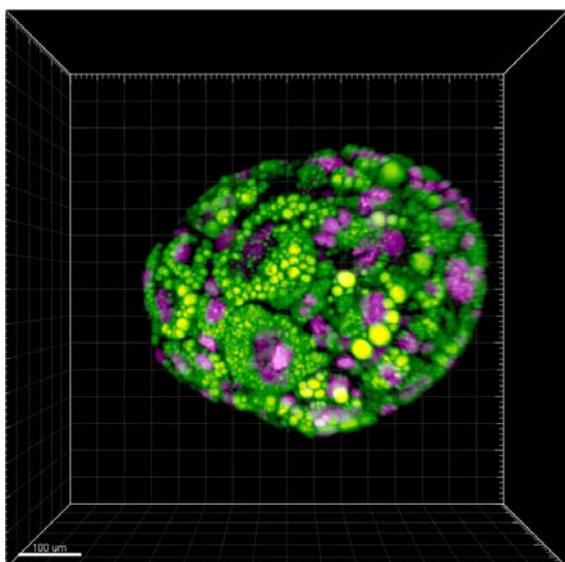
**Vidéo 6 : Mise en évidence de la limitation d'imagerie en profondeur d'organoïdes de 3T3F442A après 13 jours de culture en milieu adipogénique.** (voir [Vidéo 7](#)). Les GLs sont marquées par du Bodipy 505/515 et les noyaux par du Hoescht. Barre d'échelle : 200µm

**Vidéo 7 :**



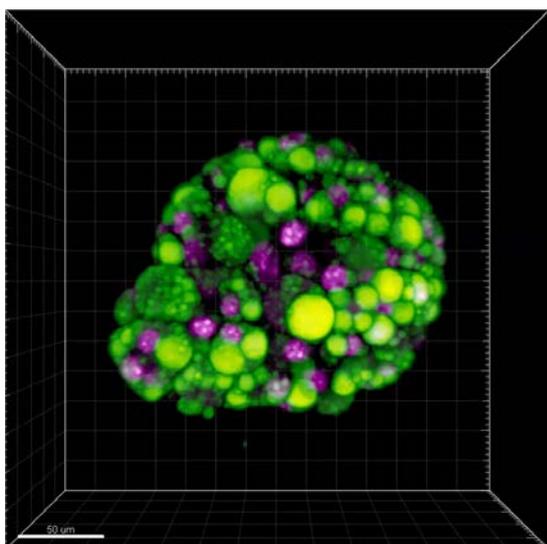
**Vidéo 7 :** Mise en évidence de la limitation d'imagerie en profondeur d'organoïdes de 3T3F442A après 13 jours de culture en milieu non-adipogénique. (voir [Vidéo](#)). Les GLs sont marquées par du Bodipy 505/515 et les noyaux par du Hoescht. Barre d'échelle : 200µm

**Vidéo 8 :**



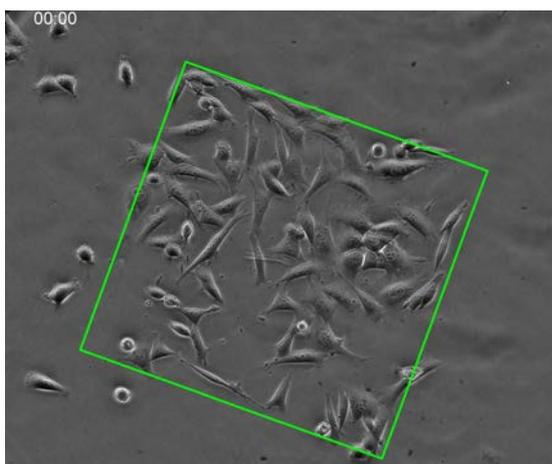
**Vidéo 8 :** Rendu 3D en microscopie confocale d'agrégats de préadipocytes fixés après 21 jours de culture en milieu adipogénique. (voir [vidéo](#) ). Barre d'échelle :100 µm. Marquage des noyaux par Hoechst (magenta) et des gouttelettes lipidiques par Bodipy (vert).

**Vidéo 9 :**



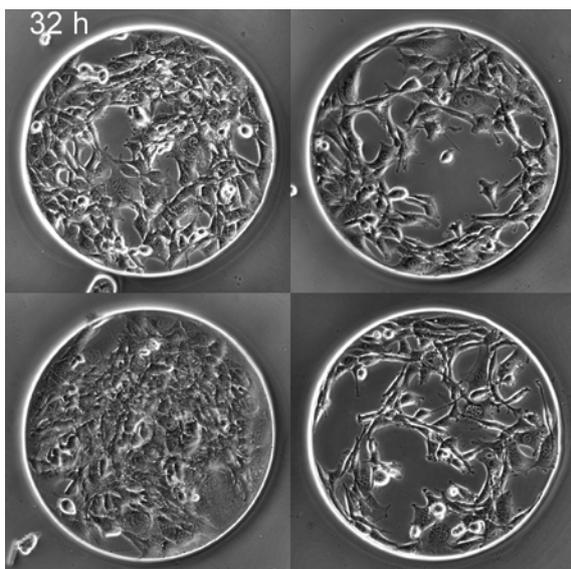
**Vidéo 9 : Rendu 3D en microscopie confocale d'agrégats de préadipocytes fixés après 22 jours de culture en milieu non adipogénique.** (voir [vidéo](#)).  
Barre d'échelle : 50 µm. Marquage des noyaux par Hoechst (magenta) et des gouttelettes lipidiques par Bodipy (vert).

**Vidéo 10 :**



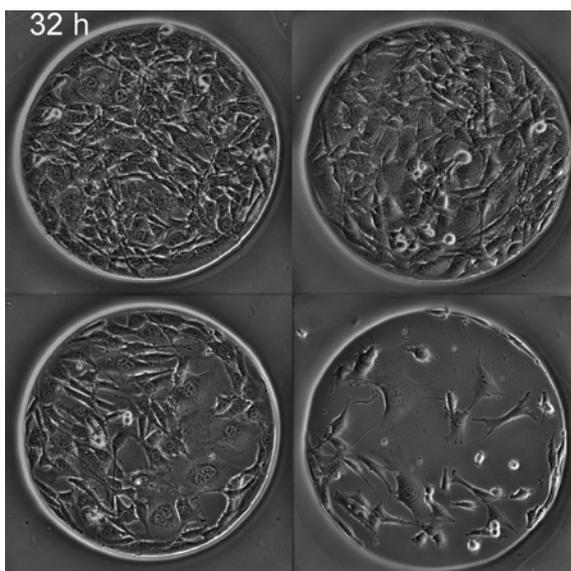
**Vidéo 10 : Confinement cellulaire à 2D par micro-impression d'îlots adhérents et échappement cellulaire.** Images en contraste de phase de cellules 3T3F442A adhérant sur le pattern couvert de fibronectine 2h après ensemencement (voir [vidéo](#)).  
barre d'échelle : 200µm

**Vidéo 11:**



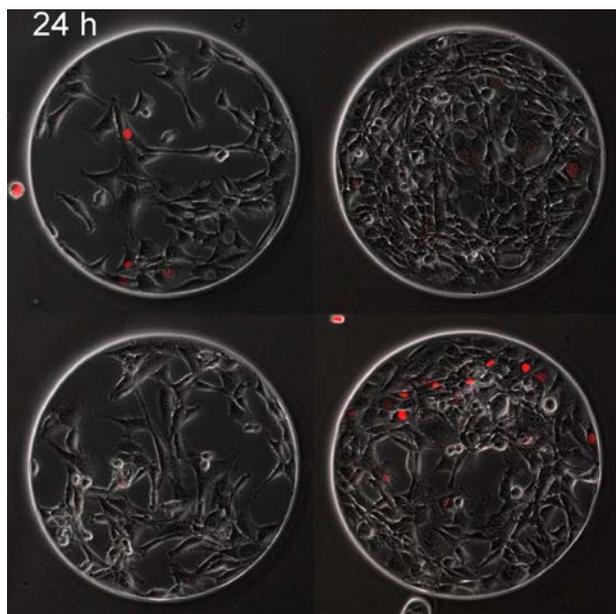
**Vidéo 11: Images en champ clair de la croissance des pré adipocytes en 2D sur des motifs circulaires en milieu adipogénique.** (voir [vidéo](#)) . Diamètre des motifs : 500  $\mu\text{m}$

**Vidéo 12:**



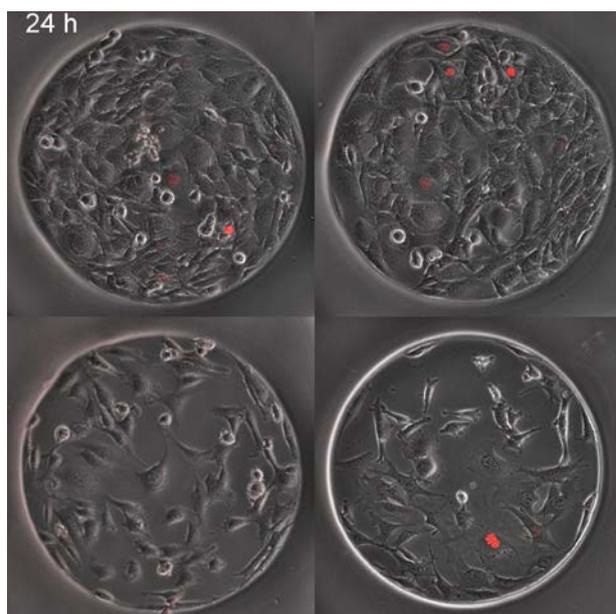
**Vidéo 12: Time-lapse en champ clair de la croissance des pré adipocytes en 2D sur des motifs circulaires en milieu non adipogénique.** (voir [vidéo](#)) . Diamètre des motifs : 500  $\mu\text{m}$

**Vidéo 13 :**



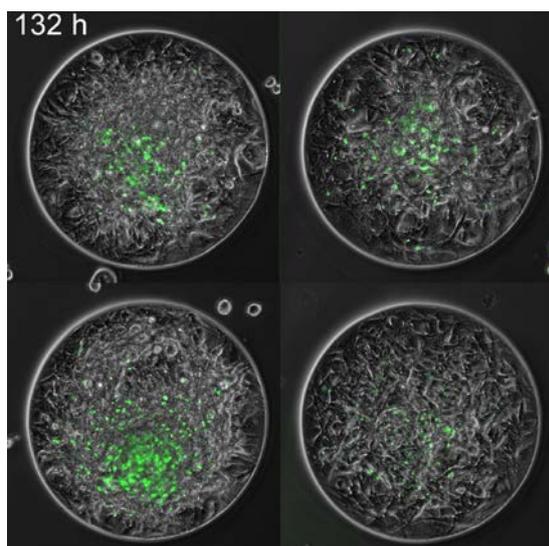
**Vidéo 13** : Images en « Champ clair/fluorescence » de préadipocytes FUCCI sur motifs 2D en fonction du temps, en milieu adipogénique. (voir [vidéo](#)). En rouge, les cellules en phase G0-G1. Diamètre des motifs: 500 $\mu$ m

**Vidéo 14 :**



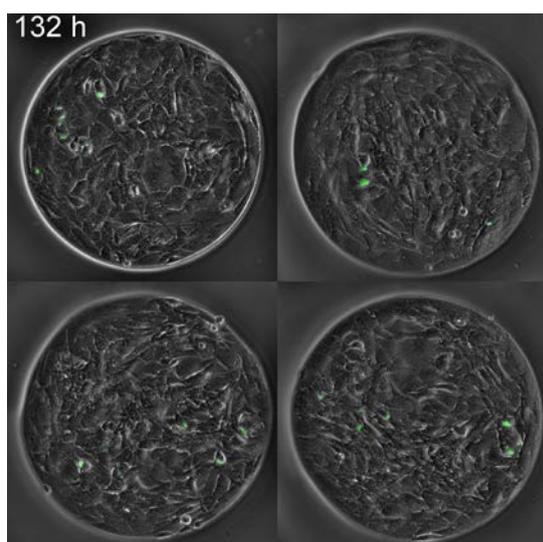
**Vidéo 14** : Images en « Champ clair/fluorescence » de préadipocytes FUCCI sur motifs 2D en fonction du temps, en milieu non-adipogénique. (voir [vidéo](#)). En rouge, les cellules en phase G0-G1. Diamètre des motifs: 500 $\mu$ m

**Vidéo 15 :**



**Vidéo 15 : Suivi en « Champ clair/fluorescence » de l'apparition des GLs de préadipocytes sur motifs 2D en milieu adipogénique.** (voir [vidéo](#)). En vert, les GLs marquées au Bodipy 505/515. Diamètre des motifs: 500 $\mu$ m.

**Vidéo 16 :**



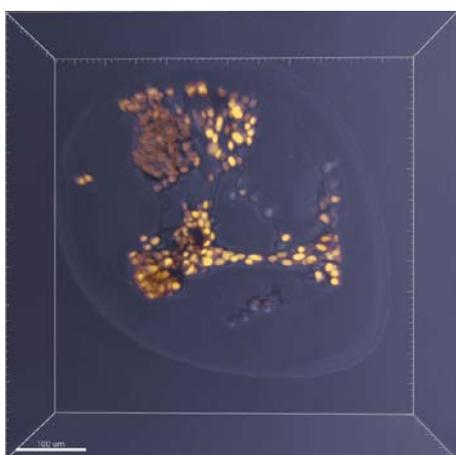
**Vidéo 16 : Suivi en « Champ clair/fluorescence » de l'apparition des GLs de préadipocytes sur motifs 2D en milieu non-adipogénique.** (voir [vidéo](#)). En vert, les GLs marquées au Bodipy 505/515. Diamètre des motifs: 500 $\mu$ m

**Vidéo 17 :**



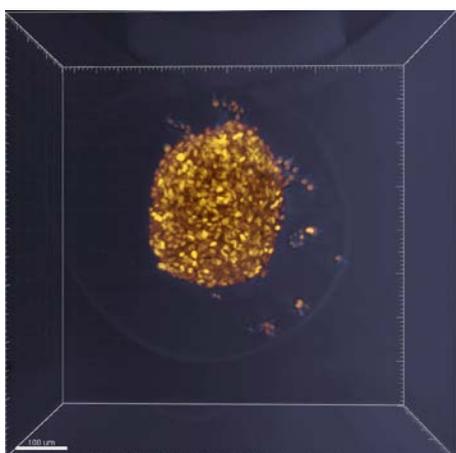
**Vidéo 17 :** Vidéo des différentes étapes de l'encapsulation de capsule sphérique par double réticulation. (voir [Vidéo](#))

**Vidéo 18 :**



**Vidéo 18 :** Rendu 3D de préadipocytes adhérent sur la bille de GelMA au coeur d'une capsules multi-compartmentées. Marquage des cellules au Syto 13. (Voir [vidéo](#)). Barres d'échelle 100 µm.

**Vidéo 19 :**



**Vidéo 19 :** Rendu 3D de préadipocytes adhérent sur la bille de GelMA au coeur d'une capsules multi-compartmentées. Marquage des cellules au Syto 13. (Voir [vidéo](#)). Barres d'échelle 100 µm.

## References

---

- Agarwal P, Choi JK, Huang H, Zhao S, Dumbleton J, Li J, et al. A Biomimetic Core-Shell Platform for Miniaturized 3D Cell and Tissue Engineering. *Part Part Syst Charact* 2015;32:809–16. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201500025>.
- Agarwal P, Zhao S, Bielecki P, Rao W, Choi JK, Zhao Y, et al. One-step microfluidic generation of pre-hatching embryo-like core-shell microcapsules for miniaturized 3D culture of pluripotent stem cells. *Lab Chip* 2013;13:4525. <https://doi.org/10.1039/c3lc50678a>.
- Aggeler J, Park CS, Bissell MJ. Regulation of Milk Protein and Basement Membrane Gene Expression: The Influence of the Extracellular Matrix. *J Dairy Sci* 1988;71:2830–42. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79879-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79879-3).
- Alessandri K. The Cellular Capsules technology And its applications to investigate model tumor progression and to engineer tissues in vitro. Thèse. Université Paris Descartes, 2013.
- Alessandri K, Andrique L, Feyeux M, Bikfalvi A, Nassoy P, Recher G. All-in-one 3D printed microscopy chamber for multidimensional imaging, the UniverSlide. *Sci Rep* 2017;7:42378. <https://doi.org/10.1038/srep42378>.
- Alessandri K, Feyeux M, Gurchenkov B, Delgado C, Trushko A, Krause KH, et al. A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC). *Lab Chip* 2016;16:1593–604. <https://doi.org/10.1039/c6lc00133e>.
- Alessandri K, Sarangi BR, Gurchenkov VV, Sinha B, Kiessling TR, Fetler L, et al. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110:14843–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309482110>.
- Allier CP, Kesavan SV, Cioni O, Momey F, Bordy T, Hervé L, et al. Lensfree video microscopy: High throughput monitoring and cell tracking of 2D cell cultures. *Opt InfoBase Conf Pap* 2014;9536:1–10. <https://doi.org/10.1117/12.2183468>.
- Andrique L, Recher G, Alessandri K, Pujol N, Feyeux M, Bon P, et al. A model of guided cell self-organization for rapid and spontaneous formation of functional vessels. *Sci Adv* 2019;5:eaau6562. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau6562>.
- Annabi N, Tamayol A, Uquillas JA, Akbari M, Bertassoni LE, Cha C, et al. 25th Anniversary Article: Rational Design and Applications of Hydrogels in Regenerative Medicine. *Adv Mater* 2014;26:85–124. <https://doi.org/10.1002/adma.201303233>.
- Antonica F, Kasprzyk DF, Opitz R, Iacovino M, Liao X-H, Dumitrescu AM, et al. Generation of functional thyroid from embryonic stem cells. *Nature* 2012;491:66–71. <https://doi.org/10.1038/nature11525>.

- Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, et al. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* 2003;421:268–72. <https://doi.org/10.1038/nature01279>.
- Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromol Biosci* 2006;6:623–33. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600069>.
- Báez GD, Piccirilli GN, Ballerini GA, Frattini A, Busti PA, Verdini RA, et al. Physicochemical Characterization of a Heat Treated Calcium Alginate Dry Film Prepared with Chicken Stock: Heated film of alginate-chicken stock.... *J Food Sci* 2017;82:945–51. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13658>.
- Bajpai SK, Sharma S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> ions. *React Funct Polym* 2004;59:129–40. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2004.01.002>.
- Beaupaire E, Boccara AC, Lebec M, Blanchot L, Saint-Jalmes H. Full-field optical coherence microscopy. *Opt Lett* 1998;23:244. <https://doi.org/10.1364/OL.23.000244>.
- Ben-Or Frank M, Shoham N, Benayahu D, Gefen A. Effects of accumulation of lipid droplets on load transfer between and within adipocytes. *Biomech Model Mechanobiol* 2015;14:15–28. <https://doi.org/10.1007/s10237-014-0582-8>.
- Bergmann RB, Bill A. On the origin of logarithmic-normal distributions: An analytical derivation, and its application to nucleation and growth processes. *J Cryst Growth* 2008;310:3135–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2008.03.034>.
- Boppart SA, Bouma BE, Brezinski ME, Tearney GJ, Fujimoto JG. Imaging developing neural morphology using optical coherence tomography. *J Neurosci Methods* 1996;70:65–72. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(96\)00104-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(96)00104-5).
- Bremond N, Santanach-Carreras E, Chu LY, Bibette J. Formation of liquid-core capsules having a thin hydrogel membrane: Liquid pearls. *Soft Matter* 2010;6:2484–8. <https://doi.org/10.1039/b923783f>.
- Brú A, Pastor JM, Fernaud I, Brú I, Melle S, Berenguer C. Super-Rough Dynamics on Tumor Growth. *Phys Rev Lett* 1998;81:4008–11. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.81.4008>.
- Brugués A, Anon E, Conte V, Veldhuis JH, Gupta M, Colombelli J, et al. Forces driving epithelial wound healing. *Nat Phys* 2014;10:683–90. <https://doi.org/10.1038/nphys3040>.
- Bush M, Alhanshali BM, Qian S, Stanley CB, Heller WT, Matsui T, et al. An ensemble of flexible conformations underlies mechanotransduction by the cadherin–catenin adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci* 2019;116:21545–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911489116>.
- Calder A, Roth-albin I, Bhatia S, Pilquil C, Lee JH, Bhatia M, et al. Lengthened G1 Phase Indicates Differentiation Status in Human Embryonic Stem Cells 2013;22. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0168>.
- Caliari SR, Burdick JA. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Methods* 2016;13:405–14. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>.
- Campàs O, Mammoto T, Hasso S, Sperling RA, O’Connell D, Bischof AG, et al. Quantifying cell-generated mechanical forces within living embryonic tissues. *Nat Methods* 2013;11:183–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2761>.

- Castro-Muñozledo F, Beltrán-Langarica A, Kuri-Harcuch W. Commitment of 3T3-F442A cells to adipocyte differentiation takes place during the first 24–36 h after adipogenic stimulation: TNF- $\alpha$  inhibits commitment. *Exp Cell Res* 2003;284:161–70. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(02\)00036-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(02)00036-8).
- Cavalieri F, Miano F, D'Antona P, Paradossi G. Study of Gelling Behavior of Poly(vinyl alcohol)-Methacrylate for Potential Utilizations in Tissue Replacement and Drug Delivery. *Biomacromolecules* 2004;5:2439–46. <https://doi.org/10.1021/bm049654g>.
- Centonze VE, White JG. Multiphoton Excitation Provides Optical Sections from Deeper within Scattering Specimens than Confocal Imaging. *Biophys J* 1998;75:2015–24. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77643-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77643-X).
- Chan V, Zorlutuna P, Jeong JH, Kong H, Bashir R. Three-dimensional photopatterning of hydrogels using stereolithography for long-term cell encapsulation. *Lab Chip* 2010;10:2062. <https://doi.org/10.1039/c004285d>.
- Chaudhuri O, Gu L, Klumpers D, Darnell M, Bencherif SA, Weaver JC, et al. Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity. *Nat Mater* 2016;15:326–34. <https://doi.org/10.1038/nmat4489>.
- Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric Control of Cell Life and Death. *Science* 1997;276:1425–8. <https://doi.org/10.1126/science.276.5317.1425>.
- Chen, Tang, Wang, Zhao, Chen, Zhu. Applications of Hydrogels with Special Physical Properties in Biomedicine. *Polymers* 2019;11:1420. <https://doi.org/10.3390/polym11091420>.
- Chen Y-H, Peng C-C, Tung Y-C. Flip channel: A microfluidic device for uniform-sized embryoid body formation and differentiation. *Biomicrofluidics* 2015;9:054111. <https://doi.org/10.1063/1.4931638>.
- Cheng B, Lin M, Huang G, Li Y, Ji B, Genin GM, et al. Cellular mechanosensing of the biophysical microenvironment: A review of mathematical models of biophysical regulation of cell responses. *Phys Life Rev* 2017;22–23:88–119. <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2017.06.016>.
- Cheng G, Tse J, Jain RK, Munn LL. Micro-Environmental Mechanical Stress Controls Tumor Spheroid Size and Morphology by Suppressing Proliferation and Inducing Apoptosis in Cancer Cells. *PLoS ONE* 2009;4:e4632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004632>.
- Cho S, Irianto J, Discher DE. Mechanosensing by the nucleus: From pathways to scaling relationships. *J Cell Biol* 2017;216:305–15. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610042>.
- Choquet D, Felsenfeld DP, Sheetz MP. Extracellular Matrix Rigidity Causes Strengthening of Integrin–Cytoskeleton Linkages. *Cell* 1997;88:39–48. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81856-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81856-5).
- Chung K, Wallace J, Kim S, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, et al. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 2013;497:332–7. <https://doi.org/10.1038/nature12107>.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005;46:2347–55. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500294-JLR200>.
- Cooper MS, Hardin WR, Petersen TW, Cattolico RA. Visualizing “green oil” in live algal cells.

- J Biosci Bioeng 2010;109:198–201. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.08.004>.
- Costăchel O, Fadei L, Badea E. Tumor cell suspension culture on non adhesive substratum. *Z Für Krebsforsch* 1969;72:24–31. <https://doi.org/10.1007/BF00524788>.
- Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, et al. Piezo1 and Piezo2 Are Essential Components of Distinct Mechanically Activated Cation Channels. *Science* 2010;330:55–60. <https://doi.org/10.1126/science.1193270>.
- Cruz-Acuña R, Quirós M, Huang S, Siuda D, Spence JR, Nusrat A, et al. PEG-4MAL hydrogels for human organoid generation, culture, and in vivo delivery. *Nat Protoc* 2018;13:2102–19. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0036-3>.
- Cukierman E. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science* 2001;294:1708–12. <https://doi.org/10.1126/science.1064829>.
- Dahl KN, Ribeiro AJS, Lammerding J. Nuclear Shape, Mechanics, and Mechanotransduction. *Circ Res* 2008;102:1307–18. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.173989>.
- Declercq H, Vertenten G, Lippens E, Swennen I, Girone J, Vlamincck L, et al. Cell survival and proliferation after encapsulation in a chemically modified Pluronic F127 hydrogel 2011;27:828–39. <https://doi.org/10.1177/0885328211427774>.
- Delarue M, Montel F, Caen O, Elgeti J, Siaugue J-M, Vignjevic D, et al. Mechanical Control of Cell flow in Multicellular Spheroids. *Phys Rev Lett* 2013;110:138103. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.110.138103>.
- Delarue M, Montel F, Vignjevic D, Prost J, Joanny J-F, Cappello G. Compressive Stress Inhibits Proliferation in Tumor Spheroids through a Volume Limitation. *Biophys J* 2014;107:1821–8. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.08.031>.
- Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science* 1990;248:73–6. <https://doi.org/10.1126/science.2321027>.
- Discher DE, Janmey P, Wang Y. Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science* 2005;310:1139–43. <https://doi.org/10.1126/science.1116995>.
- Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells. *Science* 2009;324:1673–7. <https://doi.org/10.1126/science.1171643>.
- Doi D, Magotani H, Kikuchi T, Ikeda M, Hiramatsu S, Yoshida K, et al. Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson’s disease. *Nat Commun* 2020;11:3369. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17165-w>.
- Dolega ME, Delarue M, Ingremeau F, Prost J, Delon A, Cappello G. Cell-like pressure sensors reveal increase of mechanical stress towards the core of multicellular spheroids under compression. *Nat Commun* 2017;8:14056. <https://doi.org/10.1038/ncomms14056>.
- Dou Q, Abdul Karim A, Loh X. Modification of Thermal and Mechanical Properties of PEG-PPG-PEG Copolymer (F127) with MA-POSS. *Polymers* 2016;8:341. <https://doi.org/10.3390/polym8090341>.
- Draget KI, Smidsrød O, Skjåk-Bræk G. Alginates from Algae. In: Steinbüchel A, editor. *Biopolym. Online*. 1st ed., Wiley; 2002. <https://doi.org/10.1002/3527600035.bpol6008>.
- Drasdo D, Hoehme S, Block M. On the Role of Physics in the Growth and Pattern Formation

of Multi-Cellular Systems : What can we Learn from Individual-Cell Based Models ? 2007;128. <https://doi.org/10.1007/s10955-007-9289-x>.

Dubois A, Vabre L, Boccara A-C, Beaurepaire E. High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope. *Appl Opt* 2002;41:805. <https://doi.org/10.1364/AO.41.000805>.

Eggers J, Villermaux E. *Physics of liquid jets* 2008;71. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/71/3/036601>.

Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 2011;472:51–6. <https://doi.org/10.1038/nature09941>.

Elbadawi M, Efferth T. Organoids of human airways to study infectivity and cytopathy of SARS-CoV-2. *Lancet Respir Med* 2020;8:e55–6. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30238-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30238-1).

Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 2006;126:677–89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>.

Erickson HP. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biol Proced Online* 2009;11:32–51. <https://doi.org/10.1007/s12575-009-9008-x>.

Ernst AU, Wang L-H, Ma M. Islet encapsulation. *J Mater Chem B* 2018;6:6705–22. <https://doi.org/10.1039/C8TB02020E>.

Evans E. Probing the Relation Between Force—Lifetime—and Chemistry in Single Molecular Bonds. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2001;30:105–28. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.30.1.105>.

Fairbanks BD, Schwartz MP, Bowman CN, Anseth KS. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility. *Biomaterials* 2009;30:6702–7. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.08.055>.

Fatafta H, Khaled M, Sayyed-Ahmad A, Strodel B. Amyloid- $\beta$  peptide dimers undergo a random coil to  $\beta$ -sheet transition in the aqueous phase but not at the neuronal membrane. *Biophysics*; 2021. <https://doi.org/10.1101/2020.12.31.424964>.

Fattahi P, Rahimian A, Slama MQ, Gwon K, Gonzalez-Suarez AM, Wolf J, et al. Core-shell hydrogel microcapsules enable formation of human pluripotent stem cell spheroids and their cultivation in a stirred bioreactor. *Sci Rep* 2021;11:7177. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85786-2>.

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization-principles and practice. *Mass Spectrom Rev* 1990;9:37–70. <https://doi.org/10.1002/mas.1280090103>.

Fertah M, Belfkira A, Dahmane E montassir, Taourirte M, Brouillette F. Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed. *Arab J Chem* 2017;10:S3707–14. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.003>.

Fink J, Carpi N, Betz T, Bétard A, Chebah M, Azioune A, et al. External forces control mitotic spindle positioning. *Nat Cell Biol* 2011;13:771–8. <https://doi.org/10.1038/ncb2269>.

- Fowler SD, Greenspan P. Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O. *J Histochem Cytochem* 1985;33:833–6. <https://doi.org/10.1177/33.8.4020099>.
- Freyer JP, Sutherland RM. A reduction in the in situ rates of oxygen and glucose consumption of cells in EMT6/Ro spheroids during growth. *J Cell Physiol* 1985;124:516–24. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041240323>.
- Friedman JM, Leibel RL, Siegel DS, Walsh J, Bahary N. Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics* 1991;11:1054–62. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90032-A](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90032-A).
- Fu C-Y, Tseng S-Y, Yang S-M, Hsu L, Liu C-H, Chang H-Y. A microfluidic chip with a U-shaped microstructure array for multicellular spheroid formation, culturing and analysis. *Biofabrication* 2014;6:015009. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/1/015009>.
- Gantner CW, Cota-Coronado A, Thompson LH, Parish CL. An Optimized Protocol for the Generation of Midbrain Dopamine Neurons under Defined Conditions. *STAR Protoc* 2020;1:100065. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100065>.
- Gao C, Xiong W, Zhang Y, Yuan W, Wu Q. Rapid quantitation of lipid in microalgae by time-domain nuclear magnetic resonance. *J Microbiol Methods* 2008;75:437–40. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.019>.
- Garten A, Schuster S, Kiess W. The Insulin-Like Growth Factors in Adipogenesis and Obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2012;41:283–95. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2012.04.011>.
- Gilleron J, Goudon T, Lagoutière F, Martin H, Mauroy B, Millet P, et al. Modeling and analysis of adipocytes dynamic with a differentiation process. *ESAIM Proc Surv* 2019;2019:1–10.
- Gjorevski N, Sachs N, Manfrin A, Giger S, Bragina ME, Ordóñez-Morán P, et al. Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature* 2016;539:560–4. <https://doi.org/10.1038/nature20168>.
- Gong X, Lin C, Cheng J, Su J, Zhao H, Liu T, et al. Generation of Multicellular Tumor Spheroids with Microwell-Based Agarose Scaffolds for Drug Testing. *PLOS ONE* 2015;10:e0130348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130348>.
- Gräf R, Rietdorf J, Zimmermann T. Live Cell Spinning Disk Microscopy. In: Rietdorf J, editor. *Microsc. Tech.*, vol. 95, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005, p. 57–75. <https://doi.org/10.1007/b102210>.
- Green H, Kehinde O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 1976;7:105–13. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(76\)90260-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(76)90260-9).
- Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 1975;5:19–27. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(75\)90087-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(75)90087-2).
- Greggio C, De Franceschi F, Figueiredo-Larsen M, Gobaa S, Ranga A, Semb H, et al. Artificial three-dimensional niches deconstruct pancreas development *in vitro*. *Development* 2013;140:4452–62. <https://doi.org/10.1242/dev.096628>.
- Grégoire F, Todoroff G, Hauser N, Remacle C. The stroma-vascular fraction of rat inguinal and epididymal adipose tissue and the adipogenesis of fat cell precursors in primary culture. *Biol Cell* 1990;69:215–22. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(90\)90348-7](https://doi.org/10.1016/0248-4900(90)90348-7).

- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol Rev* 1998;78:783–809. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.3.783>.
- Guevorkian K, Colbert M-J, Durth M, Dufour S, Brochard-Wyart F. Aspiration of Biological Viscoelastic Drops. *Phys Rev Lett* 2010;104:218101. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.104.218101>.
- H. H M, Cooper G, Bartolo PJDS. Development and Characterisation of a Photocurable Alginate Bioink for 3D Bioprinting. *Int J Bioprinting* 2019;5:12. <https://doi.org/10.18063/ijb.v5i2.189>.
- Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, et al. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 1989;84:1663–70. <https://doi.org/10.1172/JCI114345>.
- He X. Microfluidic Encapsulation of Ovarian Follicles for 3D Culture. *Ann Biomed Eng* 2017;45:1676–84. <https://doi.org/10.1007/s10439-017-1823-7>.
- Hossain G, Iwata T, Mizusawa N, Wan S, Shima N, Okutsu T, et al. Compressive force inhibits adipogenesis through COX-2-mediated down-regulation of PPAR  $\gamma$  2 and C / EBP  $\alpha$  2010;109:297–303. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.09.003>.
- Hsiao AY, Torisawa Y, Tung Y-C, Sud S, Taichman RS, Pienta KJ, et al. Microfluidic system for formation of PC-3 prostate cancer co-culture spheroids. *Biomaterials* 2009;30:3020–7. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.02.047>.
- Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, et al. Optical Coherence Tomography. *Science* 1991;254:1178–81. <https://doi.org/10.1126/science.1957169>.
- Huang G, Li F, Zhao X, Ma Y, Li Y, Lin M, et al. Functional and Biomimetic Materials for Engineering of the Three-Dimensional Cell Microenvironment. *Chem Rev* 2017;117:12764–850. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00094>.
- Huang H, He X, Yarmush ML. Advanced technologies for the preservation of mammalian biospecimens. *Nat Biomed Eng* 2021;5:793–804. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00784-z>.
- Huang H, Yu Y, Hu Y, He X, Berk Usta O, Yarmush ML. Generation and manipulation of hydrogel microcapsules by droplet-based microfluidics for mammalian cell culture. *Lab Chip* 2017;17:1913–32. <https://doi.org/10.1039/C7LC00262A>.
- Huch M, Koo B-K. Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development* 2015;142:3113–25. <https://doi.org/10.1242/dev.118570>.
- Huisken J, Huisken J, Swoger J, Bene FD, Wittbrodt J, Stelzer EHK. Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy 2011;1007. <https://doi.org/10.1126/science.1100035>.
- Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J* 2006;20:811–27. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5424rev>.
- Jabbari E, Sarvestani SK, Daneshian L, Moeinzadeh S. Optimum 3D Matrix Stiffness for Maintenance of Cancer Stem Cells Is Dependent on Tissue Origin of Cancer Cells. *PLOS ONE* 2015;10:e0132377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132377>.
- Jagiella N, Müller B, Müller M, Vignon-Clementel IE, Drasdo D. Inferring Growth Control

- Mechanisms in Growing Multi-cellular Spheroids of NSCLC Cells from Spatial-Temporal Image Data. *PLoS Comput Biol* 2016;12:e1004412. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004412>.
- Jeon O, Bouhadir KH, Mansour JM, Alsberg E. Biomaterials Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties 2009:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.034>.
- Jin B-J, Battula S, Zachos N, Kovbasnjuk O, Fawlke-Abel J, In J, et al. Microfluidics platform for measurement of volume changes in immobilized intestinal enteroids. *Biomicrofluidics* 2014;8:024106. <https://doi.org/10.1063/1.4870400>.
- Jin H, Lei J. A mathematical model of cell population dynamics with autophagy response to starvation. *Math Biosci* 2014;258:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2014.08.014>.
- Johnson KL, Kendall K, Roberts AD. Surface energy and the contact of elastic solids. *Proc R Soc Lond Math Phys Sci* 1971;324:301–13. <https://doi.org/10.1098/rspa.1971.0141>.
- Jung W, Boppart SA. Modern Trends in Imaging V: Optical Coherence Tomography for Rapid Tissue Screening and Directed Histological Sectioning. *Anal Cell Pathol* 2012;35:129–43. <https://doi.org/10.1155/2012/757236>.
- Jung Y, Park W, Park H, Lee D-K, Na K. Thermo-sensitive injectable hydrogel based on the physical mixing of hyaluronic acid and Pluronic F-127 for sustained NSAID delivery. *Carbohydr Polym* 2017;156:403–8. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.068>.
- Kaczmarek B, Nadolna K, Owczarek A. The physical and chemical properties of hydrogels based on natural polymers. *Hydrogels Based Nat. Polym.*, Elsevier; 2020, p. 151–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816421-1.00006-9>.
- Karoyo AH, Wilson LD. A Review on the Design and Hydration Properties of Natural Polymer-Based Hydrogels. *Materials* 2021;14:1095. <https://doi.org/10.3390/ma14051095>.
- Katzengold R, Shoham N, Benayahu D, Gefen A. Simulating single cell experiments in mechanical testing of adipocytes. *Biomech Model Mechanobiol* 2015;14:537–47. <https://doi.org/10.1007/s10237-014-0620-6>.
- Ke M-T, Fujimoto S, Imai T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci* 2013;16:1154–61. <https://doi.org/10.1038/nn.3447>.
- Keller PJ. Imaging Morphogenesis: Technological Advances and Biological Insights. *Science* 2013;340:1234168–1234168. <https://doi.org/10.1126/science.1234168>.
- Keller PJ, Schmidt AD, Wittbrodt J, Stelzer EHK. Reconstruction of Zebrafish Early Embryonic Development by Scanned Light Sheet Microscopy. *Science* 2008;322:1065–9. <https://doi.org/10.1126/science.1162493>.
- Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 2003;83:173–80. <https://doi.org/10.1002/bit.10655>.
- Kikuchi A, Kawabuchi M, Sugihara M, Sakurai Y, Okano T. Pulsed dextran release from calcium-alginate gel beads. *J Controlled Release* 1997;47:21–9. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(96\)01612-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(96)01612-4).

- Kilian KA, Bugarija B, Lahn BT, Mrksich M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells 2010. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903269107>.
- Kim D-H, Chambliss AB, Wirtz D. The multi-faceted role of the actin cap in cellular mechanosensation and mechanotransduction. *Soft Matter* 2013;9:5516. <https://doi.org/10.1039/c3sm50798j>.
- Kim J, Koo B-K, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020;21:571–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0259-3>.
- Kim TW, Koo SY, Studer L. Pluripotent Stem Cell Therapies for Parkinson Disease: Present Challenges and Future Opportunities. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:729. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00729>.
- Klein-Nulend J, Bacabac R, Bakker A. Mechanical loading and how it affects bone cells: The role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton. *Eur Cell Mater* 2012;24:278–91. <https://doi.org/10.22203/eCM.v024a20>.
- Klingelhutz AJ, Gourronc FA, Chaly A, Wadkins DA, Burand J, Markan KR, et al. Scaffold-free generation of uniform adipose spheroids for metabolism research and drug discovery. *Sci Rep* 2018;1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19024-z>.
- Koch S, Schwinger C, Kressler J, Heinzen Ch, Rainov NG. Alginate encapsulation of genetically engineered mammalian cells: Comparison of production devices, methods and microcapsule characteristics. *J Microencapsul* 2003;20:303–16. <https://doi.org/10.3109/02652040309178071>.
- Korolev KS, Xavier JB, Gore J. Turning ecology and evolution against cancer. *Nat Rev Cancer* 2014;14:371–80. <https://doi.org/10.1038/nrc3712>.
- Kretzschmar K, Clevers H. Organoids: Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish. *Dev Cell* 2016;38:590–600. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.08.014>.
- Kurashina Y, Tsuchiya M, Sakai A, Maeda T, Heo YJ, Rossi F, et al. Simultaneous crosslinking induces macroscopically phase-separated microgel from a homogeneous mixture of multiple polymers. *Appl Mater Today* 2021;22:100937. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.100937>.
- Kusminski CM, Bickel PE, Scherer PE. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15:639–60. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.75>.
- Ladoux B, Nelson WJ, Yan J, Mège RM. The mechanotransduction machinery at work at *adherens* junctions. *Integr Biol* 2015;7:1109–19. <https://doi.org/10.1039/c5ib00070j>.
- Ladoux B, Nicolas A. Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Rep Prog Phys* 2012;75:116601. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/75/11/116601>.
- Laird AK. Dynamics of Tumor Growth. *Br J Cancer* 1964;18:490–502. <https://doi.org/10.1038/bjc.1964.55>.
- Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 2014;345:1247125. <https://doi.org/10.1126/science.1247125>.
- Lancaster MA, Renner M, Martin C-A, Wenzel D, Bicknell LS, Hurler ME, et al. Cerebral

organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 2013;501:373–9. <https://doi.org/10.1038/nature12517>.

Laurens LML, Wolfrum EJ. Feasibility of Spectroscopic Characterization of Algal Lipids: Chemometric Correlation of NIR and FTIR Spectra with Exogenous Lipids in Algal Biomass. *BioEnergy Res* 2011;4:22–35. <https://doi.org/10.1007/s12155-010-9098-y>.

Le Maout V, Alessandri K, Gurchenkov B, Bertin H, Nassoy P, Sciumè G. Role of mechanical cues and hypoxia on the growth of tumor cells in strong and weak confinement: A dual in vitro–in silico approach. *Sci Adv* 2020;6:eaaz7130. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz7130>.

Leckband DE, de Rooij J. Cadherin Adhesion and Mechanotransduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014;30:291–315. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013212>.

Lee D, Cha C. The Combined Effects of Co-Culture and Substrate Mechanics on 3D Tumor Spheroid Formation within Microgels Prepared via Flow-Focusing Microfluidic Fabrication. *Pharmaceutics* 2018;10:229. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040229>.

Lee D, Greer SE, Kuss MA, An Y, Dudley AT. 3D printed alginate bead generator for high-throughput cell culture. *Biomed Microdevices* 2021;23:22. <https://doi.org/10.1007/s10544-021-00561-4>.

Lee K, Kim C, Young Yang J, Lee H, Ahn B, Xu L, et al. Gravity-oriented microfluidic device for uniform and massive cell spheroid formation. *Biomicrofluidics* 2012;6:014114. <https://doi.org/10.1063/1.3687409>.

Lee Y-H, Petkova AP, Mottillo EP, Granneman JG. In Vivo Identification of Bipotential Adipocyte Progenitors Recruited by  $\beta$ 3-Adrenoceptor Activation and High-Fat Feeding. *Cell Metab* 2012;15:480–91. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.009>.

Leibel RL, Bahary N, Friedman JM. Genetic Variation and Nutrition in Obesity: Approaches to the Molecular Genetics of Obesity 1. In: Simopoulos AP, Childs B, editors. *World Rev. Nutr. Diet.*, vol. 63, S. Karger AG; 1990, p. 90–101. <https://doi.org/10.1159/000418501>.

Lele TP, Sero JE, Matthews BD, Kumar S, Xia S, Montoya-Zavala M, et al. Tools to Study Cell Mechanics and Mechanotransduction. *Methods Cell Biol.*, vol. 83, Elsevier; 2007, p. 441–72. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)83019-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)83019-6).

Lemmo S, Atefi E, Luker GD, Tavana H. Optimization of Aqueous Biphasic Tumor Spheroid Microtechnology for Anti-cancer Drug Testing in 3D Culture. *Cell Mol Bioeng* 2014;7:344–54. <https://doi.org/10.1007/s12195-014-0349-4>.

Li M, Fu T, Yang S, Pan L, Tang J, Chen M, et al. Agarose-based spheroid culture enhanced stemness and promoted odontogenic differentiation potential of human dental follicle cells in vitro. *Vitro Cell Dev Biol - Anim* 2021;57:620–30. <https://doi.org/10.1007/s11626-021-00591-5>.

Li ML, Aggeler J, Farson DA, Hatier C, Hassell J, Bissell MJ. Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84:136–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.1.136>.

Lin R-Z, Chen Y-C, Moreno-Luna R, Khademhosseini A, Melero-Martin JM. Transdermal regulation of vascular network bioengineering using a photopolymerizable methacrylated

gelatin hydrogel. *Biomaterials* 2013;34:6785–96. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.060>.

Liu Y-J, Le Berre M, Lautenschlaeger F, Maiuri P, Callan-Jones A, Heuzé M, et al. Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells. *Cell* 2015;160:659–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.007>.

Lo AT, Mori H, Mott J, Bissell MJ. Constructing Three-Dimensional Models to Study Mammary Gland Branching Morphogenesis and Functional Differentiation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2012;17:103–10. <https://doi.org/10.1007/s10911-012-9251-7>.

Locke M. *Cellular Membranes in Development*. Elsevier; 1964. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-395533-3.X5001-7>.

Loessner D, Meinert C, Kaemmerer E, Martine LC, Yue K, Levett PA, et al. Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms. *Nat Protoc* 2016;11:727–46. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.037>.

Lomakin AJ, Cattin CJ, Cuvelier D, Alraies Z, Molina M, Nader GPF, et al. The nucleus acts as a ruler tailoring cell responses to spatial constraints. *Science* 2020;370:eaba2894. <https://doi.org/10.1126/science.aba2894>.

Lu AX, Oh H, Terrell JL, Bentley WE, Raghavan SR. A new design for an artificial cell: polymer microcapsules with addressable inner compartments that can harbor biomolecules, colloids or microbial species. *Chem Sci* 2017;8:6893–903. <https://doi.org/10.1039/C7SC01335C>.

Lu Y-C, Song W, An D, Kim BJ, Schwartz R, Wu M, et al. Designing compartmentalized hydrogel microparticles for cell encapsulation and scalable 3D cell culture. *J Mater Chem B* 2015;3:353–60. <https://doi.org/10.1039/C4TB01735H>.

Lucio AA, Mongera A, Shelton E, Chen R, Doyle AM, Campàs O. Spatiotemporal variation of endogenous cell-generated stresses within 3D multicellular spheroids. *Sci Rep* 2017;7:12022. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12363-x>.

Lussi J, Falconnet D, Hubbell J, Textor M, Csucs G. Pattern stability under cell culture conditions—A comparative study of patterning methods based on PLL-g-PEG background passivation. *Biomaterials* 2006;27:2534–41. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.11.027>.

Ma M, Chiu A, Sahay G, Doloff JC, Dholakia N, Thakrar R, et al. Core-Shell Hydrogel Microcapsules for Improved Islets Encapsulation. *Adv Healthc Mater* 2013;2:667–72. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200341>.

Malek AM. Hemodynamic Shear Stress and Its Role in Atherosclerosis. *JAMA* 1999;282:2035. <https://doi.org/10.1001/jama.282.21.2035>.

Mao AS, Shin J-W, Mooney DJ. Effects of substrate stiffness and cell-cell contact on mesenchymal stem cell differentiation. *Biomaterials* 2016;98:184–91. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.05.004>.

Marcus JM, Burke RT, Desisto JA, Landesman Y, Orth JD. Longitudinal tracking of single live cancer cells to understand cell cycle effects of the nuclear export inhibitor, selinexor. *Nat Publ Group* 2015:1–14. <https://doi.org/10.1038/srep14391>.

- Mark C, Grundy TJ, Strissel PL, Böhringer D, Grummel N, Gerum R, et al. Collective forces of tumor spheroids in three-dimensional biopolymer networks. *ELife* 2020;9:e51912. <https://doi.org/10.7554/eLife.51912>.
- Marmottant P, Mgharbel A, Kafer J, Audren B, Rieu J-P, Vial J-C, et al. The role of fluctuations and stress on the effective viscosity of cell aggregates. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106:17271–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902085106>.
- Mayhew T. The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. *Exp Physiol* 1991;76:639–65. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1991.sp003533>.
- McAvoy K, Jones D, Thakur RRS. Synthesis and Characterisation of Photocrosslinked poly(ethylene glycol) diacrylate Implants for Sustained Ocular Drug Delivery. *Pharm Res* 2018;35:36. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2298-9>.
- McLaughlin T, Sherman A, Tsao P, Gonzalez O, Yee G, Lamendola C, et al. Enhanced proportion of small adipose cells in insulin-resistant vs insulin-sensitive obese individuals implicates impaired adipogenesis. *Diabetologia* 2007;50:1707–15. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0708-y>.
- Mei L, Espinosa de los Reyes S, Reynolds MJ, Leicher R, Liu S, Alushin GM. Molecular mechanism for direct actin force-sensing by  $\alpha$ -catenin. *ELife* 2020;9:e62514. <https://doi.org/10.7554/eLife.62514>.
- Mekhileri NV, Andrique L, Recher G, Nassoy P, Badon A. Adaptive coherence volume in full-field optical coherence tomography. *OSA Contin* 2021;4:2805. <https://doi.org/10.1364/OSAC.442310>.
- Mertz J. Optical sectioning microscopy with planar or structured illumination. *Nat Methods* 2011;8:811–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1709>.
- Minett T, Tighe B, Lydon M, Rees D. Requirements for cell spreading on polyHEMA coated culture substrates. *Cell Biol Int Rep* 1984;8:151–9. [https://doi.org/10.1016/0309-1651\(84\)90082-1](https://doi.org/10.1016/0309-1651(84)90082-1).
- Minsky M. Microscopy apparatus. US3013467A, 1957.
- Mohammed D, Versaevel M, Bruyère C, Alaimo L, Luciano M, Verduyck E, et al. Innovative Tools for Mechanobiology: Unraveling Outside-In and Inside-Out Mechanotransduction. *Front Bioeng Biotechnol* 2019;7:162. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00162>.
- Montel F, Delarue M, Elgeti J, Malaquin L, Basan M, Risler T, et al. Stress Clamp Experiments on Multicellular Tumor Spheroids. *Phys Rev Lett* 2011a;107:188102. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.107.188102>.
- Montel F, Delarue M, Elgeti J, Malaquin L, Basan M, Risler T, et al. Stress Clamp Experiments on Multicellular Tumor Spheroids 2011b;188102:1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.107.188102>.
- Morch YA. Novel Alginate Microcapsules for Cell Therapy—A Study of the Structure-Function Relationships in Native and Structurally Engineered Alginates. Thèse. Norwegian University of Science and Technology, 2008.
- Morel M, Shynkar V, Galas J-C, Dupin I, Bouzigues C, Studer V, et al. Amplification and

Temporal Filtering during Gradient Sensing by Nerve Growth Cones Probed with a Microfluidic Assay. *Biophys J* 2012;103:1648–56. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.08.040>.

Munevar S, Wang Y, Dembo M. Traction Force Microscopy of Migrating Normal and H-ras Transformed 3T3 Fibroblasts. *Biophys J* 2001;80:1744–57. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76145-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76145-0).

Negrel R, Grimaldi P, Ailhaud G. Establishment of preadipocyte clonal line from epididymal fat pad of ob/ob mouse that responds to insulin and to lipolytic hormones. *Proc Natl Acad Sci* 1978;75:6054–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.12.6054>.

Nguyen TQ, Green DW, Willhite GP, McCool CS. Effect of Composition of a Polyacrylamide-Chromium(III) Acetate Gel on the Magnitude of Gel Dehydration and Disproportionate Permeability Reduction. Days, Tulsa, Oklahoma: SPE; 2004, p. SPE-89404-MS. <https://doi.org/10.2118/89404-MS>.

Nicolas A, Geiger B, Safran SA. Cell mechanosensitivity controls the anisotropy of focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:12520–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403539101>.

Niemelä S-M, Miettinen S, Kontinen Y, Waris T, Kellomäki M, Ashammakhi NA, et al. Fat Tissue: Views on Reconstruction and Exploitation. *J Craniofac Surg* 2007;18:325–35. <https://doi.org/10.1097/scs.0b013e3180333b6a>.

Nougues J, Reyne Y, Dulong JP. Differentiation of rabbit adipocyte precursors in primary culture. *Int J Obes* 1988;12:321–33.

Ohnuki Y, Kurosawa H. Effects of hanging drop culture conditions on embryoid body formation and neuronal cell differentiation using mouse embryonic stem cells: Optimization of culture conditions for the formation of well-controlled embryoid bodies. *J Biosci Bioeng* 2013;115:571–4. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.11.016>.

Ong S-M, Zhang C, Toh Y-C, Kim SH, Foo HL, Tan CH, et al. A gel-free 3D microfluidic cell culture system. *Biomaterials* 2008;29:3237–44. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.022>.

Osborn TM, Hallett PJ, Schumacher JM, Isacson O. Advantages and Recent Developments of Autologous Cell Therapy for Parkinson's Disease Patients. *Front Cell Neurosci* 2020;14:58. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00058>.

Ota H, Miki N. Microfluidic experimental platform for producing size-controlled three-dimensional spheroids. *Sens Actuators Phys* 2011;169:266–73. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2011.03.051>.

Paine CET, Marthews TR, Vogt DR, Purves D, Rees M, Hector A, et al. How to fit nonlinear plant growth models and calculate growth rates: an update for ecologists: *Nonlinear plant growth models*. *Methods Ecol Evol* 2012;3:245–56. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00155.x>.

Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue 2007;8:839–45.

Park HE, Kim D, Koh HS, Cho S, Sung J-S, Kim JY. Real-Time Monitoring of Neural Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Electric Cell-Substrate Impedance Sensing. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:1–8. <https://doi.org/10.1155/2011/485173>.

- Pasqua M, Pereira U, Messina A, de Lartigue C, Vigneron P, Dubart-Kupperschmitt A, et al. HepaRG Self-Assembled Spheroids in Alginate Beads Meet the Clinical Needs for Bioartificial Liver. *Tissue Eng Part A* 2020;26:613–22. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2019.0262>.
- Pawley JB. *Handbook of biological confocal microscopy*. 3rd ed. New York, NY: Springer; 1995.
- Pei F, Jiang J, Bai S, Cao H, Tian L, Zhao Y, et al. Chemical-defined and albumin-free generation of human atrial and ventricular myocytes from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* 2017;19:94–103. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.01.006>.
- Peng T, Liu L, MacLean AL, Wong CW, Zhao W, Nie Q. A mathematical model of mechanotransduction reveals how mechanical memory regulates mesenchymal stem cell fate decisions. *BMC Syst Biol* 2017;11:55. <https://doi.org/10.1186/s12918-017-0429-x>.
- Perez JE, Nagle I, Wilhelm C. Magnetic molding of tumor spheroids: emerging model for cancer screening. *Biofabrication* 2021;13:015018. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/abc670>.
- Pi Q, Maharjan S, Yan X, Liu X, Singh B, Genderen AMV, et al. Digitally Tunable Microfluidic Bioprinting of Multilayered Cannular Tissues 2018;1706913:1–10. <https://doi.org/10.1002/adma.201706913>.
- Piwko W, Olma MH, Held M, Bianco JN, Pedrioli PGA, Hofmann K, et al. RNAi-based screening identifies the Mms22L–Nfkbil2 complex as a novel regulator of DNA replication in human cells. *EMBO J* 2010;29:4210–22. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.304>.
- Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, den Brink S, Geurts V, Beumer J, Clevers H. Establishment and Culture of Human Intestinal Organoids Derived from Adult Stem Cells. *Curr Protoc Immunol* 2020;130. <https://doi.org/10.1002/cpim.106>.
- Poulos SP, Dodson MV, Hausman GJ. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Exp Biol Med* 2010;235:1185–93. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010063>.
- Purschke M, Rubio N, Held KD, Redmond RW. Phototoxicity of Hoechst 33342 in time-lapse fluorescence microscopy. *Photochem Photobiol Sci* 2010;9:1634. <https://doi.org/10.1039/c0pp00234h>.
- Qi L, Li N, Huang R, Song Q, Wang L, Zhang Q, et al. The Effects of Topographical Patterns and Sizes on Neural Stem Cell Behavior. *PLoS ONE* 2013;8:e59022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059022>.
- Qian X, Jacob F, Song MM, Nguyen HN, Song H, Ming G. Generation of human brain region-specific organoids using a miniaturized spinning bioreactor. *Nat Protoc* 2018;13:565–80. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.152>.
- Ravera F, Efeoglu E, Byrne HJ. Monitoring stem cell differentiation using Raman microspectroscopy: chondrogenic differentiation, towards cartilage formation. *The Analyst* 2021;146:322–37. <https://doi.org/10.1039/D0AN01983F>.
- Recher G, Nassoy P, Badon A. Remote scanning for ultra-large field of view in wide-field microscopy and full-field OCT. *Biomed Opt Express* 2020;11:2578. <https://doi.org/10.1364/BOE.383329>.
- Resnick A, Hopfer U. Force-Response Considerations in Ciliary Mechanosensation. *Biophys J* 2007;93:1380–90. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.105007>.

- Richardson DS, Lichtman JW. Clarifying Tissue Clearing. *Cell* 2015;162:246–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.067>.
- Ridone P, Vassalli M, Martinac B. Piezo1 mechanosensitive channels: what are they and why are they important. *Biophys Rev* 2019;11:795–805. <https://doi.org/10.1007/s12551-019-00584-5>.
- Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, et al. Focal Contacts as Mechanosensors. *J Cell Biol* 2001;153:1175–86. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.6.1175>.
- Rodday B, Hirschhaeuser F, Walenta S, Mueller-Klieser W. Semiautomatic Growth Analysis of Multicellular Tumor Spheroids. *J Biomol Screen* 2011;16:1119–24. <https://doi.org/10.1177/1087057111419501>.
- Rondinone CM. Adipocyte-Derived Hormones, Cytokines, and Mediators. *Endocrine* 2006;29:81–90. <https://doi.org/10.1385/ENDO:29:1:81>.
- Rookmaaker MB, Schutgens F, Verhaar MC, Clevers H. Development and application of human adult stem or progenitor cell organoids. *Nat Rev Nephrol* 2015;11:546–54. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.118>.
- Rosell-Llompart J, Grifoll J, Loscertales IG. Electrospays in the cone-jet mode: From Taylor cone formation to spray development. *J Aerosol Sci* 2018;125:2–31. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2018.04.008>.
- Rouillard AD, Berglund CM, Lee JY, Polacheck WJ, Tsui Y, Bonassar LJ, et al. Methods for Photocrosslinking Alginate Hydrogel Scaffolds with High Cell Viability 2011;17. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0582>.
- Ruprecht V, Monzo P, Ravasio A, Yue Z, Makhija E, Strale PO, et al. How cells respond to environmental cues – insights from bio-functionalized substrates. *J Cell Sci* 2016;jcs.196162. <https://doi.org/10.1242/jcs.196162>.
- Sabhachandani P, Sarkar S, Mckenney S, Evens AM, Konry T. PT. *J Controlled Release* 2018:#pagerange#. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.010>.
- Sackett DL, Wolff J. Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces. *Anal Biochem* 1987;167:228–34. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90157-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90157-6).
- Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, et al. Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression. *Cell* 2008;132:487–98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.033>.
- Sanz M, Picazo-Bueno JA, García J, Micó V. Improved quantitative phase imaging in lensless microscopy by single-shot multi-wavelength illumination using a fast convergence algorithm. *Opt Express* 2015;23:21352. <https://doi.org/10.1364/OE.23.021352>.
- Sart S, Tomasi RF-X, Amselem G, Baroud CN. Multiscale cytometry and regulation of 3D cell cultures on a chip. *Nat Commun* 2017;8:469. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00475-x>.
- Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009;459:262–5. <https://doi.org/10.1038/nature07935>.
- Seo S, Su T, Tseng DK, Ozcan A. Lensfree holographic imaging for on-chip cytometry and

- diagnostics † 2009:777–87. <https://doi.org/10.1039/b813943a>.
- Shetty SC, Yandrapalli N, Pinkwart K, Krafft D, Vidakovic-Koch T, Ivanov I, et al. Directed Signaling Cascades in Monodisperse Artificial Eukaryotic Cells. *ACS Nano* 2021;15:15656–66. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04219>.
- Shoham N, Gefen A. The influence of mechanical stretching on mitosis, growth, and adipose conversion in adipocyte cultures. *Biomech Model Mechanobiol* 2012a;11:1029–45. <https://doi.org/10.1007/s10237-011-0371-6>.
- Shoham N, Gefen A. Mechanotransduction in adipocytes. *J Biomech* 2012b;45:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2011.10.023>.
- Shoham N, Girshovitz P, Katzengold R, Shaked NT, Benayahu D, Gefen A. Adipocyte Stiffness Increases with Accumulation of Lipid Droplets. *Biophys J* 2014;106:1421–31. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.01.045>.
- Shoham N, Levy A, Shabshin N, Benayahu D, Gefen A. A multiscale modeling framework for studying the mechanobiology of sarcopenic obesity. *Biomech Model Mechanobiol* 2017;16:275–95. <https://doi.org/10.1007/s10237-016-0816-z>.
- Shoham N, Mor-Yossef Moldovan L, Benayahu D, Gefen A. Multiscale Modeling of Tissue-Engineered Fat: Is There a Deformation-Driven Positive Feedback Loop in Adipogenesis? *Tissue Eng Part A* 2015;21:1354–63. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0505>.
- Siedentopf, Zsigmondy. Ueber Sichtbarmachung ultramikroskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser. *J Phys Théorique Appliquée* 1903;2:692–702. <https://doi.org/10.1051/jphysstap:019030020069201>.
- Simoneau CR, Ott M. Modeling Multi-organ Infection by SARS-CoV-2 Using Stem Cell Technology. *Cell Stem Cell* 2020;27:859–68. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.11.012>.
- Sinha B, Köster D, Ruez R, Gonnord P, Bastiani M, Abankwa D, et al. Cells Respond to Mechanical Stress by Rapid Disassembly of Caveolae. *Cell* 2011;144:402–13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.031>.
- Smith SJ, Wilson M, Ward JH, Rahman CV, Peet AC, Macarthur DC, et al. Recapitulation of Tumor Heterogeneity and Molecular Signatures in a 3D Brain Cancer Model with Decreased Sensitivity to Histone Deacetylase Inhibition. *PLoS ONE* 2012;7:e52335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052335>.
- Song H, O'Connor KC, Papadopoulos KD, Jansen DA. Differentiation Kinetics of *in Vitro* 3T3-L1 Preadipocyte Cultures. *Tissue Eng* 2002;8:1071–81. <https://doi.org/10.1089/107632702320934164>.
- Sonker AK, Rathore K, Nagarale RK, Verma V. Crosslinking of Polyvinyl Alcohol (PVA) and Effect of Crosslinker Shape (Aliphatic and Aromatic) Thereof. *J Polym Environ* 2018;26:1782–94. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-1077-3>.
- Soofi SS, Last JA, Liliensiek SJ, Nealey PF, Murphy CJ. The elastic modulus of Matrigel™ as determined by atomic force microscopy. *J Struct Biol* 2009;167:216–9. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.05.005>.
- Souza GR, Molina JR, Raphael RM, Ozawa MG, Stark DJ, Levin CS, et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat Nanotechnol* 2010;5:291–6.

<https://doi.org/10.1038/nnano.2010.23>.

Streichan SJ, Hoerner CR, Schneidt T, Holzer D, Hufnagel L. Spatial constraints control cell proliferation in tissues. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111:5586–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323016111>.

Su T-W, Seo S, Erlinger A, Ozcan A. High-throughput lensfree imaging and characterization of a heterogeneous cell solution on a chip. *Biotechnol Bioeng* 2009;102:856–68. <https://doi.org/10.1002/bit.22116>.

Suntornnond R, Yong E, Tan S, An J, Chua CK. A highly printable and biocompatible hydrogel composite for direct printing of soft and perfusable vasculature-like structures. *Sci Rep* 2017:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17198-0>.

Supatto W, Truong TV, Débarre D, Beaurepaire E. Advances in multiphoton microscopy for imaging embryos. *Curr Opin Genet Dev* 2011;21:538–48. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.08.003>.

Sutherland RM. Cell and Environment Interactions in Tumor Microregions: The Multicell Spheroid Model. *Science* 1988;240:177–84. <https://doi.org/10.1126/science.2451290>.

Sutherland RM, Inch WR, McCredie JA, Kruuv J. A Multi-component Radiation Survival Curve Using an *in Vitro* Tumour Model. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1970;18:491–5. <https://doi.org/10.1080/09553007014551401>.

Suvorova II, Katolikova NV, Pospelov VA. New Insights into Cell Cycle Regulation and DNA Damage Response in Embryonic Stem Cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, vol. 299, Elsevier; 2012, p. 161–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394310-1.00004-7>.

Svoboda E, McKinnon MC, Levine B. The functional neuroanatomy of autobiographical memory: A meta-analysis. *Neuropsychologia* 2006;44:2189–208. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2006.05.023>.

Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PCDP, Pinter J, et al. Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation. *Science* 2013;341:1240104. <https://doi.org/10.1126/science.1240104>.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 2007;131:861–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 2006;126:663–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.

Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A. Biomaterials Synthesis , properties , and biomedical applications of gelatin methacryloyl ( GelMA ) hydrogels 2015;73:254–71. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.045>.

Tanaka H, Matsumura M, Veliky IA. Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng* 1984;26:53–8. <https://doi.org/10.1002/bit.260260111>.

Tang Q-Q, Otto TC, Lane MD. CCAAT/enhancer-binding protein is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:850–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337434100>.

- Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, et al. White Fat Progenitor Cells Reside in the Adipose Vasculature. *Science* 2008;322:583–6. <https://doi.org/10.1126/science.1156232>.
- Teleken JT, Robazza W da S, Gomes G de A. Mathematical modeling of microbial growth in milk. *Food Sci Technol Camp* 2011;31:891–6. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000400010>.
- Tomba C, Migdal C, Fuard D, Villard C, Nicolas A. Glial cell mechanosensitivity is reversed by adhesion cues. *Biophysics*; 2019. <https://doi.org/10.1101/865303>.
- Tomotika S. On the Instability of a Cylindrical Thread of a Viscous Liquid Surrounded by Another Viscous Fluid 1935. <https://doi.org/10.1098/rspa.1935.0104>.
- Träber N, Uhlmann K, Girardo S, Kesavan G, Wagner K, Friedrichs J, et al. Polyacrylamide Bead Sensors for in vivo Quantification of Cell-Scale Stress in Zebrafish Development. *Sci Rep* 2019;9:17031. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53425-6>.
- Trushko A, Di Meglio I, Merzouki A, Blanch-Mercader C, Abuhattum S, Guck J, et al. Buckling of an Epithelium Growing under Spherical Confinement. *Dev Cell* 2020;54:655–668.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.07.019>.
- Tung Y-C, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa Y, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *The Analyst* 2011;136:473–8. <https://doi.org/10.1039/C0AN00609B>.
- Tuveson D, Clevers H. Cancer modeling meets human organoid technology. *Science* 2019;364:952–5. <https://doi.org/10.1126/science.aaw6985>.
- Uludag H, De Vos P, Tresco PA. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;42:29–64. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00053-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00053-3).
- Utada AS, Fernandez-Nieves A, Stone HA, Weitz DA. Dripping to Jetting Transitions in Coflowing Liquid Streams. *Phys Rev Lett* 2007;99:094502. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.99.094502>.
- Van Den Bulcke AI, Bogdanov B, De Rooze N, Schacht EH, Cornelissen M, Berghmans H. Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels. *Biomacromolecules* 2000;1:31–8. <https://doi.org/10.1021/bm990017d>.
- Velasco V, Shariati SA, Esfandyarpour R. Microtechnology-based methods for organoid models. *Microsyst Nanoeng* 2020;6. <https://doi.org/10.1038/s41378-020-00185-3>.
- Verhulst P-F. Notice sur la loi que la population poursuit dans son accroissement. *Corresp. Mathématique Phys.*, vol. 10, 1838.
- Versaevel M, Alaimo L, Seveau V, Luciano M, Mohammed D, Bruyère C, et al. Collective migration during a gap closure in a two-dimensional haptotactic model. *Sci Rep* 2021;11:5811. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84998-w>.
- Vining KH, Mooney DJ. Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017;18:728–42. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.108>.
- Vukicevic S, Kleinman HK, Luyten FP, Roberts AB, Roche NS, Reddi AH. Identification of multiple active growth factors in basement membrane matrigel suggests caution in

interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res* 1992;202:1–8. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(92\)90397-Q](https://doi.org/10.1016/0014-4827(92)90397-Q).

Vyas V, Solomon M, D'Souza GGM, Huey BD. Nanomechanical Analysis of Extracellular Matrix and Cells in Multicellular Spheroids. *Cell Mol Bioeng* 2019;12:203–14. <https://doi.org/10.1007/s12195-019-00577-0>.

Wang H, Liu Haitao, Liu Hui, Su W, Chen W, Qin J. One-Step Generation of Core – Shell Gelatin Methacrylate ( GelMA ) Microgels Using a Droplet Microfluidic System 2019;1800632:1–10. <https://doi.org/10.1002/admt.201800632>.

Wang S, Liang W, Dong Z, Lee VGB, Li WJ. Fabrication of Micrometer- and Nanometer-Scale Polymer Structures by Visible Light Induced Dielectrophoresis (DEP) Force. *Micromachines* 2011;2:431–42. <https://doi.org/10.3390/mi2040431>.

Wang Y, Song J, Liu X, Liu J, Zhang Q, Yan X, et al. Multiple Effects of Mechanical Stretch on Myogenic Progenitor Cells. *Stem Cells Dev* 2020;29:336–52. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0286>.

Wann AKT, Zuo N, Haycraft CJ, Jensen CG, Poole CA, McGlashan SR, et al. Primary cilia mediate mechanotransduction through control of ATP-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in compressed chondrocytes. *FASEB J* 2012;26:1663–71. <https://doi.org/10.1096/fj.11-193649>.

Wiggins P, Phillips R. Analytic models for mechanotransduction: Gating a mechanosensitive channel. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:4071–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307804101>.

Williams SK, Touroo JS, Church KH, Hoying JB. Encapsulation of Adipose Stromal Vascular Fraction Cells in Alginate Hydrogel Spheroids Using a Direct-Write Three-Dimensional Printing System. *BioResearch Open Access* 2013;2:448–54. <https://doi.org/10.1089/biores.2013.0046>.

Winickoff DE, Saha K, Graff GD. Opening stem cell research and development: a policy proposal for the management of data, intellectual property, and ethics. *Yale J Health Policy Law Ethics* 2009;9:52–127.

Wu C, Zhu Y, Chang J, Zhang Y, Xiao Y. Bioactive inorganic-materials/alginate composite microspheres with controllable drug-delivery ability. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010;9999B:NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31621>.

Wu P-H, Aroush DR-B, Asnacios A, Chen W-C, Dokukin ME, Doss BL, et al. A comparison of methods to assess cell mechanical properties. *Nat Methods* 2018;15:491–8. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0015-1>.

Wu Q, Yang C, Liu G, Xu W, Zhu Z, Si T, et al. Multiplex coaxial flow focusing for producing multicompartiment Janus microcapsules with tunable material compositions and structural characteristics. *Lab Chip* 2017;17:3168–75. <https://doi.org/10.1039/C7LC00769H>.

Wu Y, Xiang Y, Fang J, Li X, Lin Z, Dai G, et al. The influence of the stiffness of GelMA substrate on the outgrowth of PC12 cells. *Biosci Rep* 2019;39:BSR20181748. <https://doi.org/10.1042/BSR20181748>.

Xiao S, Zhao T, Wang J, Wang C, Du J, Ying L, et al. Gelatin Methacrylate (GelMA)-Based Hydrogels for Cell Transplantation: an Effective Strategy for Tissue Engineering. *Stem Cell Rev Rep* 2019;15:664–79. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09893-4>.

- Xiao W, He J, Nichol JW, Wang L, Hutson CB, Wang B, et al. Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels. *Acta Biomater* 2011;7:2384–93. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.01.016>.
- Xie J, Lim LK, Phua Y, Hua J, Wang C-H. Electrohydrodynamic atomization for biodegradable polymeric particle production. *J Colloid Interface Sci* 2006;302:103–12. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.06.037>.
- Xu F, Xu L, Wang Q, Ye Z, Zhou Y, Tan W-S. 3D Dynamic Culture of Rabbit Articular Chondrocytes Encapsulated in Alginate Gel Beads Using Spinner Flasks for Cartilage Tissue Regeneration. *BioMed Res Int* 2014;2014:1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/539789>.
- Yamaoka M, Maeda N, Takayama Y, Sekimoto R, Tsushima Y, Matsuda K, et al. Adipose Hypothermia in Obesity and Its Association with Period Homolog 1, Insulin Sensitivity, and Inflammation in Fat. *PLoS ONE* 2014;9:e112813. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112813>.
- Yan J, Yao M, Goult BT, Sheetz MP. Talin Dependent Mechanosensitivity of Cell Focal Adhesions. *Cell Mol Bioeng* 2015;8:151–9. <https://doi.org/10.1007/s12195-014-0364-5>.
- Yang MT, Sniadecki NJ, Chen CS. Geometric Considerations of Micro- to Nanoscale Elastomeric Post Arrays to Study Cellular Traction Forces. *Adv Mater* 2007;19:3119–23. <https://doi.org/10.1002/adma.200701956>.
- Yang X, Cai X, Wang J, Tang H, Yuan Q, Gong P, et al. Mechanical stretch inhibits adipogenesis and stimulates osteogenesis of adipose stem cells: Adipo-osteo-differentiation of ASCs by mechanics. *Cell Prolif* 2012;45:158–66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2011.00802.x>.
- Yao M, Goult BT, Klapholz B, Hu X, Toseland CP, Guo Y, et al. The mechanical response of talin. *Nat Commun* 2016;7:11966. <https://doi.org/10.1038/ncomms11966>.
- Yoon HJ, Shin SR, Cha JM, Lee S-H, Kim J-H, Do JT, et al. Cold Water Fish Gelatin Methacryloyl Hydrogel for Tissue Engineering Application. *PLOS ONE* 2016;11:e0163902. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163902>.
- Young DA, Choi YS, Engler AJ, Christman KL. Stimulation of adipogenesis of adult adipose-derived stem cells using substrates that mimic the stiffness of adipose tissue. *Biomaterials* 2013;34:8581–8. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.103>.
- Yu Y, Al-Mansoori L, Opas M. Optimized osteogenic differentiation protocol from R1 mouse embryonic stem cells in vitro. *Differentiation* 2015;89:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2014.12.003>.
- Yuan Y, Gao J, Ogawa R. Mechanobiology and Mechanotherapy of Adipose Tissue-Effect of Mechanical Force on Fat Tissue Engineering: *Plast Reconstr Surg - Glob Open* 2015;3:e578. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000000564>.
- Zerjatke T, Gak IA, Kirova D, Fuhrmann M, Daniel K, Gonciarz M, et al. Quantitative Cell Cycle Analysis Based on an Endogenous All-in-One Reporter for Cell Tracking and Classification. *Cell Rep* 2017;19:1953–66. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.022>.
- Zhang K, Xiao X, Wang X, Fan Y, Li X. Topographical patterning: characteristics of current processing techniques, controllable effects on material properties and co-cultured cell fate,

updated applications in tissue engineering, and improvement strategies. *J Mater Chem B* 2019;7:7090–109. <https://doi.org/10.1039/C9TB01682A>.

Zhang X, Huk DJ, Wang Q, Lincoln J, Zhao Y. A microfluidic shear device that accommodates parallel high and low stress zones within the same culturing chamber. *Biomicrofluidics* 2014;8:054106. <https://doi.org/10.1063/1.4894783>.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425–32. <https://doi.org/10.1038/372425a0>.

Zhao G, Liu X, Zhu K, He X. Hydrogel Encapsulation Facilitates Rapid-Cooling Cryopreservation of Stem Cell-Laden Core-Shell Microcapsules as Cell-Biomaterial Constructs. *Adv Healthc Mater* 2017;6:1700988. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700988>.

Zhou J, Chiu MC, Li C, Liu X, Zhao X, Wang D, et al. Human airway organoids model SARS-CoV-2 high infectiousness and evasion of interferon response. In Review; 2020. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-67556/v1>.

Zhou J, Su J, Fu X, Zheng L, Yin Z. Microfluidic device for primary tumor spheroid isolation. *Exp Hematol Oncol* 2017;6:22. <https://doi.org/10.1186/s40164-017-0084-3>.

Zhu B, Yin H. Alginate lyase: Review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications. *Bioengineered* 2015;6:125–31. <https://doi.org/10.1080/21655979.2015.1030543>.

Zipfel WR, Williams RM, Webb WW. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol* 2003;21:1369–77. <https://doi.org/10.1038/nbt899>.

Agarwal P, Choi JK, Huang H, Zhao S, Dumbleton J, Li J, et al. A Biomimetic Core-Shell Platform for Miniaturized 3D Cell and Tissue Engineering. *Part Part Syst Charact* 2015;32:809–16. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201500025>.

Agarwal P, Zhao S, Bielecki P, Rao W, Choi JK, Zhao Y, et al. One-step microfluidic generation of pre-hatching embryo-like core-shell microcapsules for miniaturized 3D culture of pluripotent stem cells. *Lab Chip* 2013;13:4525. <https://doi.org/10.1039/c3lc50678a>.

Aggeler J, Park CS, Bissell MJ. Regulation of Milk Protein and Basement Membrane Gene Expression: The Influence of the Extracellular Matrix. *J Dairy Sci* 1988;71:2830–42. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79879-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79879-3).

Alessandri K. The Cellular Capsules technology And its applications to investigate model tumor progression and to engineer tissues in vitro. Thèse. Université Paris Descartes, 2013.

Alessandri K, Andrique L, Feyeux M, Bikfalvi A, Nassoy P, Recher G. All-in-one 3D printed microscopy chamber for multidimensional imaging, the UniverSlide. *Sci Rep* 2017;7:42378. <https://doi.org/10.1038/srep42378>.

Alessandri K, Feyeux M, Gurchenkov B, Delgado C, Trushko A, Krause KH, et al. A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture

and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC). *Lab Chip* 2016;16:1593–604. <https://doi.org/10.1039/c6lc00133e>.

Alessandri K, Sarangi BR, Gurchenkov VV, Sinha B, Kiessling TR, Fetler L, et al. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110:14843–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309482110>.

Allier CP, Kesavan SV, Cioni O, Momey F, Bordy T, Hervé L, et al. Lensfree video microscopy: High throughput monitoring and cell tracking of 2D cell cultures. *Opt InfoBase Conf Pap* 2014;9536:1–10. <https://doi.org/10.1117/12.2183468>.

Andrique L, Recher G, Alessandri K, Pujol N, Feyeux M, Bon P, et al. A model of guided cell self-organization for rapid and spontaneous formation of functional vessels. *Sci Adv* 2019;5:eaau6562. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau6562>.

Annabi N, Tamayol A, Uquillas JA, Akbari M, Bertassoni LE, Cha C, et al. 25th Anniversary Article: Rational Design and Applications of Hydrogels in Regenerative Medicine. *Adv Mater* 2014;26:85–124. <https://doi.org/10.1002/adma.201303233>.

Antonica F, Kasprzyk DF, Opitz R, Iacovino M, Liao X-H, Dumitrescu AM, et al. Generation of functional thyroid from embryonic stem cells. *Nature* 2012;491:66–71. <https://doi.org/10.1038/nature11525>.

Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, et al. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* 2003;421:268–72. <https://doi.org/10.1038/nature01279>.

Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromol Biosci* 2006;6:623–33. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600069>.

Báez GD, Piccirilli GN, Ballerini GA, Frattini A, Busti PA, Verdini RA, et al. Physicochemical Characterization of a Heat Treated Calcium Alginate Dry Film Prepared with Chicken Stock: Heated film of alginate-chicken stock.... *J Food Sci* 2017;82:945–51. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13658>.

Bajpai SK, Sharma S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> ions. *React Funct Polym* 2004;59:129–40. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2004.01.002>.

Beaurepaire E, Boccara AC, Lebec M, Blanchot L, Saint-Jalmes H. Full-field optical coherence microscopy. *Opt Lett* 1998;23:244. <https://doi.org/10.1364/OL.23.000244>.

Ben-Or Frank M, Shoham N, Benayahu D, Gefen A. Effects of accumulation of lipid droplets on load transfer between and within adipocytes. *Biomech Model Mechanobiol* 2015;14:15–28. <https://doi.org/10.1007/s10237-014-0582-8>.

Bergmann RB, Bill A. On the origin of logarithmic-normal distributions: An analytical derivation, and its application to nucleation and growth processes. *J Cryst Growth* 2008;310:3135–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2008.03.034>.

Boppart SA, Bouma BE, Brezinski ME, Tearney GJ, Fujimoto JG. Imaging developing neural morphology using optical coherence tomography. *J Neurosci Methods* 1996;70:65–72. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(96\)00104-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(96)00104-5).

- Bremond N, Santanach-Carreras E, Chu LY, Bibette J. Formation of liquid-core capsules having a thin hydrogel membrane: Liquid pearls. *Soft Matter* 2010;6:2484–8. <https://doi.org/10.1039/b923783f>.
- Brú A, Pastor JM, Fernaud I, Brú I, Melle S, Berenguer C. Super-Rough Dynamics on Tumor Growth. *Phys Rev Lett* 1998;81:4008–11. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.81.4008>.
- Brugués A, Anon E, Conte V, Veldhuis JH, Gupta M, Colombelli J, et al. Forces driving epithelial wound healing. *Nat Phys* 2014;10:683–90. <https://doi.org/10.1038/nphys3040>.
- Bush M, Alhanshali BM, Qian S, Stanley CB, Heller WT, Matsui T, et al. An ensemble of flexible conformations underlies mechanotransduction by the cadherin–catenin adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci* 2019;116:21545–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911489116>.
- Calder A, Roth-albin I, Bhatia S, Pilquil C, Lee JH, Bhatia M, et al. Lengthened G1 Phase Indicates Differentiation Status in Human Embryonic Stem Cells 2013;22. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0168>.
- Caliari SR, Burdick JA. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Methods* 2016;13:405–14. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>.
- Campàs O, Mammoto T, Hasso S, Sperling RA, O’Connell D, Bischof AG, et al. Quantifying cell-generated mechanical forces within living embryonic tissues. *Nat Methods* 2013;11:183–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2761>.
- Castro-Muñozledo F, Beltrán-Langarica A, Kuri-Harcuch W. Commitment of 3T3-F442A cells to adipocyte differentiation takes place during the first 24–36 h after adipogenic stimulation: TNF- $\alpha$  inhibits commitment. *Exp Cell Res* 2003;284:161–70. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(02\)00036-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(02)00036-8).
- Cavaliere F, Miano F, D’Antona P, Paradossi G. Study of Gelling Behavior of Poly(vinyl alcohol)-Methacrylate for Potential Utilizations in Tissue Replacement and Drug Delivery. *Biomacromolecules* 2004;5:2439–46. <https://doi.org/10.1021/bm049654g>.
- Centonze VE, White JG. Multiphoton Excitation Provides Optical Sections from Deeper within Scattering Specimens than Confocal Imaging. *Biophys J* 1998;75:2015–24. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77643-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77643-X).
- Chan V, Zorlutuna P, Jeong JH, Kong H, Bashir R. Three-dimensional photopatterning of hydrogels using stereolithography for long-term cell encapsulation. *Lab Chip* 2010;10:2062. <https://doi.org/10.1039/c004285d>.
- Chaudhuri O, Gu L, Klumpers D, Darnell M, Bencherif SA, Weaver JC, et al. Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity. *Nat Mater* 2016;15:326–34. <https://doi.org/10.1038/nmat4489>.
- Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric Control of Cell Life and Death. *Science* 1997;276:1425–8. <https://doi.org/10.1126/science.276.5317.1425>.
- Chen, Tang, Wang, Zhao, Chen, Zhu. Applications of Hydrogels with Special Physical Properties in Biomedicine. *Polymers* 2019;11:1420. <https://doi.org/10.3390/polym11091420>.
- Chen Y-H, Peng C-C, Tung Y-C. Flip channel: A microfluidic device for uniform-sized embryoid body formation and differentiation. *Biomicrofluidics* 2015;9:054111. <https://doi.org/10.1063/1.4931638>.

- Cheng B, Lin M, Huang G, Li Y, Ji B, Genin GM, et al. Cellular mechanosensing of the biophysical microenvironment: A review of mathematical models of biophysical regulation of cell responses. *Phys Life Rev* 2017;22–23:88–119. <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2017.06.016>.
- Cheng G, Tse J, Jain RK, Munn LL. Micro-Environmental Mechanical Stress Controls Tumor Spheroid Size and Morphology by Suppressing Proliferation and Inducing Apoptosis in Cancer Cells. *PLoS ONE* 2009;4:e4632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004632>.
- Cho S, Irianto J, Discher DE. Mechanosensing by the nucleus: From pathways to scaling relationships. *J Cell Biol* 2017;216:305–15. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610042>.
- Choquet D, Felsenfeld DP, Sheetz MP. Extracellular Matrix Rigidity Causes Strengthening of Integrin–Cytoskeleton Linkages. *Cell* 1997;88:39–48. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81856-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81856-5).
- Chung K, Wallace J, Kim S, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, et al. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 2013;497:332–7. <https://doi.org/10.1038/nature12107>.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005;46:2347–55. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500294-JLR200>.
- Cooper MS, Hardin WR, Petersen TW, Cattolico RA. Visualizing “green oil” in live algal cells. *J Biosci Bioeng* 2010;109:198–201. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.08.004>.
- Costăchel O, Fadei L, Badea E. Tumor cell suspension culture on non adhesive substratum. *Z Für Krebsforsch* 1969;72:24–31. <https://doi.org/10.1007/BF00524788>.
- Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, et al. Piezo1 and Piezo2 Are Essential Components of Distinct Mechanically Activated Cation Channels. *Science* 2010;330:55–60. <https://doi.org/10.1126/science.1193270>.
- Cruz-Acuña R, Quirós M, Huang S, Siuda D, Spence JR, Nusrat A, et al. PEG-4MAL hydrogels for human organoid generation, culture, and in vivo delivery. *Nat Protoc* 2018;13:2102–19. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0036-3>.
- Cukierman E. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science* 2001;294:1708–12. <https://doi.org/10.1126/science.1064829>.
- Dahl KN, Ribeiro AJS, Lammerding J. Nuclear Shape, Mechanics, and Mechanotransduction. *Circ Res* 2008;102:1307–18. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.173989>.
- Declercq H, Vertenten G, Lippens E, Swennen I, Girone J, Vlamincq L, et al. Cell survival and proliferation after encapsulation in a chemically modified Pluronic F127 hydrogel 2011;27:828–39. <https://doi.org/10.1177/0885328211427774>.
- Delarue M, Montel F, Caen O, Elgeti J, Siaugue J-M, Vignjevic D, et al. Mechanical Control of Cell flow in Multicellular Spheroids. *Phys Rev Lett* 2013;110:138103. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.110.138103>.
- Delarue M, Montel F, Vignjevic D, Prost J, Joanny J-F, Cappello G. Compressive Stress Inhibits Proliferation in Tumor Spheroids through a Volume Limitation. *Biophys J* 2014;107:1821–8. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.08.031>.

Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science* 1990;248:73–6. <https://doi.org/10.1126/science.2321027>.

Discher DE, Janmey P, Wang Y. Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science* 2005;310:1139–43. <https://doi.org/10.1126/science.1116995>.

Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells. *Science* 2009;324:1673–7. <https://doi.org/10.1126/science.1171643>.

Doi D, Magotani H, Kikuchi T, Ikeda M, Hiramatsu S, Yoshida K, et al. Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease. *Nat Commun* 2020;11:3369. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17165-w>.

Dolega ME, Delarue M, Ingremeau F, Prost J, Delon A, Cappello G. Cell-like pressure sensors reveal increase of mechanical stress towards the core of multicellular spheroids under compression. *Nat Commun* 2017;8:14056. <https://doi.org/10.1038/ncomms14056>.

Dou Q, Abdul Karim A, Loh X. Modification of Thermal and Mechanical Properties of PEG-PPG-PEG Copolymer (F127) with MA-POSS. *Polymers* 2016;8:341. <https://doi.org/10.3390/polym8090341>.

Draget KI, Smidsrød O, Skjåk-Bræk G. Alginates from Algae. In: Steinbüchel A, editor. *Biopolym. Online*. 1st ed., Wiley; 2002. <https://doi.org/10.1002/3527600035.bpol6008>.

Drasdo D, Hoehme S, Block M. On the Role of Physics in the Growth and Pattern Formation of Multi-Cellular Systems : What can we Learn from Individual-Cell Based Models ? 2007;128. <https://doi.org/10.1007/s10955-007-9289-x>.

Dubois A, Vabre L, Boccara A-C, Beaufrepaire E. High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope. *Appl Opt* 2002;41:805. <https://doi.org/10.1364/AO.41.000805>.

Eggers J, Villermaux E. *Physics of liquid jets* 2008;71. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/71/3/036601>.

Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 2011;472:51–6. <https://doi.org/10.1038/nature09941>.

Elbadawi M, Efferth T. Organoids of human airways to study infectivity and cytopathy of SARS-CoV-2. *Lancet Respir Med* 2020;8:e55–6. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30238-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30238-1).

Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 2006;126:677–89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>.

Erickson HP. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biol Proced Online* 2009;11:32–51. <https://doi.org/10.1007/s12575-009-9008-x>.

Ernst AU, Wang L-H, Ma M. Islet encapsulation. *J Mater Chem B* 2018;6:6705–22. <https://doi.org/10.1039/C8TB02020E>.

Evans E. Probing the Relation Between Force—Lifetime—and Chemistry in Single Molecular Bonds. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2001;30:105–28.

<https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.30.1.105>.

Fairbanks BD, Schwartz MP, Bowman CN, Anseth KS. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility. *Biomaterials* 2009;30:6702–7. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.08.055>.

Fatafta H, Khaled M, Sayyed-Ahmad A, Strodel B. Amyloid- $\beta$  peptide dimers undergo a random coil to  $\beta$ -sheet transition in the aqueous phase but not at the neuronal membrane. *Biophysics*; 2021. <https://doi.org/10.1101/2020.12.31.424964>.

Fattahi P, Rahimian A, Slama MQ, Gwon K, Gonzalez-Suarez AM, Wolf J, et al. Core-shell hydrogel microcapsules enable formation of human pluripotent stem cell spheroids and their cultivation in a stirred bioreactor. *Sci Rep* 2021;11:7177. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85786-2>.

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization-principles and practice. *Mass Spectrom Rev* 1990;9:37–70. <https://doi.org/10.1002/mas.1280090103>.

Fertah M, Belfkira A, Dahmane E montassir, Taourirte M, Brouillette F. Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed. *Arab J Chem* 2017;10:S3707–14. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.003>.

Fink J, Carpi N, Betz T, Bétard A, Chebah M, Azioune A, et al. External forces control mitotic spindle positioning. *Nat Cell Biol* 2011;13:771–8. <https://doi.org/10.1038/ncb2269>.

Fowler SD, Greenspan P. Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O. *J Histochem Cytochem* 1985;33:833–6. <https://doi.org/10.1177/33.8.4020099>.

Freyer JP, Sutherland RM. A reduction in the in situ rates of oxygen and glucose consumption of cells in EMT6/Ro spheroids during growth. *J Cell Physiol* 1985;124:516–24. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041240323>.

Friedman JM, Leibel RL, Siegel DS, Walsh J, Bahary N. Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics* 1991;11:1054–62. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90032-A](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90032-A).

Fu C-Y, Tseng S-Y, Yang S-M, Hsu L, Liu C-H, Chang H-Y. A microfluidic chip with a U-shaped microstructure array for multicellular spheroid formation, culturing and analysis. *Biofabrication* 2014;6:015009. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/1/015009>.

Gantner CW, Cota-Coronado A, Thompson LH, Parish CL. An Optimized Protocol for the Generation of Midbrain Dopamine Neurons under Defined Conditions. *STAR Protoc* 2020;1:100065. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100065>.

Gao C, Xiong W, Zhang Y, Yuan W, Wu Q. Rapid quantitation of lipid in microalgae by time-domain nuclear magnetic resonance. *J Microbiol Methods* 2008;75:437–40. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.019>.

Garten A, Schuster S, Kiess W. The Insulin-Like Growth Factors in Adipogenesis and Obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2012;41:283–95. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2012.04.011>.

Gilleron J, Goudon T, Lagoutière F, Martin H, Mauroy B, Millet P, et al. Modeling and analysis of adipocytes dynamic with a differentiation process. *ESAIM Proc Surv* 2019;2019:1–10.

- Gjorevski N, Sachs N, Manfrin A, Giger S, Bragina ME, Ordóñez-Morán P, et al. Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature* 2016;539:560–4. <https://doi.org/10.1038/nature20168>.
- Gong X, Lin C, Cheng J, Su J, Zhao H, Liu T, et al. Generation of Multicellular Tumor Spheroids with Microwell-Based Agarose Scaffolds for Drug Testing. *PLOS ONE* 2015;10:e0130348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130348>.
- Gräf R, Rietdorf J, Zimmermann T. Live Cell Spinning Disk Microscopy. In: Rietdorf J, editor. *Microsc. Tech.*, vol. 95, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005, p. 57–75. <https://doi.org/10.1007/b102210>.
- Green H, Kehinde O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 1976;7:105–13. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(76\)90260-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(76)90260-9).
- Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 1975;5:19–27. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(75\)90087-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(75)90087-2).
- Greggio C, De Franceschi F, Figueiredo-Larsen M, Gobaa S, Ranga A, Semb H, et al. Artificial three-dimensional niches deconstruct pancreas development *in vitro*. *Development* 2013;140:4452–62. <https://doi.org/10.1242/dev.096628>.
- Grégoire F, Todoroff G, Hauser N, Remacle C. The stroma-vascular fraction of rat inguinal and epididymal adipose tissue and the adipoconversion of fat cell precursors in primary culture. *Biol Cell* 1990;69:215–22. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(90\)90348-7](https://doi.org/10.1016/0248-4900(90)90348-7).
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol Rev* 1998;78:783–809. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.3.783>.
- Guevorkian K, Colbert M-J, Durth M, Dufour S, Brochard-Wyart F. Aspiration of Biological Viscoelastic Drops. *Phys Rev Lett* 2010;104:218101. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.104.218101>.
- H. H M, Cooper G, Bartolo PJDS. Development and Characterisation of a Photocurable Alginate Bioink for 3D Bioprinting. *Int J Bioprinting* 2019;5:12. <https://doi.org/10.18063/ijb.v5i2.189>.
- Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, et al. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 1989;84:1663–70. <https://doi.org/10.1172/JCI114345>.
- He X. Microfluidic Encapsulation of Ovarian Follicles for 3D Culture. *Ann Biomed Eng* 2017;45:1676–84. <https://doi.org/10.1007/s10439-017-1823-7>.
- Hossain G, Iwata T, Mizusawa N, Wan S, Shima N, Okutsu T, et al. Compressive force inhibits adipogenesis through COX-2-mediated down-regulation of PPAR  $\gamma$  2 and C / EBP  $\alpha$  2010;109:297–303. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.09.003>.
- Hsiao AY, Torisawa Y, Tung Y-C, Sud S, Taichman RS, Pienta KJ, et al. Microfluidic system for formation of PC-3 prostate cancer co-culture spheroids. *Biomaterials* 2009;30:3020–7. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.02.047>.
- Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, et al. Optical Coherence

- Tomography. *Science* 1991;254:1178–81. <https://doi.org/10.1126/science.1957169>.
- Huang G, Li F, Zhao X, Ma Y, Li Y, Lin M, et al. Functional and Biomimetic Materials for Engineering of the Three-Dimensional Cell Microenvironment. *Chem Rev* 2017;117:12764–850. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00094>.
- Huang H, He X, Yarmush ML. Advanced technologies for the preservation of mammalian biospecimens. *Nat Biomed Eng* 2021;5:793–804. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00784-z>.
- Huang H, Yu Y, Hu Y, He X, Berk Usta O, Yarmush ML. Generation and manipulation of hydrogel microcapsules by droplet-based microfluidics for mammalian cell culture. *Lab Chip* 2017;17:1913–32. <https://doi.org/10.1039/C7LC00262A>.
- Huch M, Koo B-K. Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development* 2015;142:3113–25. <https://doi.org/10.1242/dev.118570>.
- Huisken J, Huisken J, Swoger J, Bene FD, Wittbrodt J, Stelzer EHK. Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy 2011;1007. <https://doi.org/10.1126/science.1100035>.
- Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J* 2006;20:811–27. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5424rev>.
- Jabbari E, Sarvestani SK, Daneshian L, Moeinzadeh S. Optimum 3D Matrix Stiffness for Maintenance of Cancer Stem Cells Is Dependent on Tissue Origin of Cancer Cells. *PLOS ONE* 2015;10:e0132377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132377>.
- Jagiella N, Müller B, Müller M, Vignon-Clementel IE, Drasdo D. Inferring Growth Control Mechanisms in Growing Multi-cellular Spheroids of NSCLC Cells from Spatial-Temporal Image Data. *PLoS Comput Biol* 2016;12:e1004412. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004412>.
- Jeon O, Bouhadir KH, Mansour JM, Alsberg E. Biomaterials Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties 2009:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.034>.
- Jin B-J, Battula S, Zachos N, Kovbasnjuk O, Fawlke-Abel J, In J, et al. Microfluidics platform for measurement of volume changes in immobilized intestinal enteroids. *Biomicrofluidics* 2014;8:024106. <https://doi.org/10.1063/1.4870400>.
- Jin H, Lei J. A mathematical model of cell population dynamics with autophagy response to starvation. *Math Biosci* 2014;258:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2014.08.014>.
- Johnson KL, Kendall K, Roberts AD. Surface energy and the contact of elastic solids. *Proc R Soc Lond Math Phys Sci* 1971;324:301–13. <https://doi.org/10.1098/rspa.1971.0141>.
- Jung W, Boppart SA. Modern Trends in Imaging V: Optical Coherence Tomography for Rapid Tissue Screening and Directed Histological Sectioning. *Anal Cell Pathol* 2012;35:129–43. <https://doi.org/10.1155/2012/757236>.
- Jung Y, Park W, Park H, Lee D-K, Na K. Thermo-sensitive injectable hydrogel based on the physical mixing of hyaluronic acid and Pluronic F-127 for sustained NSAID delivery. *Carbohydr Polym* 2017;156:403–8. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.068>.
- Kaczmarek B, Nadolna K, Owczarek A. The physical and chemical properties of hydrogels based on natural polymers. *Hydrogels Based Nat. Polym., Elsevier*; 2020, p. 151–72.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816421-1.00006-9>.

Karoyo AH, Wilson LD. A Review on the Design and Hydration Properties of Natural Polymer-Based Hydrogels. *Materials* 2021;14:1095. <https://doi.org/10.3390/ma14051095>.

Katzengold R, Shoham N, Benayahu D, Gefen A. Simulating single cell experiments in mechanical testing of adipocytes. *Biomech Model Mechanobiol* 2015;14:537–47. <https://doi.org/10.1007/s10237-014-0620-6>.

Ke M-T, Fujimoto S, Imai T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci* 2013;16:1154–61. <https://doi.org/10.1038/nn.3447>.

Keller PJ. Imaging Morphogenesis: Technological Advances and Biological Insights. *Science* 2013;340:1234168–1234168. <https://doi.org/10.1126/science.1234168>.

Keller PJ, Schmidt AD, Wittbrodt J, Stelzer EHK. Reconstruction of Zebrafish Early Embryonic Development by Scanned Light Sheet Microscopy. *Science* 2008;322:1065–9. <https://doi.org/10.1126/science.1162493>.

Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 2003;83:173–80. <https://doi.org/10.1002/bit.10655>.

Kikuchi A, Kawabuchi M, Sugihara M, Sakurai Y, Okano T. Pulsed dextran release from calcium-alginate gel beads. *J Controlled Release* 1997;47:21–9. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(96\)01612-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(96)01612-4).

Kilian KA, Bugarija B, Lahn BT, Mrksich M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells 2010. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903269107>.

Kim D-H, Chambliss AB, Wirtz D. The multi-faceted role of the actin cap in cellular mechanosensation and mechanotransduction. *Soft Matter* 2013;9:5516. <https://doi.org/10.1039/c3sm50798j>.

Kim J, Koo B-K, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020;21:571–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0259-3>.

Kim TW, Koo SY, Studer L. Pluripotent Stem Cell Therapies for Parkinson Disease: Present Challenges and Future Opportunities. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:729. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00729>.

Klein-Nulend J, Bacabac R, Bakker A. Mechanical loading and how it affects bone cells: The role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton. *Eur Cell Mater* 2012;24:278–91. <https://doi.org/10.22203/eCM.v024a20>.

Klingelhutz AJ, Gourronc FA, Chaly A, Wadkins DA, Burand J, Markan KR, et al. Scaffold-free generation of uniform adipose spheroids for metabolism research and drug discovery. *Sci Rep* 2018;1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19024-z>.

Koch S, Schwinger C, Kressler J, Heinzen Ch, Rainov NG. Alginate encapsulation of genetically engineered mammalian cells: Comparison of production devices, methods and microcapsule characteristics. *J Microencapsul* 2003;20:303–16. <https://doi.org/10.3109/02652040309178071>.

- Korolev KS, Xavier JB, Gore J. Turning ecology and evolution against cancer. *Nat Rev Cancer* 2014;14:371–80. <https://doi.org/10.1038/nrc3712>.
- Kretzschmar K, Clevers H. Organoids: Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish. *Dev Cell* 2016;38:590–600. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.08.014>.
- Kurashina Y, Tsuchiya M, Sakai A, Maeda T, Heo YJ, Rossi F, et al. Simultaneous crosslinking induces macroscopically phase-separated microgel from a homogeneous mixture of multiple polymers. *Appl Mater Today* 2021;22:100937. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.100937>.
- Kusminski CM, Bickel PE, Scherer PE. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15:639–60. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.75>.
- Ladoux B, Nelson WJ, Yan J, Mège RM. The mechanotransduction machinery at work at *adherens* junctions. *Integr Biol* 2015;7:1109–19. <https://doi.org/10.1039/c5ib00070j>.
- Ladoux B, Nicolas A. Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Rep Prog Phys* 2012;75:116601. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/75/11/116601>.
- Laird AK. Dynamics of Tumor Growth. *Br J Cancer* 1964;18:490–502. <https://doi.org/10.1038/bjc.1964.55>.
- Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 2014;345:1247125. <https://doi.org/10.1126/science.1247125>.
- Lancaster MA, Renner M, Martin C-A, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 2013;501:373–9. <https://doi.org/10.1038/nature12517>.
- Laurens LML, Wolfrum EJ. Feasibility of Spectroscopic Characterization of Algal Lipids: Chemometric Correlation of NIR and FTIR Spectra with Exogenous Lipids in Algal Biomass. *BioEnergy Res* 2011;4:22–35. <https://doi.org/10.1007/s12155-010-9098-y>.
- Le Maout V, Alessandri K, Gurchenkov B, Bertin H, Nassoy P, Sciumè G. Role of mechanical cues and hypoxia on the growth of tumor cells in strong and weak confinement: A dual in vitro–in silico approach. *Sci Adv* 2020;6:eaaz7130. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz7130>.
- Leckband DE, de Rooij J. Cadherin Adhesion and Mechanotransduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014;30:291–315. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013212>.
- Lee D, Cha C. The Combined Effects of Co-Culture and Substrate Mechanics on 3D Tumor Spheroid Formation within Microgels Prepared via Flow-Focusing Microfluidic Fabrication. *Pharmaceutics* 2018;10:229. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040229>.
- Lee D, Greer SE, Kuss MA, An Y, Dudley AT. 3D printed alginate bead generator for high-throughput cell culture. *Biomed Microdevices* 2021;23:22. <https://doi.org/10.1007/s10544-021-00561-4>.
- Lee K, Kim C, Young Yang J, Lee H, Ahn B, Xu L, et al. Gravity-oriented microfluidic device for uniform and massive cell spheroid formation. *Biomicrofluidics* 2012;6:014114. <https://doi.org/10.1063/1.3687409>.
- Lee Y-H, Petkova AP, Mottillo EP, Granneman JG. In Vivo Identification of Bipotential Adipocyte Progenitors Recruited by  $\beta$ 3-Adrenoceptor Activation and High-Fat Feeding. *Cell*

Metab 2012;15:480–91. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.009>.

Leibel RL, Bahary N, Friedman JM. Genetic Variation and Nutrition in Obesity: Approaches to the Molecular Genetics of Obesity 1. In: Simopoulos AP, Childs B, editors. *World Rev. Nutr. Diet.*, vol. 63, S. Karger AG; 1990, p. 90–101. <https://doi.org/10.1159/000418501>.

Lele TP, Sero JE, Matthews BD, Kumar S, Xia S, Montoya-Zavala M, et al. Tools to Study Cell Mechanics and Mechanotransduction. *Methods Cell Biol.*, vol. 83, Elsevier; 2007, p. 441–72. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)83019-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)83019-6).

Lemmo S, Atefi E, Luker GD, Tavana H. Optimization of Aqueous Biphasic Tumor Spheroid Microtechnology for Anti-cancer Drug Testing in 3D Culture. *Cell Mol Bioeng* 2014;7:344–54. <https://doi.org/10.1007/s12195-014-0349-4>.

Li M, Fu T, Yang S, Pan L, Tang J, Chen M, et al. Agarose-based spheroid culture enhanced stemness and promoted odontogenic differentiation potential of human dental follicle cells in vitro. *Vitro Cell Dev Biol - Anim* 2021;57:620–30. <https://doi.org/10.1007/s11626-021-00591-5>.

Li ML, Aggeler J, Farson DA, Hatier C, Hassell J, Bissell MJ. Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84:136–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.1.136>.

Lin R-Z, Chen Y-C, Moreno-Luna R, Khademhosseini A, Melero-Martin JM. Transdermal regulation of vascular network bioengineering using a photopolymerizable methacrylated gelatin hydrogel. *Biomaterials* 2013;34:6785–96. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.060>.

Liu Y-J, Le Berre M, Lautenschlaeger F, Maiuri P, Callan-Jones A, Heuzé M, et al. Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells. *Cell* 2015;160:659–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.007>.

Lo AT, Mori H, Mott J, Bissell MJ. Constructing Three-Dimensional Models to Study Mammary Gland Branching Morphogenesis and Functional Differentiation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2012;17:103–10. <https://doi.org/10.1007/s10911-012-9251-7>.

Locke M. *Cellular Membranes in Development*. Elsevier; 1964. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-395533-3.X5001-7>.

Loessner D, Meinert C, Kaemmerer E, Martine LC, Yue K, Levett PA, et al. Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms. *Nat Protoc* 2016;11:727–46. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.037>.

Lomakin AJ, Cattin CJ, Cuvelier D, Alraies Z, Molina M, Nader GPF, et al. The nucleus acts as a ruler tailoring cell responses to spatial constraints. *Science* 2020;370:eaba2894. <https://doi.org/10.1126/science.aba2894>.

Lu AX, Oh H, Terrell JL, Bentley WE, Raghavan SR. A new design for an artificial cell: polymer microcapsules with addressable inner compartments that can harbor biomolecules, colloids or microbial species. *Chem Sci* 2017;8:6893–903. <https://doi.org/10.1039/C7SC01335C>.

Lu Y-C, Song W, An D, Kim BJ, Schwartz R, Wu M, et al. Designing compartmentalized

hydrogel microparticles for cell encapsulation and scalable 3D cell culture. *J Mater Chem B* 2015;3:353–60. <https://doi.org/10.1039/C4TB01735H>.

Lucio AA, Mongera A, Shelton E, Chen R, Doyle AM, Campàs O. Spatiotemporal variation of endogenous cell-generated stresses within 3D multicellular spheroids. *Sci Rep* 2017;7:12022. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12363-x>.

Lussi J, Falconnet D, Hubbell J, Textor M, Csucs G. Pattern stability under cell culture conditions—A comparative study of patterning methods based on PLL-g-PEG background passivation. *Biomaterials* 2006;27:2534–41. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.11.027>.

Ma M, Chiu A, Sahay G, Doloff JC, Dholakia N, Thakrar R, et al. Core-Shell Hydrogel Microcapsules for Improved Islets Encapsulation. *Adv Healthc Mater* 2013;2:667–72. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200341>.

Malek AM. Hemodynamic Shear Stress and Its Role in Atherosclerosis. *JAMA* 1999;282:2035. <https://doi.org/10.1001/jama.282.21.2035>.

Mao AS, Shin J-W, Mooney DJ. Effects of substrate stiffness and cell-cell contact on mesenchymal stem cell differentiation. *Biomaterials* 2016;98:184–91. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.05.004>.

Marcus JM, Burke RT, Desisto JA, Landesman Y, Orth JD. Longitudinal tracking of single live cancer cells to understand cell cycle effects of the nuclear export inhibitor , selinexor. *Nat Publ Group* 2015:1–14. <https://doi.org/10.1038/srep14391>.

Mark C, Grundy TJ, Strissel PL, Böhringer D, Grummel N, Gerum R, et al. Collective forces of tumor spheroids in three-dimensional biopolymer networks. *ELife* 2020;9:e51912. <https://doi.org/10.7554/eLife.51912>.

Marmottant P, Mgharbel A, Kafer J, Audren B, Rieu J-P, Vial J-C, et al. The role of fluctuations and stress on the effective viscosity of cell aggregates. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106:17271–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902085106>.

Mayhew T. The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. *Exp Physiol* 1991;76:639–65. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1991.sp003533>.

McAvoy K, Jones D, Thakur RRS. Synthesis and Characterisation of Photocrosslinked poly(ethylene glycol) diacrylate Implants for Sustained Ocular Drug Delivery. *Pharm Res* 2018;35:36. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2298-9>.

McLaughlin T, Sherman A, Tsao P, Gonzalez O, Yee G, Lamendola C, et al. Enhanced proportion of small adipose cells in insulin-resistant vs insulin-sensitive obese individuals implicates impaired adipogenesis. *Diabetologia* 2007;50:1707–15. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0708-y>.

Mei L, Espinosa de los Reyes S, Reynolds MJ, Leicher R, Liu S, Alushin GM. Molecular mechanism for direct actin force-sensing by  $\alpha$ -catenin. *ELife* 2020;9:e62514. <https://doi.org/10.7554/eLife.62514>.

Mekhileri NV, Andrique L, Recher G, Nassoy P, Badon A. Adaptive coherence volume in full-field optical coherence tomography. *OSA Contin* 2021;4:2805.

<https://doi.org/10.1364/OSAC.442310>.

Mertz J. Optical sectioning microscopy with planar or structured illumination. *Nat Methods* 2011;8:811–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1709>.

Minett T, Tighe B, Lydon M, Rees D. Requirements for cell spreading on polyHEMA coated culture substrates. *Cell Biol Int Rep* 1984;8:151–9. [https://doi.org/10.1016/0309-1651\(84\)90082-1](https://doi.org/10.1016/0309-1651(84)90082-1).

Minsky M. Microscopy apparatus. US3013467A, 1957.

Mohammed D, Versaevel M, Bruyère C, Alaimo L, Luciano M, Verduyck E, et al. Innovative Tools for Mechanobiology: Unraveling Outside-In and Inside-Out Mechanotransduction. *Front Bioeng Biotechnol* 2019;7:162. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00162>.

Montel F, Delarue M, Elgeti J, Malaquin L, Basan M, Risler T, et al. Stress Clamp Experiments on Multicellular Tumor Spheroids. *Phys Rev Lett* 2011a;107:188102. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.107.188102>.

Montel F, Delarue M, Elgeti J, Malaquin L, Basan M, Risler T, et al. Stress Clamp Experiments on Multicellular Tumor Spheroids 2011b;188102:1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.107.188102>.

Morch YA. Novel Alginate Microcapsules for Cell Therapy—A Study of the Structure-Function Relationships in Native and Structurally Engineered Alginates. Thèse. Norwegian University of Science and Technology, 2008.

Morel M, Shynkar V, Galas J-C, Dupin I, Bouzigues C, Studer V, et al. Amplification and Temporal Filtering during Gradient Sensing by Nerve Growth Cones Probed with a Microfluidic Assay. *Biophys J* 2012;103:1648–56. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.08.040>.

Munevar S, Wang Y, Dembo M. Traction Force Microscopy of Migrating Normal and H-ras Transformed 3T3 Fibroblasts. *Biophys J* 2001;80:1744–57. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76145-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76145-0).

Negrel R, Grimaldi P, Ailhaud G. Establishment of preadipocyte clonal line from epididymal fat pad of ob/ob mouse that responds to insulin and to lipolytic hormones. *Proc Natl Acad Sci* 1978;75:6054–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.12.6054>.

Nguyen TQ, Green DW, Willhite GP, McCool CS. Effect of Composition of a Polyacrylamide-Chromium(III) Acetate Gel on the Magnitude of Gel Dehydration and Disproportionate Permeability Reduction. *Days, Tulsa, Oklahoma: SPE; 2004, p. SPE-89404-MS*. <https://doi.org/10.2118/89404-MS>.

Nicolas A, Geiger B, Safran SA. Cell mechanosensitivity controls the anisotropy of focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:12520–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403539101>.

Niemelä S-M, Miettinen S, Konttinen Y, Waris T, Kellomäki M, Ashammakhi NA, et al. Fat Tissue: Views on Reconstruction and Exploitation. *J Craniofac Surg* 2007;18:325–35. <https://doi.org/10.1097/scs.0b013e3180333b6a>.

Nougues J, Reyne Y, Dulor JP. Differentiation of rabbit adipocyte precursors in primary culture. *Int J Obes* 1988;12:321–33.

Ohnuki Y, Kurosawa H. Effects of hanging drop culture conditions on embryoid body

- formation and neuronal cell differentiation using mouse embryonic stem cells: Optimization of culture conditions for the formation of well-controlled embryoid bodies. *J Biosci Bioeng* 2013;115:571–4. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.11.016>.
- Ong S-M, Zhang C, Toh Y-C, Kim SH, Foo HL, Tan CH, et al. A gel-free 3D microfluidic cell culture system. *Biomaterials* 2008;29:3237–44. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.022>.
- Osborn TM, Hallett PJ, Schumacher JM, Isacson O. Advantages and Recent Developments of Autologous Cell Therapy for Parkinson’s Disease Patients. *Front Cell Neurosci* 2020;14:58. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00058>.
- Ota H, Miki N. Microfluidic experimental platform for producing size-controlled three-dimensional spheroids. *Sens Actuators Phys* 2011;169:266–73. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2011.03.051>.
- Paine CET, Marthews TR, Vogt DR, Purves D, Rees M, Hector A, et al. How to fit nonlinear plant growth models and calculate growth rates: an update for ecologists: *Nonlinear plant growth models*. *Methods Ecol Evol* 2012;3:245–56. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00155.x>.
- Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue 2007;8:839–45.
- Park HE, Kim D, Koh HS, Cho S, Sung J-S, Kim JY. Real-Time Monitoring of Neural Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Electric Cell-Substrate Impedance Sensing. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:1–8. <https://doi.org/10.1155/2011/485173>.
- Pasqua M, Pereira U, Messina A, de Lartigue C, Vigneron P, Dubart-Kupperschmitt A, et al. HepaRG Self-Assembled Spheroids in Alginate Beads Meet the Clinical Needs for Bioartificial Liver. *Tissue Eng Part A* 2020;26:613–22. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2019.0262>.
- Pawley JB. *Handbook of biological confocal microscopy*. 3rd ed. New York, NY: Springer; 1995.
- Pei F, Jiang J, Bai S, Cao H, Tian L, Zhao Y, et al. Chemical-defined and albumin-free generation of human atrial and ventricular myocytes from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* 2017;19:94–103. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.01.006>.
- Peng T, Liu L, MacLean AL, Wong CW, Zhao W, Nie Q. A mathematical model of mechanotransduction reveals how mechanical memory regulates mesenchymal stem cell fate decisions. *BMC Syst Biol* 2017;11:55. <https://doi.org/10.1186/s12918-017-0429-x>.
- Perez JE, Nagle I, Wilhelm C. Magnetic molding of tumor spheroids: emerging model for cancer screening. *Biofabrication* 2021;13:015018. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/abc670>.
- Pi Q, Maharjan S, Yan X, Liu X, Singh B, Genderen AMV, et al. Digitally Tunable Microfluidic Bioprinting of Multilayered Cannular Tissues 2018;1706913:1–10. <https://doi.org/10.1002/adma.201706913>.
- Piwko W, Olma MH, Held M, Bianco JN, Pedrioli PGA, Hofmann K, et al. RNAi-based screening identifies the Mms22L–Nfkbil2 complex as a novel regulator of DNA replication in human cells. *EMBO J* 2010;29:4210–22. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.304>.
- Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, den Brink S, Geurts V, Beumer J, Clevers H.

Establishment and Culture of Human Intestinal Organoids Derived from Adult Stem Cells. *Curr Protoc Immunol* 2020;130. <https://doi.org/10.1002/cpim.106>.

Poulos SP, Dodson MV, Hausman GJ. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Exp Biol Med* 2010;235:1185–93. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010063>.

Purschke M, Rubio N, Held KD, Redmond RW. Phototoxicity of Hoechst 33342 in time-lapse fluorescence microscopy. *Photochem Photobiol Sci* 2010;9:1634. <https://doi.org/10.1039/c0pp00234h>.

Qi L, Li N, Huang R, Song Q, Wang L, Zhang Q, et al. The Effects of Topographical Patterns and Sizes on Neural Stem Cell Behavior. *PLoS ONE* 2013;8:e59022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059022>.

Qian X, Jacob F, Song MM, Nguyen HN, Song H, Ming G. Generation of human brain region-specific organoids using a miniaturized spinning bioreactor. *Nat Protoc* 2018;13:565–80. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.152>.

Ravera F, Efeoglu E, Byrne HJ. Monitoring stem cell differentiation using Raman microspectroscopy: chondrogenic differentiation, towards cartilage formation. *The Analyst* 2021;146:322–37. <https://doi.org/10.1039/D0AN01983F>.

Recher G, Nassoy P, Badon A. Remote scanning for ultra-large field of view in wide-field microscopy and full-field OCT. *Biomed Opt Express* 2020;11:2578. <https://doi.org/10.1364/BOE.383329>.

Resnick A, Hopfer U. Force-Response Considerations in Ciliary Mechanosensation. *Biophys J* 2007;93:1380–90. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.105007>.

Richardson DS, Lichtman JW. Clarifying Tissue Clearing. *Cell* 2015;162:246–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.067>.

Ridone P, Vassalli M, Martinac B. Piezo1 mechanosensitive channels: what are they and why are they important. *Biophys Rev* 2019;11:795–805. <https://doi.org/10.1007/s12551-019-00584-5>.

Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, et al. Focal Contacts as Mechanosensors. *J Cell Biol* 2001;153:1175–86. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.6.1175>.

Rodday B, Hirschhaeuser F, Walenta S, Mueller-Klieser W. Semiautomatic Growth Analysis of Multicellular Tumor Spheroids. *J Biomol Screen* 2011;16:1119–24. <https://doi.org/10.1177/1087057111419501>.

Rondinone CM. Adipocyte-Derived Hormones, Cytokines, and Mediators. *Endocrine* 2006;29:81–90. <https://doi.org/10.1385/ENDO:29:1:81>.

Rookmaaker MB, Schutgens F, Verhaar MC, Clevers H. Development and application of human adult stem or progenitor cell organoids. *Nat Rev Nephrol* 2015;11:546–54. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.118>.

Rosell-Llompart J, Grifoll J, Loscertales IG. Electrosprays in the cone-jet mode: From Taylor cone formation to spray development. *J Aerosol Sci* 2018;125:2–31. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2018.04.008>.

Rouillard AD, Berglund CM, Lee JY, Polacheck WJ, Tsui Y, Bonassar LJ, et al. Methods for

- Photocrosslinking Alginate Hydrogel Scaffolds with High Cell Viability 2011;17. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0582>.
- Ruprecht V, Monzo P, Ravasio A, Yue Z, Makhija E, Strale PO, et al. How cells respond to environmental cues – insights from bio-functionalized substrates. *J Cell Sci* 2016;jcs.196162. <https://doi.org/10.1242/jcs.196162>.
- Sabhachandani P, Sarkar S, Mckenney S, Evens AM, Konry T. PT. *J Controlled Release* 2018:#pagerange#. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.010>.
- Sackett DL, Wolff J. Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces. *Anal Biochem* 1987;167:228–34. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90157-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90157-6).
- Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, et al. Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression. *Cell* 2008;132:487–98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.033>.
- Sanz M, Picazo-Bueno JA, García J, Micó V. Improved quantitative phase imaging in lensless microscopy by single-shot multi-wavelength illumination using a fast convergence algorithm. *Opt Express* 2015;23:21352. <https://doi.org/10.1364/OE.23.021352>.
- Sart S, Tomasi RF-X, Amselem G, Baroud CN. Multiscale cytometry and regulation of 3D cell cultures on a chip. *Nat Commun* 2017;8:469. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00475-x>.
- Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009;459:262–5. <https://doi.org/10.1038/nature07935>.
- Seo S, Su T, Tseng DK, Ozcan A. Lensfree holographic imaging for on-chip cytometry and diagnostics † 2009:777–87. <https://doi.org/10.1039/b813943a>.
- Shetty SC, Yandrapalli N, Pinkwart K, Krafft D, Vidakovic-Koch T, Ivanov I, et al. Directed Signaling Cascades in Monodisperse Artificial Eukaryotic Cells. *ACS Nano* 2021;15:15656–66. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04219>.
- Shoham N, Gefen A. The influence of mechanical stretching on mitosis, growth, and adipose conversion in adipocyte cultures. *Biomech Model Mechanobiol* 2012a;11:1029–45. <https://doi.org/10.1007/s10237-011-0371-6>.
- Shoham N, Gefen A. Mechanotransduction in adipocytes. *J Biomech* 2012b;45:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2011.10.023>.
- Shoham N, Girshovitz P, Katzengold R, Shaked NT, Benayahu D, Gefen A. Adipocyte Stiffness Increases with Accumulation of Lipid Droplets. *Biophys J* 2014;106:1421–31. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.01.045>.
- Shoham N, Levy A, Shabshin N, Benayahu D, Gefen A. A multiscale modeling framework for studying the mechanobiology of sarcopenic obesity. *Biomech Model Mechanobiol* 2017;16:275–95. <https://doi.org/10.1007/s10237-016-0816-z>.
- Shoham N, Mor-Yossef Moldovan L, Benayahu D, Gefen A. Multiscale Modeling of Tissue-Engineered Fat: Is There a Deformation-Driven Positive Feedback Loop in Adipogenesis? *Tissue Eng Part A* 2015;21:1354–63. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0505>.
- Siedentopf, Zsigmondy. Ueber Sichtbarmachung ultramikroskopischer Teilchen, mit

besonderer Anwendung auf Goldrubingläser. *J Phys Théorique Appliquée* 1903;2:692–702. <https://doi.org/10.1051/jphysap:019030020069201>.

Simoneau CR, Ott M. Modeling Multi-organ Infection by SARS-CoV-2 Using Stem Cell Technology. *Cell Stem Cell* 2020;27:859–68. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.11.012>.

Sinha B, Köster D, Ruez R, Gonnord P, Bastiani M, Abankwa D, et al. Cells Respond to Mechanical Stress by Rapid Disassembly of Caveolae. *Cell* 2011;144:402–13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.031>.

Smith SJ, Wilson M, Ward JH, Rahman CV, Peet AC, Macarthur DC, et al. Recapitulation of Tumor Heterogeneity and Molecular Signatures in a 3D Brain Cancer Model with Decreased Sensitivity to Histone Deacetylase Inhibition. *PLoS ONE* 2012;7:e52335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052335>.

Song H, O'Connor KC, Papadopoulos KD, Jansen DA. Differentiation Kinetics of *in Vitro* 3T3-L1 Preadipocyte Cultures. *Tissue Eng* 2002;8:1071–81. <https://doi.org/10.1089/107632702320934164>.

Sonker AK, Rathore K, Nagarale RK, Verma V. Crosslinking of Polyvinyl Alcohol (PVA) and Effect of Crosslinker Shape (Aliphatic and Aromatic) Thereof. *J Polym Environ* 2018;26:1782–94. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-1077-3>.

Soofi SS, Last JA, Liliensiek SJ, Nealey PF, Murphy CJ. The elastic modulus of Matrigel™ as determined by atomic force microscopy. *J Struct Biol* 2009;167:216–9. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.05.005>.

Souza GR, Molina JR, Raphael RM, Ozawa MG, Stark DJ, Levin CS, et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat Nanotechnol* 2010;5:291–6. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.23>.

Streichan SJ, Hoerner CR, Schneidt T, Holzer D, Hufnagel L. Spatial constraints control cell proliferation in tissues. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111:5586–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323016111>.

Su T-W, Seo S, Erlinger A, Ozcan A. High-throughput lensfree imaging and characterization of a heterogeneous cell solution on a chip. *Biotechnol Bioeng* 2009;102:856–68. <https://doi.org/10.1002/bit.22116>.

Suntornnond R, Yong E, Tan S, An J, Chua CK. A highly printable and biocompatible hydrogel composite for direct printing of soft and perfusable vasculature-like structures. *Sci Rep* 2017;1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17198-0>.

Supatto W, Truong TV, Débarre D, Beaupaire E. Advances in multiphoton microscopy for imaging embryos. *Curr Opin Genet Dev* 2011;21:538–48. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.08.003>.

Sutherland RM. Cell and Environment Interactions in Tumor Microregions: The Multicell Spheroid Model. *Science* 1988;240:177–84. <https://doi.org/10.1126/science.2451290>.

Sutherland RM, Inch WR, McCredie JA, Kruuv J. A Multi-component Radiation Survival Curve Using an *in Vitro* Tumour Model. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1970;18:491–5. <https://doi.org/10.1080/09553007014551401>.

Suvorova II, Katolikova NV, Pospelov VA. New Insights into Cell Cycle Regulation and DNA

- Damage Response in Embryonic Stem Cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, vol. 299, Elsevier; 2012, p. 161–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394310-1.00004-7>.
- Svoboda E, McKinnon MC, Levine B. The functional neuroanatomy of autobiographical memory: A meta-analysis. *Neuropsychologia* 2006;44:2189–208. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2006.05.023>.
- Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PCDP, Pinter J, et al. Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation. *Science* 2013;341:1240104. <https://doi.org/10.1126/science.1240104>.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 2007;131:861–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 2006;126:663–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A. Biomaterials Synthesis , properties , and biomedical applications of gelatin methacryloyl ( GelMA ) hydrogels 2015;73:254–71. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.045>.
- Tanaka H, Matsumura M, Veliky IA. Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng* 1984;26:53–8. <https://doi.org/10.1002/bit.260260111>.
- Tang Q-Q, Otto TC, Lane MD. CCAAT/enhancer-binding protein is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:850–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337434100>.
- Tang W, Zevde D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, et al. White Fat Progenitor Cells Reside in the Adipose Vasculature. *Science* 2008;322:583–6. <https://doi.org/10.1126/science.1156232>.
- Teleken JT, Robazza W da S, Gomes G de A. Mathematical modeling of microbial growth in milk. *Food Sci Technol Camp* 2011;31:891–6. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000400010>.
- Tomba C, Migdal C, Fuard D, Villard C, Nicolas A. Glial cell mechanosensitivity is reversed by adhesion cues. *Biophysics*; 2019. <https://doi.org/10.1101/865303>.
- Tomotika S. On the Instability of a Cylindrical Thread of a Viscous Liquid Surrounded by Another Viscous Fluid 1935. <https://doi.org/10.1098/rspa.1935.0104>.
- Träber N, Uhlmann K, Girardo S, Kesavan G, Wagner K, Friedrichs J, et al. Polyacrylamide Bead Sensors for in vivo Quantification of Cell-Scale Stress in Zebrafish Development. *Sci Rep* 2019;9:17031. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53425-6>.
- Trushko A, Di Meglio I, Merzouki A, Blanch-Mercader C, Abuhattum S, Guck J, et al. Buckling of an Epithelium Growing under Spherical Confinement. *Dev Cell* 2020;54:655–668.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.07.019>.
- Tung Y-C, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa Y, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *The Analyst* 2011;136:473–8. <https://doi.org/10.1039/C0AN00609B>.

- Tuveson D, Clevers H. Cancer modeling meets human organoid technology. *Science* 2019;364:952–5. <https://doi.org/10.1126/science.aaw6985>.
- Uludag H, De Vos P, Tresco PA. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;42:29–64. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00053-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00053-3).
- Utada AS, Fernandez-Nieves A, Stone HA, Weitz DA. Dripping to Jetting Transitions in Coflowing Liquid Streams. *Phys Rev Lett* 2007;99:094502. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.99.094502>.
- Van Den Bulcke AI, Bogdanov B, De Rooze N, Schacht EH, Cornelissen M, Berghmans H. Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels. *Biomacromolecules* 2000;1:31–8. <https://doi.org/10.1021/bm990017d>.
- Velasco V, Shariati SA, Esfandyarpour R. Microtechnology-based methods for organoid models. *Microsyst Nanoeng* 2020;6. <https://doi.org/10.1038/s41378-020-00185-3>.
- Verhulst P-F. Notice sur la loi que la population poursuit dans son accroissement. *Corresp. Mathématique Phys.*, vol. 10, 1838.
- Versaevel M, Alaimo L, Seveau V, Luciano M, Mohammed D, Bruyère C, et al. Collective migration during a gap closure in a two-dimensional haptotactic model. *Sci Rep* 2021;11:5811. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84998-w>.
- Vining KH, Mooney DJ. Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017;18:728–42. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.108>.
- Vukicevic S, Kleinman HK, Luyten FP, Roberts AB, Roche NS, Reddi AH. Identification of multiple active growth factors in basement membrane matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res* 1992;202:1–8. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(92\)90397-Q](https://doi.org/10.1016/0014-4827(92)90397-Q).
- Vyas V, Solomon M, D'Souza GGM, Huey BD. Nanomechanical Analysis of Extracellular Matrix and Cells in Multicellular Spheroids. *Cell Mol Bioeng* 2019;12:203–14. <https://doi.org/10.1007/s12195-019-00577-0>.
- Wang H, Liu Haitao, Liu Hui, Su W, Chen W, Qin J. One-Step Generation of Core – Shell Gelatin Methacrylate ( GelMA ) Microgels Using a Droplet Microfluidic System 2019;1800632:1–10. <https://doi.org/10.1002/admt.201800632>.
- Wang S, Liang W, Dong Z, Lee VGB, Li WJ. Fabrication of Micrometer- and Nanometer-Scale Polymer Structures by Visible Light Induced Dielectrophoresis (DEP) Force. *Micromachines* 2011;2:431–42. <https://doi.org/10.3390/mi2040431>.
- Wang Y, Song J, Liu X, Liu J, Zhang Q, Yan X, et al. Multiple Effects of Mechanical Stretch on Myogenic Progenitor Cells. *Stem Cells Dev* 2020;29:336–52. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0286>.
- Wann AKT, Zuo N, Haycraft CJ, Jensen CG, Poole CA, McGlashan SR, et al. Primary cilia mediate mechanotransduction through control of ATP-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in compressed chondrocytes. *FASEB J* 2012;26:1663–71. <https://doi.org/10.1096/fj.11-193649>.
- Wiggins P, Phillips R. Analytic models for mechanotransduction: Gating a mechanosensitive channel. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:4071–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307804101>.

- Williams SK, Touroo JS, Church KH, Hoying JB. Encapsulation of Adipose Stromal Vascular Fraction Cells in Alginate Hydrogel Spheroids Using a Direct-Write Three-Dimensional Printing System. *BioResearch Open Access* 2013;2:448–54. <https://doi.org/10.1089/biores.2013.0046>.
- Winickoff DE, Saha K, Graff GD. Opening stem cell research and development: a policy proposal for the management of data, intellectual property, and ethics. *Yale J Health Policy Law Ethics* 2009;9:52–127.
- Wu C, Zhu Y, Chang J, Zhang Y, Xiao Y. Bioactive inorganic-materials/alginate composite microspheres with controllable drug-delivery ability. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010;9999B:NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31621>.
- Wu P-H, Aroush DR-B, Asnacios A, Chen W-C, Dokukin ME, Doss BL, et al. A comparison of methods to assess cell mechanical properties. *Nat Methods* 2018;15:491–8. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0015-1>.
- Wu Q, Yang C, Liu G, Xu W, Zhu Z, Si T, et al. Multiplex coaxial flow focusing for producing multicompartment Janus microcapsules with tunable material compositions and structural characteristics. *Lab Chip* 2017;17:3168–75. <https://doi.org/10.1039/C7LC00769H>.
- Wu Y, Xiang Y, Fang J, Li X, Lin Z, Dai G, et al. The influence of the stiffness of GelMA substrate on the outgrowth of PC12 cells. *Biosci Rep* 2019;39:BSR20181748. <https://doi.org/10.1042/BSR20181748>.
- Xiao S, Zhao T, Wang J, Wang C, Du J, Ying L, et al. Gelatin Methacrylate (GelMA)-Based Hydrogels for Cell Transplantation: an Effective Strategy for Tissue Engineering. *Stem Cell Rev Rep* 2019;15:664–79. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09893-4>.
- Xiao W, He J, Nichol JW, Wang L, Hutson CB, Wang B, et al. Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels. *Acta Biomater* 2011;7:2384–93. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.01.016>.
- Xie J, Lim LK, Phua Y, Hua J, Wang C-H. Electrohydrodynamic atomization for biodegradable polymeric particle production. *J Colloid Interface Sci* 2006;302:103–12. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.06.037>.
- Xu F, Xu L, Wang Q, Ye Z, Zhou Y, Tan W-S. 3D Dynamic Culture of Rabbit Articular Chondrocytes Encapsulated in Alginate Gel Beads Using Spinner Flasks for Cartilage Tissue Regeneration. *BioMed Res Int* 2014;2014:1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/539789>.
- Yamaoka M, Maeda N, Takayama Y, Sekimoto R, Tsushima Y, Matsuda K, et al. Adipose Hypothermia in Obesity and Its Association with Period Homolog 1, Insulin Sensitivity, and Inflammation in Fat. *PLoS ONE* 2014;9:e112813. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112813>.
- Yan J, Yao M, Goult BT, Sheetz MP. Talin Dependent Mechanosensitivity of Cell Focal Adhesions. *Cell Mol Bioeng* 2015;8:151–9. <https://doi.org/10.1007/s12195-014-0364-5>.
- Yang MT, Sniadecki NJ, Chen CS. Geometric Considerations of Micro- to Nanoscale Elastomeric Post Arrays to Study Cellular Traction Forces. *Adv Mater* 2007;19:3119–23. <https://doi.org/10.1002/adma.200701956>.
- Yang X, Cai X, Wang J, Tang H, Yuan Q, Gong P, et al. Mechanical stretch inhibits

- adipogenesis and stimulates osteogenesis of adipose stem cells: Adipo-osteo-differentiation of ASCs by mechanics. *Cell Prolif* 2012;45:158–66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2011.00802.x>.
- Yao M, Goult BT, Klapholz B, Hu X, Toseland CP, Guo Y, et al. The mechanical response of talin. *Nat Commun* 2016;7:11966. <https://doi.org/10.1038/ncomms11966>.
- Yoon HJ, Shin SR, Cha JM, Lee S-H, Kim J-H, Do JT, et al. Cold Water Fish Gelatin Methacryloyl Hydrogel for Tissue Engineering Application. *PLOS ONE* 2016;11:e0163902. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163902>.
- Young DA, Choi YS, Engler AJ, Christman KL. Stimulation of adipogenesis of adult adipose-derived stem cells using substrates that mimic the stiffness of adipose tissue. *Biomaterials* 2013;34:8581–8. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.103>.
- Yu Y, Al-Mansoori L, Opas M. Optimized osteogenic differentiation protocol from R1 mouse embryonic stem cells in vitro. *Differentiation* 2015;89:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2014.12.003>.
- Yuan Y, Gao J, Ogawa R. Mechanobiology and Mechanotherapy of Adipose Tissue-Effect of Mechanical Force on Fat Tissue Engineering: *Plast Reconstr Surg - Glob Open* 2015;3:e578. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000000564>.
- Zerjatke T, Gak IA, Kirova D, Fuhrmann M, Daniel K, Gonciarz M, et al. Quantitative Cell Cycle Analysis Based on an Endogenous All-in-One Reporter for Cell Tracking and Classification. *Cell Rep* 2017;19:1953–66. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.022>.
- Zhang K, Xiao X, Wang X, Fan Y, Li X. Topographical patterning: characteristics of current processing techniques, controllable effects on material properties and co-cultured cell fate, updated applications in tissue engineering, and improvement strategies. *J Mater Chem B* 2019;7:7090–109. <https://doi.org/10.1039/C9TB01682A>.
- Zhang X, Huk DJ, Wang Q, Lincoln J, Zhao Y. A microfluidic shear device that accommodates parallel high and low stress zones within the same culturing chamber. *Biomicrofluidics* 2014;8:054106. <https://doi.org/10.1063/1.4894783>.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425–32. <https://doi.org/10.1038/372425a0>.
- Zhao G, Liu X, Zhu K, He X. Hydrogel Encapsulation Facilitates Rapid-Cooling Cryopreservation of Stem Cell-Laden Core-Shell Microcapsules as Cell-Biomaterial Constructs. *Adv Healthc Mater* 2017;6:1700988. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700988>.
- Zhou J, Chiu MC, Li C, Liu X, Zhao X, Wang D, et al. Human airway organoids model SARS-CoV-2 high infectiousness and evasion of interferon response. *In Review*; 2020. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-67556/v1>.
- Zhou J, Su J, Fu X, Zheng L, Yin Z. Microfluidic device for primary tumor spheroid isolation. *Exp Hematol Oncol* 2017;6:22. <https://doi.org/10.1186/s40164-017-0084-3>.
- Zhu B, Yin H. Alginate lyase: Review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications. *Bioengineered* 2015;6:125–31. <https://doi.org/10.1080/21655979.2015.1030543>.

## *References*

---

Zipfel WR, Williams RM, Webb WW. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol* 2003;21:1369–77. <https://doi.org/10.1038/nbt899>.