



HAL
open science

Fabrication et culture de feuillets hépatiques et de sphéroïdes en lévitation acoustique

Lucile Rabiet

► **To cite this version:**

Lucile Rabiet. Fabrication et culture de feuillets hépatiques et de sphéroïdes en lévitation acoustique. Acoustique [physics.class-ph]. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP7324 . tel-04786908

HAL Id: tel-04786908

<https://theses.hal.science/tel-04786908v1>

Submitted on 16 Nov 2024

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.

Université Paris Cité
École doctorale Frontières de l'innovation en recherche et éducation (FIRE - ED 474)
Laboratoire de Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes
Unité de Thérapie cellulaire de l'hôpital Saint-Louis

Fabrication et culture de feuillets hépatiques et de sphéroïdes en lévitation acoustique

Par LUCILE RABIET

Thèse de doctorat en SCIENCES DU VIVANT APPLIQUÉES, BIOTECHNOLOGIES, ET
INGÉNIERIE DES BIOSYSTÈMES MOLÉCULAIRES

Dirigée par JEAN-LUC AIDER et par JÉRÔME LARGHERO
Présentée et soutenue publiquement le 28 Novembre 2023

	ANNE CORLU	DR	Rapportrice
	MATHIEU HAUTEFEUILLE	PR	Rapporteur
Devant un jury composé de	ELEONORA DE MARTIN	DR	Examinatrice
	JEAN-LUC AIDER	DR	Directeur de thèse
	JÉRÔME LARGHERO	PR	Directeur de thèse



RÉSUMÉ

Fabrication et culture de feuillets hépatiques et de sphéroïdes en lévitation acoustique

Le foie est le plus gros organe endocrinien du corps humain et assume de nombreuses fonctions vitales : la détoxification des toxines et des médicaments, la sécrétion de bile, ou encore la synthèse d'albumine. Il a une capacité de régénération unique. Cependant, dans le cas de dommages sévères ou répétés, il perd son potentiel de régénération et doit être remplacé. La seule solution thérapeutique qui existe de nos jours est la greffe de foie, mais elle fait face à une augmentation du nombre de demandes et à une baisse du nombre de donneurs. Par conséquent, les approches d'ingénierie tissulaire sont une alternative prometteuse aux greffes hépatiques. Le foie est composé en majorité d'hépatocytes, qui représentent 80% de son volume, ainsi que d'autres types cellulaires parmi lesquels les cholangiocytes, les cellules endothéliales, les cellules stellaires, les cellules de Kupffer et le tissu conjonctif. Les hépatocytes matures sont des cellules polarisées qui interagissent avec d'autres hépatocytes sur leur pôle apical, et avec les cellules endothéliales sinusoidales via leur membrane basale. Cette structure est très importante pour leur fonctionnalité. Quand des hépatocytes sont isolés du foie et amplifiés en culture *in vitro* 2D, ils perdent leur polarité, leur fonctionnalité et leur capacité à proliférer. Ces dernières années, de nombreuses équipes de recherche ont exploré de nouvelles techniques de culture en 3D pour améliorer la fonctionnalité hépatique *in vitro* (cultures en sandwich, sphéroïdes, organoïdes, impression 3D, etc.). Même si elles sont bénéfiques pour la viabilité et la fonctionnalité des hépatocytes, ces techniques 3D ont leurs limites, comme l'utilisation de matrices extracellulaires et d'hydrogels mal caractérisés, ou le manque de reproductibilité pour les sphéroïdes et les organoïdes. La lévitation acoustique a été préalablement utilisée par nos équipes pour la culture à court terme de cellules épithéliales et mésenchymales. Nous avons montré que cette technique permettait la formation rapide de feuillets cellulaires. Nous avons depuis développé un nouveau système acoustique permettant la culture cellulaire à long terme pendant plusieurs semaines. Nous avons évalué la viabilité, l'auto-organisation et la fonctionnalité des cellules et avons obtenu des résultats très encourageants pour la culture en 3D de cellules stromales mésenchymateuses, de cellules hépatiques, de cellules endothéliales et d'un modèle de coculture. Les dynamiques d'auto-organisation ont été étudiées quantitativement à l'aide de morpho-descripteurs. Pour explorer les mécanismes d'auto-organisation, physiques ou biologiques, les cellules ont été soumises à différentes amplitudes de la force de radiation acoustique, traitées avec un chélateur de calcium pour empêcher l'adhésion cellule-cellule ou avec un inhibiteur de ROCK pour perturber la réorganisation du cytosquelette d'actine. Après différents temps de culture en lévitation, les caractéristiques biologiques des cellules ont été établies par marquage LIVE/DEAD, cytométrie en flux, immunofluorescence, analyses transcriptomiques, évaluation de la capacité de métabolisme de médicaments, et dosages d'albumine et d'urée. La morphologie des cellules hépatiques a été étudiée par immunomarquage des transporteurs, ainsi que par microscopie électronique à balayage. La stabilité génétique après lévitation a été évaluée par puce à ADN et études de caryotypes. Nos résultats démontrent le potentiel de la lévitation acoustique comme système microphysiologique alternatif pour la culture 3D de divers types cellulaires, en monoculture ou en coculture. Nous avons montré la robustesse de cette approche grâce à des études mécanistiques, biologiques et fonctionnelles. Ces résultats ouvrent la voie à de nouvelles recherches en mécanobiologie, en pharmaco-toxicologie et en thérapie cellulaire.

Mots-clés : Lévitation acoustique, Acoustofluidique, Sphéroïde, Culture cellulaire, Foie, Système microphysiologique

Fabrication and culture of hepatic cell sheets and spheroids in acoustic levitation

Liver is the largest endocrine organ in humans which undertakes many vital functions including detoxification of toxins and drugs, synthesis of blood proteins such as albumin and coagulation factors, secretion of bile, glucidic metabolism and storage. The liver is unique in its capacity of regeneration as it can grow back to its initial volume after a hepatectomy of up to 70 %. However, in cases of repeated, severe injury, the liver loses its regenerative potential and needs to be replaced. The only therapeutic alternative that exists today is liver transplantation which is limited by an increasing number of demands and a decreasing number of donors. Therefore, tissue engineering approaches could be a promising alternative to hepatic grafts. The liver is mainly composed of hepatocytes representing 80 % of the hepatic volume, as well as other cell types including cholangiocytes, endothelial cells, stellate cells, Kupffer cells, and conjunctive tissue. In the liver, mature hepatocytes are highly polarized cells which interact with other hepatocytes on their apical side, and liver sinusoidal endothelial cells through their basal membrane. This structure is very important for their functionality. When hepatocytes are isolated from the liver and amplified in 2D culture in-vitro, they lose their polarity, their functionality and their capacity to proliferate. In recent years, many research teams have explored new 3D culture methods in order to improve hepatic cell functionality in-vitro. These techniques include sandwich cultures using hydrogels, spheroid and organoid formation, cell sheet technology, 3D printing, etc. Despite the proof of concept that 3D culture is beneficial for improving hepatocyte viability and functionality, these techniques have their limits such as the use of poorly defined extracellular matrix and hydrogels like Matrigel, or the lack of reproducibility in case of spheroid and organoid formation. Therefore, a new scaffold free, reproducible method which would allow rapid restoration of cell junctions and polarity could be beneficial for hepatocyte viability and functionality. Acoustic levitation has been previously used by our teams for short-term cultures of epithelial and mesenchymal cells. We showed that this technique allowed the formation of distinct cell sheets very rapidly. We developed a new acoustic system which allows long term cell culture during several weeks. We evaluated the viability, the self-organization and the functionality of the cells in our system, and obtained very encouraging results for 3D cell culture of mesenchymal stromal cells, hepatic cells, endothelial cells and a co-culture model of hepatic and endothelial cells. The self-organizational behaviors, from cell sheets to spheroids have been investigated thanks to a timelapse analysis of the side-view of the acoustic levitation device. To investigate the self-organizational mechanisms, cells have been subjected to different amplitudes of the acoustic radiation force, as well as treated with a calcium chelator to prevent cell-cell adhesion, or a ROCK-inhibitor to disrupt the reorganization of the actin cytoskeleton. The cells in acoustic levitation were characterized at different time points by LIVE/DEAD staining, flow cytometry, immunofluorescence, drug metabolism capacities and transcriptomic analyzes, as well as albumin and urea dosage. HepaRG morphology was evaluated by immunostaining of transporters, as well as scanning electron microscopy. Genetic stability after levitation was evaluated via CGH array and karyotype studies. Our results demonstrate the potential of acoustic levitation as an alternative 3D culture microphysiological system for various cell types, in monoculture or coculture. We showed the reliability of this approach through mechanistic, biological and functional studies. These results pave the way towards further application for cell therapy, mechanobiology and drug discovery.

Keywords: acoustic levitation, acoustofluidics, spheroid, cell culture, liver, microphysiological system

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont entourée, accompagnée et qui ont créé un environnement propice aux échanges intellectuels et scientifiques ; sans elles, l'accomplissement de cette thèse n'aurait pas été possible.

Je remercie tout d'abord mes directeurs de thèse, Dr Jean-Luc Aider, directeur de recherche CNRS au laboratoire Physique et mécanique des milieux hétérogènes (PMMH) et Pr Jérôme Larghero, responsable de l'unité fonctionnelle de Thérapie cellulaire de l'hôpital Saint-Louis (Inserm U976, CIC-BT CBT501) pour leur aide précieuse, leur soutien et leur confiance tout au long de cette thèse.

J'adresse tous mes remerciements au Dr Anne Corlu, directrice de recherche CNRS et membre de l'Université de Rennes 1, ainsi qu'au Pr Mathieu Hautefeuille, professeur à Sorbonne Université, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'au Dr Eleonora de Martin, hépatologue à l'hôpital Paul Brousse et membre de l'Université Paris-Saclay, qui a accepté d'évaluer mes travaux en tant qu'examinatrice.

Je tiens à remercier tout particulièrement ceux qui ont joué un rôle prépondérant au sein du projet lévitation acoustique de cellules hépatiques, tout d'abord Lousineh et Nathan pour leur appui, leurs conseils, leur bienveillance et leur approche inspirante de la recherche, ainsi que Duván avec qui cela a été une joie de travailler et d'échanger.

Un immense merci aux autres membres de l'équipe acoustofluidique et de l'équipe thérapie cellulaire, stagiaires, doctorants et chercheurs, pour leur esprit d'entraide et les moments conviviaux passés ensemble. Je souhaite aussi remercier tous les membres du laboratoire Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes, de l'unité Immunologie Humaine, Pathophysiologie, Immunothérapie, de la plateforme technologique Institut de Recherche Saint Louis et du CytoMorphoLab que j'ai pu rencontrer lors de cette thèse.

J'adresse un grand merci aux personnels et étudiants de l'ED 474 FIRE pour ces rencontres et formations enrichissantes qui ont ponctué le travail de thèse. Et j'exprime toute ma gratitude à l'équipe de la direction de la marque et de la communication de l'Université Paris-Saclay pour leur accueil et leur partage.

Enfin, je remercie infiniment mes proches, ma famille et mes amis pour leur soutien indéfectible lors de ces trois années.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
0.1 Français	iii
0.2 English	iv
Remerciements	vii
Table des matières	xi
Liste des figures	xviii
Liste des tableaux	xix
	1
Abréviations	1
Préambule	5
I État de l’art	7
1 Le foie : un organe essentiel et complexe	9
1.1 Structure et fonctions du foie	12
1.1.1 Un organe imposant et très irrigué, lieu de production et d’échanges avec le sang et la bile	12
1.1.2 Micro-architecture : une mosaïque complexe qui repose sur différents types cellulaires	13
1.1.3 Les hépatocytes, usines polyvalentes et vitales	15
1.2 Mécanismes de détérioration, maladies, greffe	19
1.2.1 Maladies hépatiques et conséquences pour l’organe	19
1.2.2 Le traitement par greffe hépatique	19
1.3 Conclusion du chapitre	20
2 Culture <i>in vitro</i> du foie : méthodes, objectifs et limites	21
2.1 Les modèles cellulaires d’hépatocytes	24
2.1.1 Hépatocytes primaires	24
2.1.2 Lignées cellulaires	25
2.1.3 Hépatoblastes dérivés de cellules souches iPS	28
2.2 Culture en 3D de sphéroïdes	28
2.2.1 Panorama des méthodes de formation de sphéroïdes	29
2.3 Analyse morphologique et biologique des sphéroïdes : choix des critères de validation du modèle <i>in vitro</i>	35
2.3.1 Critères de viabilité	35
2.3.2 Reproductibilité, limite de taille et cœur nécrotique	36
2.3.3 Critères pour la validation fonctionnelle des hépatocytes	37
2.4 Applications actuelles de la culture <i>in vitro</i> du foie	40

2.5	Conclusion du chapitre	42
3	Acoustofluidique pour la culture cellulaire	43
3.1	Principes physiques de la lévitation acoustique et équations descriptives	46
3.1.1	Ondes acoustiques	46
3.1.2	Principes de la lévitation acoustique	47
3.1.3	Équations utilisées pour décrire la force acoustique de radiation (ARF)	50
3.1.4	<i>Streaming</i> acoustique	52
3.1.5	Limite de Rayleigh et influence du milieu de propagation	52
3.2	Lévitation acoustique pour l'ingénierie tissulaire	54
3.2.1	Lévitation de cellules à court terme	54
3.2.2	Impact des ultrasons sur la viabilité et la fonctionnalité des cellules	57
3.2.3	Température	58
3.2.4	Cavitation	58
3.2.5	<i>Streaming</i> acoustique	58
3.2.6	Altération de l'ADN et de l'expression génique	58
3.2.7	Viabilité	59
3.3	Conclusion du chapitre	59
4	Conception des systèmes microphysiologiques	61
4.1	Considérations à prendre en compte lors de la conception de la cavité	64
4.2	Choix de l'échelle	64
4.3	Processus de fabrication et matériaux utilisés	66
4.4	Bulles et dispositifs microfluidiques	69
4.4.1	Sources d'apparition des bulles	69
4.4.2	Gestion des bulles	70
4.5	<i>Streaming</i> acoustique	71
4.6	Conclusion du chapitre	72
5	Coculture de cellules hépatiques avec d'autres types cellulaires	73
5.1	Le dialogue entre types cellulaires <i>in vivo</i>	76
5.2	Coculture <i>in vitro</i>	76
5.2.1	Types cellulaires cocultivés avec des cellules de type hépatocytes	77
5.2.2	Apport des cocultures pour la fonctionnalité	77
5.2.3	Prévascularisation	78
5.2.4	Auto-organisation	78
5.3	Recensement de cocultures d'hépatocytes avec d'autres types cellulaires	79
5.4	Conclusion du chapitre	81
6	Auto-organisation des sphéroïdes et organoïdes : mécanique cellulaire et tissulaire appliquée aux organoïdes	83
6.1	Approches <i>top-down</i> et <i>bottom-up</i>	86
6.2	Définition du vocabulaire relatif à l'auto-organisation	87
6.2.1	Apport des dynamiques d'auto-organisation des sphéroïdes pour la biologie fondamentale	88
6.3	Analyses comparatives des dynamiques d'auto-organisation	89
6.3.1	Influence des types cellulaires	89

6.3.2	Influence des méthodes de culture	90
6.4	Auto-organisation en lévitation acoustique	90
6.5	Implication du cytosquelette et de l'adhésion cellulaire dans l'auto-organisation	92
6.5.1	L'adhésion cellulaire	92
6.5.2	Le cytosquelette	95
6.6	Conclusion du chapitre	96
II	Contribution	99
7	Acoustic levitation as a tool for cell-driven self-organization of human cell spheroids during long-term 3D culture	103
8	Evaluation of hepatic spheroids formation and culture in acoustic levitation : a comparative study	105
9	Études exploratoires complémentaires	107
9.1	Lévitation d'hépatocytes primaires cryopréservés	109
9.1.1	Matériels et méthodes	109
9.1.2	Résultats	109
9.1.3	Discussion	110
9.2	Optimisation et étude de la coculture entre cellules HepaRG et HUVEC . .	111
9.2.1	Matériels et méthodes	111
9.2.2	Résultats	111
9.2.3	Discussion	112
9.3	Imagerie confocale en temps réel de l'auto-organisation	113
9.3.1	Matériels et méthodes	113
9.3.2	Résultats	114
9.3.3	Discussion	115
9.4	Conclusion du chapitre	115
III	Discussion générale	117
	Conclusion	119
	Limites et perspectives de cette étude	119
	Bibliographie	125

TABLE DES FIGURES

1.1	Résumé graphique du chapitre 1.	11
1.2	Macro-architecture hépatique.	12
1.3	A) Foie, B) Lobule hépatique, C) Sinusoïde hépatique, D) Zoom sur le lobule hépatique, présentant l'organisation des différents types cellulaires autour d'un sinusoïde. D'après LIU <i>et al.</i> , 2022.	13
1.4	Les cellules endothéliales sinusoïdales hépatiques.	14
1.5	La polarité des hépatocytes.	15
1.6	Mécanisme de détoxification d'un xénobiotique. L'absorption est suivie d'une phase d'oxydation, d'une phase de conjugaison et enfin d'une phase d'ex-trusion. D'après ESTEVES, RUEFF et KRANENDONK, 2021.	18
1.7	Détail de la nomenclature de CYP450. Les cytochromes sont répartis en familles et sous-familles. D'après ESTEVES, RUEFF et KRANENDONK, 2021.	18
2.1	Résumé graphique du chapitre 2.	23
2.2	Propriétés de différents types cellulaires : hépatocytes issus d'animaux, HepG2, HepaRG, hépatocytes primaires humains, hépatocytes primaires humains cryogénisés et hépatoblastes dérivés des cellules iPS. Le principal incon-vénient des cellules HepaRG relevé ici est leur activité des cytochromes, quali-fiée de "moyenne". Leurs principaux avantages sont leur facilité d'obtention, leur bonne viabilité, leur longévité et leur faible coût. D'après BECKWITT <i>et al.</i> , 2018.	24
2.3	Panorama de l'utilisation des hépatocytes primaires en culture <i>in vitro</i> . Ils peuvent être utilisés dans une grande variété de systèmes de culture et d'ap-plications, et ont été exploités dans de nombreuses applications commer-ciales. D'après LAUSCHKE <i>et al.</i> , 2019.	25
2.4	Morphologie des cellules HepaRG en culture 2D, observée en microscopie à contraste de phase (amplification 10X, barre d'échelle 100 μm), A) Après 15 jours de culture, B) Après 30 jours de culture, dont 15 jours exposés à du DMSO 2%, montrant des cellules à la morphologie épithéliale (EL), à la mor-phologie hépatique (H) et des canalicules biliaires (BL) d'après MEIRINHO <i>et al.</i> , 2022.	26
2.5	Présentation de différentes techniques de formation de sphéroïdes : A) <i>Han-ging drop</i> , B) Surface non-adhérente, C) Bioréacteur classique, D) Bioréac-teur rotatif, E) Plaque à ultra-faible attachement , F) Revêtement hydro-phobe, G) Lévitacion magnétique et H) Hydrogel. Tous ces procédés agrègent les cellules loin des surfaces plastiques rigides sur lesquelles sont réalisées la culture cellulaire standard. Ces systèmes 3D favorisent les interactions cellule-cellule plutôt que cellule-surface. D'après TEVLEK <i>et al.</i> , 2023.	30
2.6	L'intégration de biosenseurs dans les foies sur puce permet le suivi en continu de la concentration en oxygène, de la température ou encore de l'activité électrique, et ainsi d'enrichir leur potentiel pour la culture en 3D biomimé-tique. D'après LIU <i>et al.</i> , 2022.	32

2.7	Présentation de techniques d'assemblage de cellules imposé par des forces extérieures (<i>externally driven assembly</i>). Ces forces peuvent être magnétiques, acoustiques, optiques ou électriques. Adapté d'après SOTO <i>et al.</i> , 2021.	33
2.8	Comparaison de différentes techniques de formation de sphéroïdes. L'assemblage par lévitation acoustique est plus rapide que les autres techniques et permet de former un grand nombre de sphéroïdes uniformes. La microfluidique apporte de nombreux avantages, par exemple le contrôle de la taille, un haut rendement et le contrôle du micro-environnement. D'après CHEN <i>et al.</i> , 2019 (A) et ACHILLI, MEYER et MORGAN, 2012 (B).	34
2.9	Caractérisation de sphéroïdes de cellules pancréatiques de souris Panc02. a) Marquage du sphéroïde entier au LIVE/DEAD, b) Viabilité cellulaire pendant sept jours, c) Nombre de cellules au cours du temps, d) Aire du sphéroïde au cours du temps. D'après CHEN <i>et al.</i> , 2019.	35
2.10	Cœur hypoxique (rouge) dans des sphéroïdes a) Schéma des 3 zones, b) Détection du cœur hypoxique dans des cellules P19. D'après CHEN <i>et al.</i> , 2019.	36
2.11	Répartition en taille de sphéroïdes de cellules HepaRG formés dans une plaque 384 puits. Les tailles sont homogènes. D'après RAMAIAHGARI <i>et al.</i> , 2017.	36
2.12	Sphéroïde de cellules HepaRG observé en microscopie électronique à balayage après 2 semaines de culture sous flux. Le sphéroïde est compact. Les flèches indiquent les jonctions serrées et les triangles les micropores. D'après TENG <i>et al.</i> , 2021).	37
2.13	Détection de marqueurs de polarité dans des coupes de sphéroïdes de cellules HepaRG.	38
2.14	Visualisation de différents marqueurs hépatiques à l'intérieur d'un sphéroïde grâce à des coupes immunohistochimiques.	38
2.15	Activité métabolique de onze enzymes de phase I et phase II chez différents types cellulaires hépatiques cultivés <i>in vitro</i> en 2D : HepG2 (jour 4), iCell® dérivés d'iPS (jour 4), HepaRG™ (jour 7), HepatoPac® (jour 8), HμREL™ (jour 8), et pool d'hépatocytes primaires cryopréservés (jour 0). D'après MONCKTON, BROWN et KHETANI, 2021.	39
2.16	Récepteurs et cytochromes impliqués dans la détoxification de la rifampicine, de l'oméprazole, de CITCO et de PF-06282999. D'après MOSCOVITZ <i>et al.</i> , 2018.	40
2.17	Stratégie de détection des insuffisances hépatiques aiguës d'origine médicamenteuse (<i>Drug-induced liver injury</i> ou DILI) <i>in vitro</i> . Les systèmes en 3D sont recommandés pour la deuxième étape des tests de pharmacotoxicologie, car ils sont intermédiaires en terme de coût, facilité d'usage et complexité biologique. D'après WEAVER <i>et al.</i> , 2020.	41
3.1	Résumé graphique du chapitre 3.	45
3.2	Visualisation des plans nodaux (lignes horizontales blanches), des anti-nœuds de pression (lignes horizontales sombres) et de particules macroscopiques en lévitation acoustique dans l'air. Adapté de HARVARD NATURAL SCIENCES LECTURE DEMONSTRATIONS, 2017.	47

3.3	A) Représentation d'un dispositif de lévitation acoustique, B) Champ de pression acoustique (centre gauche), C) Champ de vitesse des particules (centre droit), D) Forces de radiation acoustique (droite) d'une onde stationnaire. Adapté d'après LAACKMANN <i>et al.</i> , 2011.	48
3.4	Agrégation de cellules dans une cavité acoustofluidique possédant trois plans nodaux (lignes pointillées); F_{ac} : composante axiale de l'ARF; F_T : composante transversale; sinusoïde bleue : représentation des maxima du champ de pression acoustique.	49
3.5	Établissement de <i>streaming</i> dans une cavité acoustofluidique; bleu : champ de pression acoustique; rouge et noir : rouleaux de <i>streaming</i> . Plusieurs rouleaux de <i>streaming</i> se forment dans une cavité. D'après LEI <i>et al.</i> , 2018. . .	52
3.6	Lévitation de petits organismes macroscopiques dans l'air. La limite de Rayleigh est plus élevée dans l'air que dans l'eau. D'après XIE <i>et al.</i> , 2006	54
3.7	Illustration des applications de l'acoustofluidique en structuration de motifs cellulaires et ingénierie tissulaire. Elle permet à la fois de créer des assemblages cellulaires, et de manipuler les sphéroïdes ainsi créés. D'après WU <i>et al.</i> , 2022.	54
3.8	a) Agrégation de cellules HepG2 (feuillet cellulaire) pendant 5 minutes en lévitation acoustique. D'après BAZOU <i>et al.</i> , 2008, b) Agrégation de cellules HepG2 (sphéroïdes) grâce à des ondes acoustiques de surface (SAW). D'après CHEN <i>et al.</i> , 2016.	56
3.9	Synthèse des différents effets potentiellement induits par les ultrasons sur les cellules. Ils s'agit de l'augmentation de température, de la compression, de la perméabilité des membranes et des microbulles. D'après DU <i>et al.</i> , 2022.	57
4.1	Résumé graphique du chapitre 4.	63
4.2	Synthèse des différents bioréacteurs mettant en oeuvre différentes échelles de culture. Les systèmes micro-milli fluidiques combinent certains avantages des systèmes millifluidiques avec certains des systèmes microfluidiques. D'après XUE <i>et al.</i> , 2021.	65
4.3	Représentation de la cavité acoustique utilisée pour former puis cultiver les sphéroïdes cellulaires en lévitation acoustique. Les principaux paramètres géométriques, acoustiques et fluidiques sont résumés sur ce schéma. La hauteur des cavités utilisées à été fixée à 10 mm, ce qui permet de créer 30 plans de lévitation et donc environ 30 sphéroïdes par puce.	65
4.4	Photo de notre puce micro-millifluidique conçue pour notre système micro-physiologique. La première cavité (à gauche) permet le passage du milieu de culture et la capture des bulles d'air. Elle est reliée par un conduit à la seconde cavité (à droite) dans laquelle sont créés et cultivés en lévitation acoustique les sphéroïdes.	66

4.5	Coupe longitudinale d'une puce acoustofluidique "multi-layer", mettant en évidence les différentes couches la composant : le transducteur émet l'onde ultrasonore qui traverse une couche d'adaptation acoustique (<i>matching layer</i>) puis la paroi supérieure de la cavité (<i>transmitter</i>). Après avoir traversé toute la cavité, l'onde ultrasonore est réfléchiée par la paroi inférieure (<i>reflector</i>). Les matériaux et épaisseurs de ces différentes couches jouent un rôle critique dans l'efficacité de la cavité résonante. En fonction de ces paramètres, il sera possible ou non de faire léviter des cellules et / ou des sphéroïdes. Adapté de LENSCHOF <i>et al.</i> , 2012.	67
4.6	Effets biologiques du stress de cisaillement sur différents types cellulaires, recensés dans KIM <i>et al.</i> , 2007	69
4.7	Renouvellement complet du milieu dans la cavité en 3 jours (remplacement d'eau par du milieu HepaRG, flux 10 μ L/h). Sur chaque image, à droite se trouve la cavité anti-bulle qui alimente à gauche la cavité acoustofluidique. On peut ainsi observer la formation des bulles piégées dans la cavité antibulle à partir de 24 heures de culture. Aucune bulle ne se forme dans la cavité acoustofluidique, même après 96 heures de culture.	69
4.8	Les méthodes de capture de bulles les plus communes selon GAO <i>et al.</i> , 2020.	70
4.9	Exemples de pièges antibulles.	71
4.10	Effet de l'augmentation du voltage sur le <i>streaming</i> acoustique menant à des distributions inhomogènes de particules sur les différents noeuds de pression. D'après WIKLUND <i>et al.</i> , 2004).	72
5.1	Résumé graphique du Chapitre 5.	75
5.2	a) Vascularisation sur puce. b) Vascularisation après transplantation chez une souris.	78
5.3	<i>Timelapse</i> de l'auto-organisation de sphéroïdes d'une coculture de cellules MS1 (rouge) et de cellules HUVEC (vert). D'après KOJIMA, TAKEUCHI et SAKAI, 2011.	79
5.4	Différents exemples de coculture d'hépatocytes avec d'autres types cellulaires et milieux de culture associés. Les proportions de cellules et de milieux peuvent se révéler critiques et difficiles à déterminer <i>a priori</i>	80
6.1	Résumé graphique du chapitre 6.	85
6.2	Illustration des approches d'ingénierie tissulaire <i>top-down</i> et <i>bottom-up</i> . D'après LU, LI et CHEN, 2013. Dans un cas, on s'appuie sur un support (<i>scaffold</i>) existant sur lequel on va faire adhérer les cellules (A). Dans l'autre, on assemble les cellules pour tenter de fabriquer le tissu cible grâce aux mécanismes d'auto-assemblage cellulaire (B).	86
6.3	Trois mécanismes basiques d'auto-organisation spontanée, c'est-à-dire sans intervention ou force extérieure. Dans les trois cas présentés, au moins deux types cellulaires sont présents. D'après SASAI, 2013.	87
6.4	Représentation de la stratégie du groupe de recherche de Takebe <i>et al.</i> pour générer du foie humain <i>in vitro</i> en mimant le processus de morphogenèse <i>in vivo</i> . D'après TAKEBE <i>et al.</i> , 2012.	88

6.5	Des agrégats de trois types d'hépatocarcinome cultivés en culture <i>hanging drop</i> pendant 48 heures ont des morphologies très différentes. Les courbes illustrent la dynamique de compactage des agrégats (réduction de l'aire projetée par rapport à l'aire initiale) pour les trois types cellulaires. Le compactage le plus lent est celui des PLC/PRF/5. Adapté d'après LIN <i>et al.</i> , 2006.	89
6.6	Auto-plier de feuillets cellulaires (coupe), composés de cellules HepaRG (C), d'une coculture de cellules HepaRG et fibroblastes dérivés de peau humaine TIG-118 (E) ou de fibroblastes TIG-118 seuls (F). Adapté d'après SAKAI <i>et al.</i> , 2013.	90
6.7	Des agrégats de lignées cancéreuses pancréatiques formés en lévitation acoustique sont plus rapidement cohésifs que ceux qui sont formés en plaque à faible adhérence à fond rond avec centrifugation initiale de 3 minutes à 400 g (figure de gauche). Des agrégats formés grâce à l'acoustophorèse ont des formes différentes selon le type cellulaire (figure de droite). D'après CHEN <i>et al.</i> , 2019.	91
6.8	Les cadhérines sont impliquées dans l'adhésion cellule-cellule et l'auto-tri. D'après ALBERTS <i>et al.</i> , 2002.	93
6.9	Des agrégats très cohésifs (forte adhésion cellulaire) ou peu cohésifs auront des dynamiques de réadhésion différentes, respectivement similaires au comportement d'un liquide ou d'un gaz. D'après DOUEZAN <i>et al.</i> , 2011.	94
6.10	Gauche : taille (pourcentage de l'aire initiale) d'agrégats de cellules épithéliales 16HBE14o- ou de billes inertes lévitées pendant plusieurs heures ; un feuillet cellulaire se contracte au cours des 24 heures de lévitation, alors que les billes gardent leur répartition initiale. Milieu et droite : après l'arrêt des ultrasons, l'agrégat consolidé par les jonctions adhérentes en présence de Ca^{2+} reste cohésif, alors que l'agrégat cultivé en l'absence de Ca^{2+} est dispersé dès que les forces acoustiques cessent de s'exercer. D'après KHEDR <i>et al.</i> , 2019.	94
6.11	Organisation des filaments d'actine dans différents systèmes de culture 2D ou 3D.	96
9.1	a) Vue de côté des 60 premières heures de lévitation acoustique d'agrégats de cellules d'hépatocytes primaires humains cryopréservés ; barres d'échelle : 500 μm , b) Évolution de la circularité (σ) au cours de la culture dans trois puces contenant des hépatocytes primaires et dans une puce avec des cellules HepaRG ; lévitations n° 1 et 2 : lot HUM4125 ; lévitation n°3 : lot LHuf17905A , c) Viabilité cellulaire des cellules issues de ces trois lévitations après dissociation puis marquage LIVE/DEAD, d) Réadhésion d'un sphéroïde d'hépatocytes primaires HUM4125 sur une plaque de culture recouverte de collagène, après six jours de lévitation ; barre d'échelle : 200 μm	110
9.2	Test d'optimisation du milieu de culture avec différentes proportions de milieu endothélial EGM2 et de milieu hépatique HepaRG ; seule la condition 80% de milieu EGM2 et 20% de milieu HepaRG permet la survie et la prolifération pendant trois jours des deux types cellulaires cultivés individuellement. Barre d'échelle : 200 μm	112

9.3	a) Coculture en 2D de cellules HepaRG (vertes puis non marquées) et d'HUVEC (rouges); les flèches blanches indiquent des amas resserrés d'HUVEC; barres d'échelle : 100 μm , b) Marquage LIVE/DEAD de cellules HepaRG (flèche noire) et HUVEC (flèche blanche) à la fin de six jours de culture, c) Lévitiation d'une coculture pendant six jours; barre d'échelle 200 μm , d) Proportion de cellules marquées par l'anticorps anti-CD105 (marqueur endothélial) avant et après lévitiation d'HUVEC seules ou d'une coculture ensemencée à 50% de chaque type cellulaire.	113
9.4	Imagerie en temps réel pendant 10 heures d'un sphéroïde de cellules MSC (vu du haut) au microscope confocal; barre d'échelle : 200 μm	114
9.5	Manipulation acoustique pour la formation de motifs	121
9.6	Les systèmes microphysiologiques pour le développement de médicaments et la médecine régénérative; A) Approche autologue B) Approche allogénique. D'après PRIOR, INACIO et HUCH, 2019	122
9.7	Enjeux présents et futurs de la greffe de foie, comparaison de différentes approches : thérapie cellulaire de foies endommagés, injection d'organoïdes, ingénierie tissulaire. D'après TEN DAM <i>et al.</i> , 2023	123

LISTE DES TABLEAUX

1.1	Principaux types de cellules hépatiques. D'après EHRlich <i>et al.</i> , 2019	14
1.2	Zonation fonctionnelle du foie. D'après EHRlich <i>et al.</i> , 2019.	16
1.3	Spécialisation des CYP450. D'après ESTEVES, RUEFF et KRANENDONK, 2021.	18
2.1	Valeurs d'augmentation de l'expression d'ARNm ou de l'activité protéique des cytochromes chez des cellules HepaRG après traitement à la rifampicine (RIF) ou l'oméprazole (OME); "ND" : Non déterminé et "/" : Non étudié	40
3.1	Influence théorique de l'ARF selon la taille de la particule	53
3.2	Expériences de lévitation acoustique de cellules, classées par durée croissante	55
4.1	Propriétés de l'eau et du PDMS (ratio 1 :10 d'agent durcisseur et de base) à une température de 25°C (LIU <i>et al.</i> , 2018).	68

ABRÉVIATIONS

- 2D : Deux dimensions
3D : Trois dimensions
ABCC2 : Voir MRP2
ADME-Tox ou ADMET : Absorption, distribution, métabolisme, excrétion et toxicité
AD-MSCs : *Adipose-derived mesenchymal stromal cells*, voir MSC
ADN : Acide désoxyribonucléique
AhR : *Aryl hydrocarbon receptor*, récepteur d'aryl hydrocarbure
ALB : Albumine
ALF : *Acute liver failure*, insuffisance hépatique aiguë
ARF : *Acoustic radiation force* ou Force acoustique de radiation
ARG1 : Arginase 1
ATP : Adénosine triphosphate
BAL : *Bioartificial extracorporeal liver*, foie bioartificiel extracorporel
BAW : *Bulk acoustic wave*, onde acoustique de surface
 β FGF : *Basic fibroblast growth factor*, facteur de croissance basique des fibroblastes
BMP : *Bone morphogenetic protein*, protéine osseuse morphogénétique
BSEP : *Bile salt export pump*
CAR : *Constitutive androstane receptor* ou Récepteur constitutif des androstanes, aussi appelé NR1i3
CD31 : *Cluster of differentiation 31*
CD105 : *Cluster of differentiation 105* ou endogline, glycoprotéine transmembranaire impliquée dans l'angiogenèse
CDFDA : 5(6)-Carboxyfluorescéine diacétate
CK : Cytokératine, ou KRT
CYP : Cytochrome DEX : Dexaméthasone
DILI : *Drug-induced liver injury*, insuffisance hépatique aiguë d'origine médicamenteuse
DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO : Diméthylsulfoxyde
dPEC : Cellules dérivées des progéniteurs circulants endothéliaux isolés à partir du sang de cordon ombilical
ECGF : *Endothelial cell growth factor*, facteur de croissance des cellules endothéliales
ECM : *Extracellular matrix*, matrice extra-cellulaire
EDTA : *Ethylenediaminetetraacetic acid*, éthylènediaminetétraacétique
EGM2 : *Endothelial Cell Growth Medium 2*
EGTA : Acide egtazique
 F_{ac} : Composante axiale de l'ARF, force de radiation primaire
FBS : *Fetal Bovine Serum*
FGF : *Fibroblast growth factor*, facteur de croissance des fibroblastes
FITC : Fluorescéine isothiocyanate
FOXA2 (ou HNF3B) : *Hepatocyte nuclear factor 3-beta*, facteur nucléaire hépatocytaire 3 beta
 F_T : Composante radiale de l'ARF, force de radiation secondaire
GATA4 : *GATA Binding Protein 4*
GFP : *Green fluorescent protein*, protéine verte de fluorescence

GMP : *Good Manufacturing Practice*, bonnes pratiques de fabrication
HepaRG : Lignée cellulaire hépatique
HepG2 : *Human Caucasian hepatocyte carcinoma Hep G2*, lignée cellulaire hépatique
HES : *Hematoxylin Eosin Saffron*, coloration à l'hématoxyline et à l'éosine
HGF : *Hepatocyte growth factor*, facteur de croissance des hépatocytes
HIF1A : *Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha*
HIFU : *High intensity focused ultrasounds*, ultrasons de haute intensité
HNF4 α : *Hepatocyte nuclear factor 4 α* , facteur hépatique nucléaire 4 α
HUVEC : *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, progéniteurs endothéliaux isolés à partir de la veine du cordon ombilical
Hz : Hertz
IL-6 : Interleukine-6
iPS : *Induced pluripotent stem cell*, cellule souche pluripotente induite
KHz : Kilohertz
Ki67 : Marqueur de prolifération, ou Ki-67, ou KI67
KRT : Voir CK
LIVE/DEAD : Marquage calcéine/éthidium de viabilité/mortalité cellulaire
LSEC : *Liver Sinusoidal Endothelial Cell*, cellules endothéliales sinusoidales du foie
MHz : MegaHertz
MPS : *Microphysiological system*, système microphysiologique
MRP2/3 : *Multidrug resistance-associated protein 2/3*, protéine 2/3 associée à la résistance multimédicamenteuse, ou *ATP Binding Cassette Subfamily C Member 2/3 (ABCC2/3)*, membre 2/3 de la sous-famille C des cassettes de liaison à l'ADN
MSC : *Mesenchymal stromal cells*, cellule stromale mésenchymateuse
MTT : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
N-CAM : *Neural cell adhesion molecule*
OSM : Oncostatin M
Pa : Pascal
PBS : *Phosphate-Buffered Saline*
PDMS : Polydiméthylsiloxane
PHH : *Primary human hepatocyte*, hépatocyte primaire humain
PIV : *Particle image velocimetry*, vélocimétrie par Image de Particule
PTFE : Polytétrafluoroéthylène
PXR : *Pregnane X receptor*, récepteur prégénane X
ROCK : *Rho-associated protein kinase*, protéine kinase associée à Rho
RT-qPCR : *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*, réaction de polymérisation en chaîne quantitative par transcription inverse
SAW : *Surface acoustic wave*, onde acoustique de surface
TGF- α : *Transforming growth factor alpha*, facteur de croissance
TP53 : *Tumor protein p53*
UV : Ultraviolet
VEGF : *Vascular endothelial growth factor*, facteurs de croissance endothéliaux
Vpp : *Peak-to-peak voltage*, tension crête à crête
WNT3A : Membre de la famille WNT (*wingless integration site*)

PRÉAMBULE

Ce manuscrit présente une technologie innovante pour la culture de cellules humaines en lévitation acoustique. Cette technique acoustofluidique a été ici utilisée dans la perspective de créer un modèle tridimensionnel hépatique *in vitro* utilisable pour la recherche fondamentale, la thérapie cellulaire et des analyses pharmaco-toxicologiques.

Étudiée au cours de cette thèse pour la première fois à long terme, la lévitation acoustique de cellules hépatiques exploite les forces produites par une onde stationnaire ultrasonore pour maintenir les cellules en suspension dans le milieu de culture, loin des parois d'un système microphysiologique. Au cours de la culture, les cellules s'auto-organisent en sphéroïdes.

L'état de l'art réalisé présente la biologie du foie (chapitre 1), les systèmes de culture *in vitro* existants (chapitre 2), l'acoustofluidique pour la culture cellulaire (chapitre 3), la conception de systèmes microphysiologiques (chapitre 4), l'apport de la coculture (chapitre 5) et l'auto-organisation des sphéroïdes (chapitre 6).

À la suite de ce positionnement dans l'espace bibliographique, une présentation individuelle introduit chaque article scientifique.

Un premier article explore l'auto-organisation de trois types cellulaires humains en monoculture ou coculture, pendant plusieurs jours en lévitation acoustique.

Dans un second article, nous avons évalué la viabilité, la stabilité génétique et la fonctionnalité de cellules hépatiques HepaRG après plusieurs jours de lévitation.

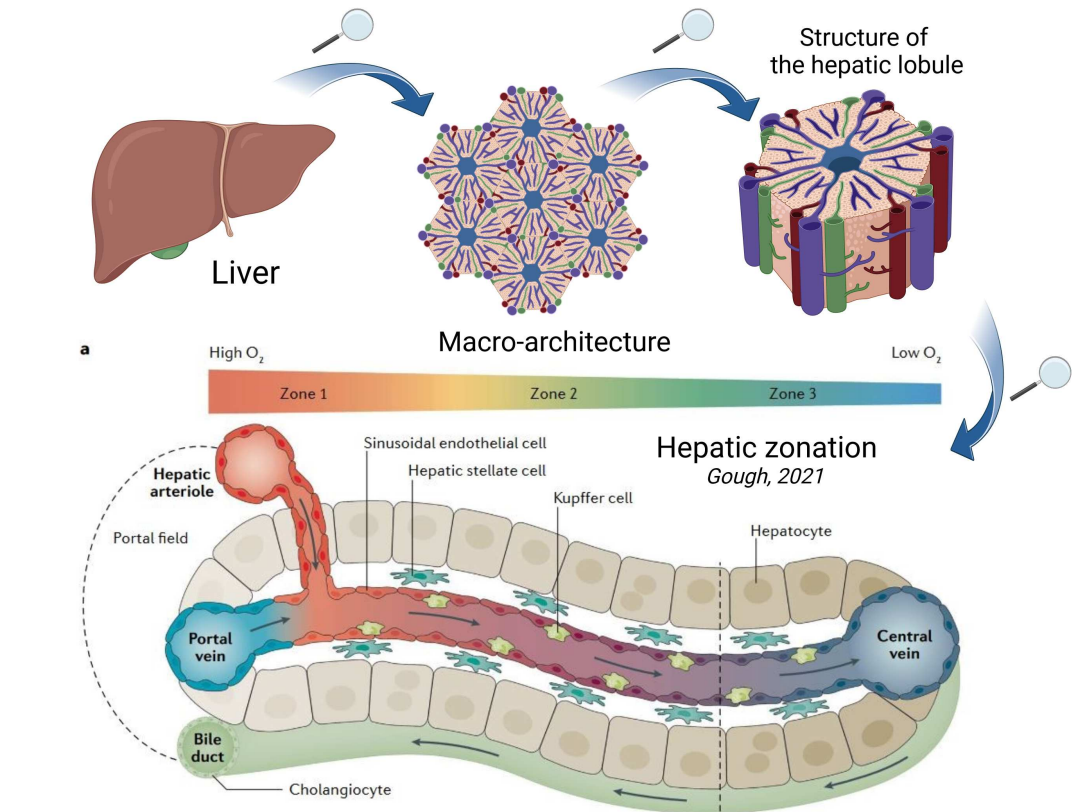
Enfin, une conclusion générale décrit les limites de cette étude et les nouveaux enjeux qu'elle soulève.

Première partie

État de l'art

LE FOIE : UN ORGANE ESSENTIEL ET COMPLEXE

1.1	Structure et fonctions du foie	12
1.1.1	Un organe imposant et très irrigué, lieu de production et d'échanges avec le sang et la bile	12
1.1.2	Micro-architecture : une mosaïque complexe qui repose sur différents types cellulaires	13
1.1.3	Les hépatocytes, usines polyvalentes et vitales	15
1.2	Mécanismes de détérioration, maladies, greffe	19
1.2.1	Maladies hépatiques et conséquences pour l'organe	19
1.2.2	Le traitement par greffe hépatique	19
1.3	Conclusion du chapitre	20



A zone of exchange (metabolism of lipid, glucids, xenobiotics, etc.), at the interface between blood and bile

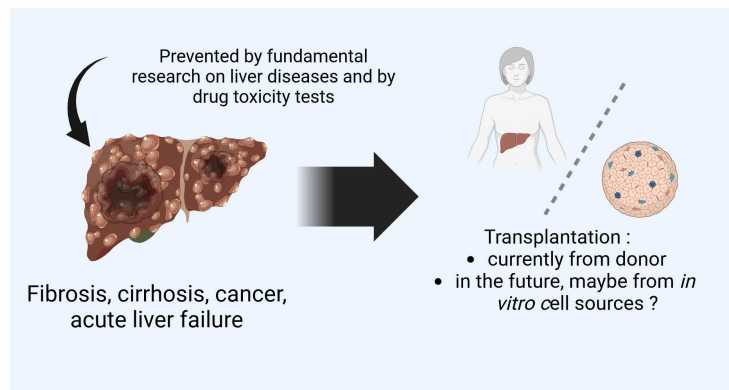
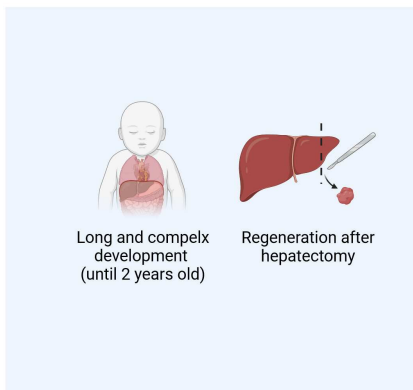
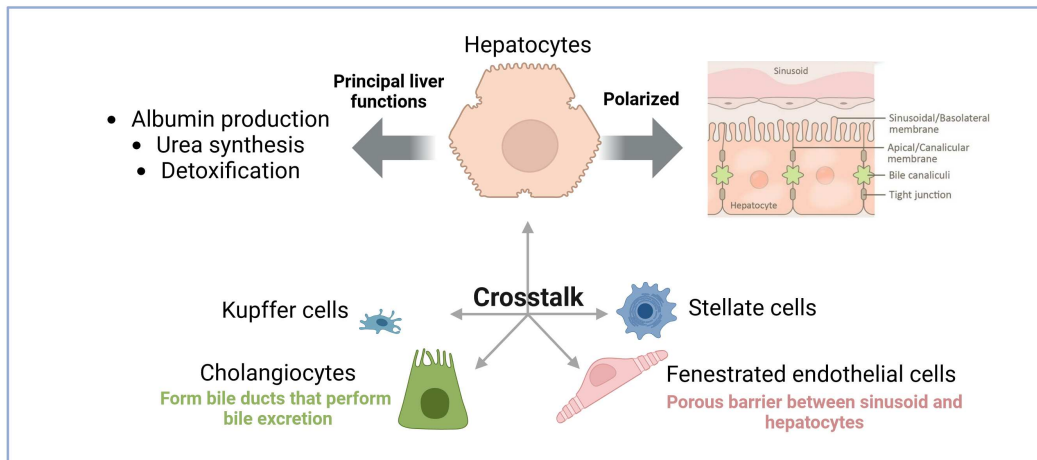
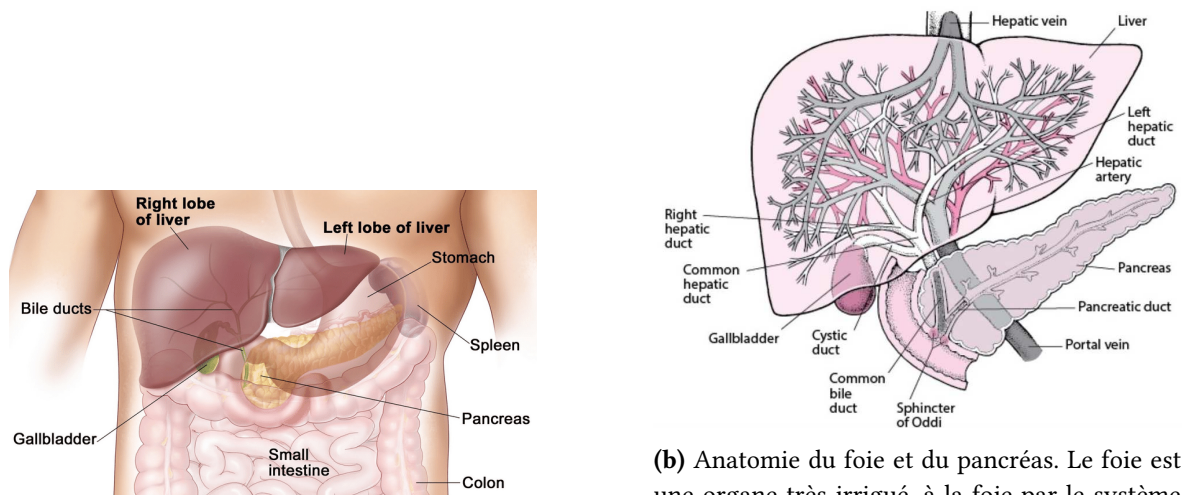


FIGURE 1.1 – Résumé graphique du chapitre 1.

1.1 Structure et fonctions du foie



(a) Position du foie par rapport aux autres organes du système entéro-hépatique. Le foie est un organe très imposant. D'après CHUNG, 2011.

(b) Anatomie du foie et du pancréas. Le foie est un organe très irrigué, à la fois par le système sanguin (*hepatic artery, hepatic vein*) et par le système biliaire (*common hepatic duct, left and right hepatic ducts*). D'après MANUAL, 2022.

FIGURE 1.2 – Macro-architecture hépatique.

1.1.1 Un organe imposant et très irrigué, lieu de production et d'échanges avec le sang et la bile

Une macro-architecture qui favorise les échanges

Le foie est le plus gros organe endocrinien de l'organisme (Figure 1.2a). Il pèse en moyenne 2% de la masse corporelle (1,5 kilogramme chez l'adulte) et est situé légèrement au-dessus de l'estomac. Cet organe très irrigué filtre et détoxifie le sang. Les vaisseaux sanguins s'y divisent en ramifications qui desservent toutes les parties du foie et maintiennent un flux sanguin de 1,4 litre par minute (Figure 1.2b). On y trouve deux vaisseaux afférents et un vaisseau efférent :

- L'artère hépatique apporte du sang oxygéné provenant des poumons,
- La veine porte transporte du sang riche en nutriments et pauvre en O_2 provenant du tube digestif, de la rate et du pancréas,
- La veine centrale redistribue le sang filtré vers la veine hépatique puis vers le cœur.

Le foie est également parcouru par des canalicules et des canaux biliaires (Figure 1.2b), qui assurent l'interconnexion avec le circuit biliaire. Il sécrète la bile qui est ensuite utilisée dans le reste du système entérohépatique.

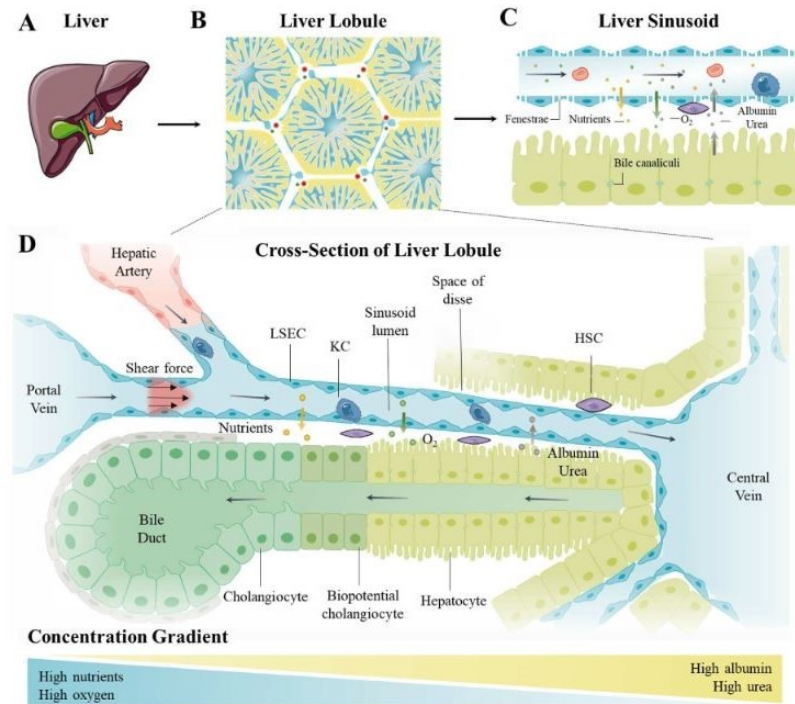


FIGURE 1.3 – A) Foie, B) Lobule hépatique, C) Sinusoïde hépatique, D) Zoom sur le lobule hépatique, présentant l'organisation des différents types cellulaires autour d'un sinusoid. D'après LIU *et al.*, 2022.

Le foie est composé de millions d'unités fonctionnelles hexagonales appelées lobules hépatiques (Figure 1.3.B). Chaque lobule est traversé par des branches de l'artère hépatique et de la veine porte (Figure 1.3.D). Ces vaisseaux sanguins déversent le sang dans les sinusoides hépatiques, des petits canaux sanguins de quelques micromètres (Figure 1.3.C). Le flux sanguin traverse le sinusoides à un débit moyen de $144 \mu\text{ms}^{-1}$ (EHRlich *et al.*, 2019). Lors de l'écoulement du sang vers la veine centrale, la portion liquide nommée plasma est traitée dans les cellules qui bordent le sinusoides en moins de deux secondes.

1.1.2 Micro-architecture : une mosaïque complexe qui repose sur différents types cellulaires

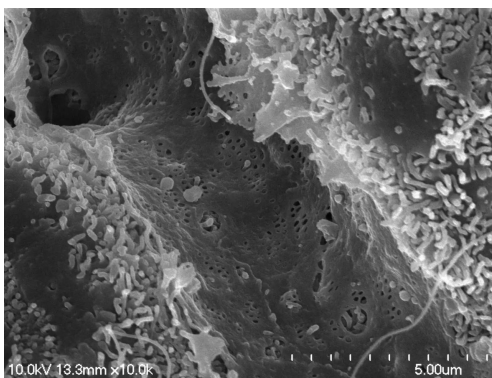
La matrice extracellulaire est minoritaire dans le foie, elle ne représente que 3% du tissu hépatique (CHEN *et al.*, 2015). Le reste du foie est composé de plusieurs types cellulaires : hépatocytes, cholangiocytes, cellules endothéliales, cellules de Kupffer et cellules stellaires (Tableau 1.1).

Les hépatocytes sont des cellules épithéliales qui représentent environ 60% des cellules et 80% de la masse de l'organe (VILLENEUVE et PICHETTE, 2004; TREFTS, GANNON et WASSERMAN, 2017; BECKWITT *et al.*, 2018). Ils assurent la majorité des fonctions du foie (voir section 1.1.3). Les cholangiocytes, quant à eux, forment les parois des canaux biliaires,

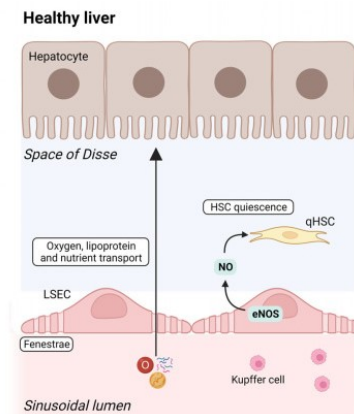
des voies qui évacuent la bile jusqu'à la vésicule biliaire et le duodénum. Ils représentent environ 3% des cellules hépatiques. Les autres types cellulaires présents sont des cellules non parenchymateuses : des macrophages, appelés cellules de Kupffer, des cellules stellaires, qui permettent le stockage de la vitamine A, et des cellules endothéliales, qui assurent l'irrigation importante de l'organe. Il existe plusieurs types de cellules endothéliales : celles qui forment des veines et des artères, et celles qui bordent les sinusoides hépatiques, les cellules fenestrées sinusoidales (LSEC). La morphologie unique des cellules fenestrées leur confère un rôle de barrière poreuse entre les capillaires sanguins et les hépatocytes, (Figures 1.4a et 1.4b) (KHOLODENKO et YARYGIN, 2017 ; VARGAS-VALDERRAMA *et al.*, 2020).

TABLE 1.1 – Principaux types de cellules hépatiques. D'après EHRlich *et al.*, 2019

Type cellulaire	Diamètre (µm)	Volume (% Total)	Nombre (% Total)	Type	Densité (g/mL)
Hépatocytes	20-25	77,8%	65%	Epithélial	1.10-1.15
Cholangiocytes	6-15	5%	3%	Epithélial	
Cellules endothéliales sinusoidales	7-11	2,8%	16%	Endothélial	1.061-1.080
Cellules de Kupffer	10-13	2,1%	12%	Macrophages	1.076
Cellules stellaires	11-12	1,4%	8%	Fibroblastes	1.05



(a) Sinusoiide hépatique de rat brun, d'une largeur de 5 µm. On observe nettement la fenestration des cellules endothéliales sinusoidales, ainsi que les microvillosités des hépatocytes dans l'espace de Disse. Agrandissement x10 000. Barre d'échelle : 5 micromètres. D'après HARRIS, 2011



(b) Rôle de barrière poreuse des cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (LSECs). D'après KIM *et al.*, 2023a.

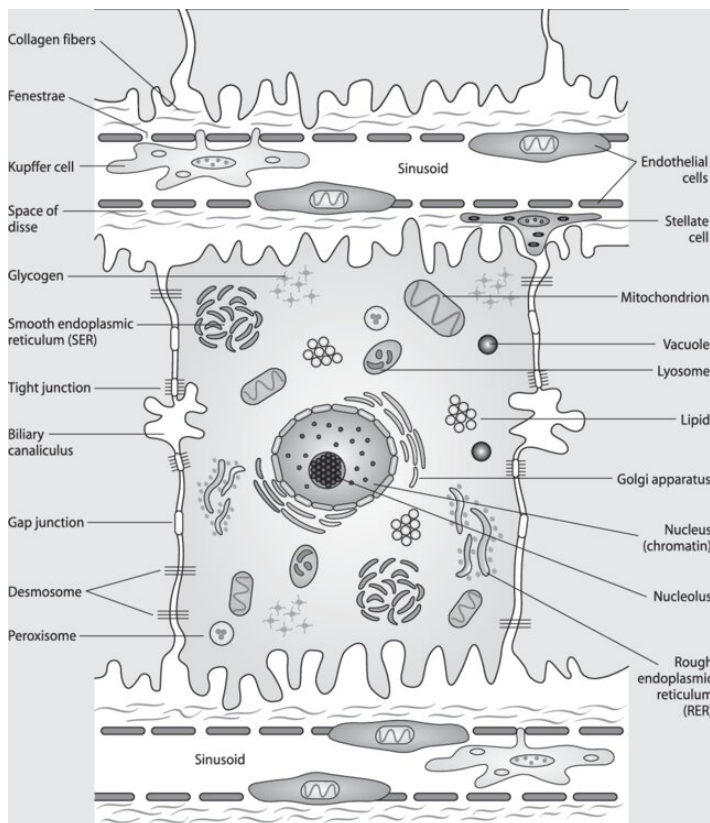
FIGURE 1.4 – Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques.

1.1.3 Les hépatocytes, usines polyvalentes et vitales

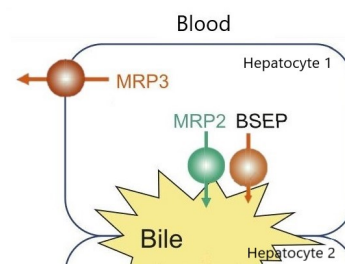
Réprésentant la quasi-totalité du volume et des fonctions hépatiques, les hépatocytes sont les plus cruciales des cellules hépatiques. Leurs caractéristiques sont détaillées ci-dessous.

Polarisation

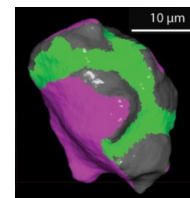
Les hépatocytes sont des cellules polarisées (Figure 1.5a), c'est-à-dire asymétriques. Certaines de leurs faces sont en contact avec les hépatocytes voisins, alors que d'autres donnent sur le sinusoïde hépatique. Cette polarisation, contrôlée par le cytosquelette d'actine (FELDMANN, 1992), établit un flux de molécules dans la cellule notamment grâce à l'intervention de transporteurs transmembranaires (Figure 1.5b et GISSEN et ARIAS, 2015). Pour garantir un bon fonctionnement, la polarisation doit être maintenue en continu.



(a) Schématisation en 2D de la polarité des hépatocytes. Le pôle sinusoidal est séparé du sinusoïde par l'espace de Disse. L'hépatocyte est relié aux cellules voisines du parenchyme par des jonctions intercellulaires tout le long du pôle apical. Noter la présence de canalicules biliaires entre les hépatocytes. D'après VAN DER HOVEN, GOMMERS et BAKKER, 2007.



(b) Intégration localisée dans la membrane hépatocyttaire de certains transporteurs. D'après HAFEY *et al.*, 2020.



(c) Reconstruction en 3D d'un hépatocyte, avec un pôle apical ou canaliculaire (vert), un pôle basal ou sinusoidal (magenta) et un pôle latéral (gris). D'après MORALES-NAVARRETE *et al.*, 2019.

FIGURE 1.5 – La polarité des hépatocytes.

Pôle apical Les faces qui sont zones de contact avec d'autres hépatocytes forment ce que l'on appelle le pôle apical. La liaison entre les deux membranes voisines est assurée par des protéines de jonction. Les jonctions sont de différents types : jonctions serrées, jonctions adhérentes, desmosomes, jonctions communicantes. Par endroit, les deux membranes forment des sillons : ce sont les canalicules biliaires, dans lesquels est excrétée la bile produite par les hépatocytes.

Pôle baso-latéral Les autres faces sont situées à proximité du sinusoiide sanguin et ne sont pas en contact direct avec d'autres cellules. Elles donnent sur un interstice appelé espace de Disse qui les sépare des cellules endothéliales sinusoidales. À l'endroit de ce pôle basal, la membrane forme de nombreuses microvillosités.

La polarisation des hépatocytes est complexe : le pôle apical a une forme sinueuse (Figure 1.5c).

Fonctions hépatocytaires

La fonction d'un hépatocyte est régie par son emplacement dans le lobule hépatique. La pression partielle en oxygène est maximale près de l'artère hépatique et minimale près de la veine centrale (Figure 1.3.D). Ce gradient d'oxygène établit un métabolisme différentiel qualifié de zonation hépatique (Tableau 1.2).

Les hépatocytes exposés à une forte pression partielle en oxygène sont ceux qui effectuent les fonctions métaboliques oxydatives, tandis que les hépatocytes peu irrigués en oxygène assurent la détoxification et la production d'albumine et d'urée.

TABLE 1.2 – Zonation fonctionnelle du foie. D'après EHRlich *et al.*, 2019.

	Zone périportale	Zone périveineuse
Oxygène	60-70 mm Hg	25-35 mm Hg
Hormones	Elevé	Faible
Glucose	Gluconéogénèse	Glycolyse
CYP450	Faible	Elevé
Lipides	β -oxydation	Liponéogénèse
Azote	Uréogénèse	Synthèse de glutamine

Métabolisme Les hépatocytes filtrent le sang et métabolisent les nutriments circulants provenant de l'alimentation (MICHALOPOULOS, 2007) :

- Glucides : le foie convertit le glucose en glycogène, un glucide de réserve qui peut être immédiatement stocké dans l'organe. Ce mécanisme appelé la glycogénogenèse

permet de construire des réserves énergétiques. En période de jeûne, le foie libère du glucose en effectuant l'opération inverse ou en utilisant une autre voie de synthèse : la néoglucogenèse. Celle-ci exploite des précurseurs non glucidiques tels que le pyruvate, le lactate, le glycérol ou certains acides aminés.

- Protéines : les acides aminés extraits des aliments servent à synthétiser de nouvelles protéines, telles que les facteurs de coagulation et l'albumine, laquelle joue un rôle important de régulation de l'hémostase et de la pression osmotique sanguine. Cela fait du foie le centre de synthèse de protéines sanguines plasmatiques.
- Lipides : les lipides quant à eux sont transformés en triglycérides et stockés dans le foie ou alors évacués dans le sang sous la forme de lipoprotéines.

Détoxification Le foie est le plus grand centre de détoxification de l'organisme. Il élimine les toxines issues de l'organisme (ammoniac), ou celles qu'apporte l'alimentation, comme l'alcool, les polluants ou les médicaments (TREFTS, GANNON et WASSERMAN, 2017). La détoxification consiste à rendre hydrophile une molécule hydrophobe, afin de pouvoir l'éliminer dans le sang ou dans la bile.

Le xénobiotique est internalisé à travers des pompes, interagit avec des récepteurs nucléaires, tels le récepteur constitutif des androstanes (CAR), le récepteur d'aryl hydrocarbone (AhR) et le récepteur prégneane X (PXR). Ces récepteurs sont ensuite déplacés dans le noyau et induisent l'expression de nombreux gènes.

La détoxification se déroule en trois phases (Figure 1.6) :

- Oxydation : Les réactions de phase I inactivent les substrats. La plupart du temps, ce sont des oxydations catalysées par des enzymes appelées cytochromes P450 (BECKWITT *et al.*, 2018), qui induisent la formation de groupements -OH, -NH₂, -SH et d'intermédiaires hautement réactifs et toxiques. La famille des cytochromes P450 comprend une cinquantaine d'enzymes (Figure 1.7), qui sont peu spécifiques de leurs substrats (Tableau 1.3). Un cytochrome en particulier, le CYP3A4, catalyse la biotransformation de plus de 50% des médicaments couramment utilisés (BLACKFORD *et al.*, 2019).
- Conjugaison : Les réactions de phase II sont généralement des conjugaisons avec des substrats hydrophiles, principalement catalysées par des enzymes transférases. Elles augmentent la polarité des substrats, afin de favoriser leur excrétion (ROY-CHOWDHURY, LOCKER et ROY-CHOWDHURY, 2003), et diminuent leur toxicité.
- Extrusion : Le xénobiotique est ensuite excrété via des transporteurs, puis évacué dans la bile jusqu'aux selles s'il est liposoluble, ou dans le sang puis l'urine s'il est hydrosoluble.

Autres fonctions La production de bile (essentielle pour l'absorption des lipides), le traitement des déchets azotés grâce à la synthèse d'urée, ou encore le stockage de divers composés (fer, cuivre, vitamines...) représentent d'autres fonctions majeures des hépatocytes.

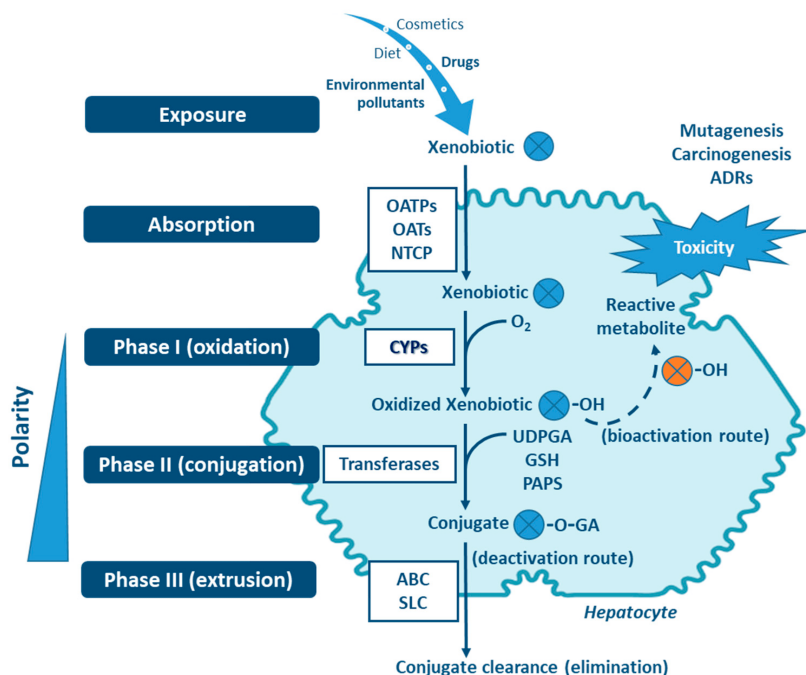


FIGURE 1.6 – Mécanisme de détoxification d'un xénobiotique. L'absorption est suivie d'une phase d'oxydation, d'une phase de conjugaison et enfin d'une phase d'extrusion. D'après ESTEVES, RUEFF et KRANENDONK, 2021.

TABLE 1.3 – Spécialisation des CYP450. D'après ESTEVES, RUEFF et KRANENDONK, 2021.

Type de composé	Isoenzyme CYP impliquée dans la détoxification
Stérols	1B1, 7A1, 7B1, 8B1, 11A1, 11B1, 11B2, 17A1, 19A1, 21A2, 27A1, 39A1, 46A1, 51A1
Xénobiotiques	1A1, 1A2, 2A6, 2A13, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2F1, 3A4, 3A5, 3A7
Acides gras	2J2, 2U1, 4A11, 4B1, 4F11, 4F12, 4F22, 4V2, 4X1, 4Z1
Vitamines	2R1, 24A1, 26A1, 26B1, 26C1, 27B1, 27C1

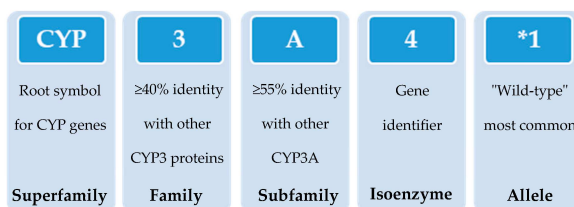


FIGURE 1.7 – Détail de la nomenclature des CYP450. Les cytochromes sont répartis en familles et sous-familles. D'après ESTEVES, RUEFF et KRANENDONK, 2021.

1.2 Mécanismes de détérioration, maladies, greffe

1.2.1 Maladies hépatiques et conséquences pour l'organe

Le foie est un organe résilient grâce à une grande capacité de régénération *in vivo*. Après avoir été amputé aux deux tiers, il est capable de retrouver sa taille et son organisation microscopique initiales.

Ses capacités de régénération ont cependant leurs limites et sont l'objet de recherches intensives. Des dommages importants peuvent être causés à l'organe par :

- un surdosage médicamenteux
- des maladies virales telles les hépatites A, B, C ou E
- des stress chroniques comme la consommation d'alcool

L'inflammation du foie qui en résulte, appelée hépatite, peut être aiguë ou chronique. Elle cause une détérioration, une perte de la polarisation cellulaire et une perte de fonctionnalité de l'organe (GISSSEN et ARIAS, 2015).

Dans le cas d'une inflammation aiguë, le foie cesse brusquement d'assurer ses fonctions et une greffe doit être réalisée en urgence.

Quant aux hépatites chroniques, elles provoquent souvent la formation d'un tissu cicatriciel, appelé fibrose, qui remplace les cellules endommagées. Le stade ultime de la maladie est la cirrhose, le plus souvent irréversible. D'autres affections touchent également le foie, comme la stéatose due à l'accumulation de graisse dans des vésicules lipidiques des hépatocytes. Elle concernerait plus de 20% de la population. La cirrhose et la stéatose favorisent l'apparition de cancers du foie. Le meilleur traitement est de nouveau la greffe, même si la chimioembolisation et l'hépatectomie sont aussi utilisées en tant qu'alternatives.

Les maladies hépatiques sont nombreuses (maladies génétiques, etc.) et présentent des symptômes variés. La liste exhaustive n'en sera pas fournie dans ce manuscrit, car pour la plupart un éventuel traitement par thérapie cellulaire ne serait pas adapté.

1.2.2 Le traitement par greffe hépatique

Lorsque le foie n'est plus fonctionnel, le seul traitement possible qui ne requiert pas de relier de façon permanente le patient à un appareil extracorporel est la transplantation hépatique. Mais le nombre de patients en attente de foie a doublé en dix ans, induisant un délai de plus de six mois (IANSANTE *et al.*, 2018). La cirrhose provoquerait 10 000 à 15 000 décès chaque année, à cause notamment des complications chirurgicales (LUCE *et al.*, 2021) et surtout du manque de donneurs dont le foie n'est pas détérioré (GISSSEN et ARIAS, 2015).

Il est urgent de se tourner vers des voies alternatives, comme la médecine régénérative.

Plusieurs stratégies d'ingénierie tissulaire hépatique sont actuellement en développement. Ainsi, la fabrication de feuillets hépatiques a été envisagée pour reconstituer en partie la fonctionnalité de l'organe, par exemple chez des souris souffrant d'hémophilie (TATSUMI et OKANO, 2017). D'autres approches tentent de reproduire un foie entier, soit en recolonisant des matrices de foie décellularisées, soit grâce à la bio-impression d'organoïdes. Aucune de ces tentatives n'a pour l'instant atteint le stade des essais cliniques (KHOLODENKO et YARYGIN, 2017). Le principal obstacle à la réussite de ces thérapies cellulaires est de parvenir à cultiver en grande quantité des cellules hépatiques fonctionnelles en laboratoire, en sélectionnant les bons modèles cellulaires et les meilleures techniques de culture. De tels modèles hépatiques pourraient également être impliqués en amont de la thérapie, pour la recherche fondamentale sur les maladies hépatiques, ou la détection de toxicités hépatiques provoquées par des médicaments. La complexité de l'architecture hépatique, ainsi que le nombre important de fonctions devant être assurées compliquent leur élaboration. Un panorama des différentes technologies développées à cet effet est présenté au chapitre 2.

1.3 Conclusion du chapitre

La structure très ordonnée du foie abrite divers types cellulaires à l'aspect et aux caractéristiques uniques. Cet organe complexe est responsable de fonctions vitales telles la détoxification, la production de bile et la sécrétion d'albumine. Le développement de la culture de tissus hépatiques en laboratoire a permis ces dernières décennies d'importants progrès sur la caractérisation de cet organe. Des défis restent cependant à relever. En recherche fondamentale, on constate un manque de compréhension de l'organogenèse, des capacités de régénération et des maladies hépatiques. En recherche préclinique et clinique, apparaît un besoin urgent d'innovation pour la détection des toxicités médicamenteuses, le traitement des hépatites et le développement d'alternatives à la transplantation d'organe. Le perfectionnement des techniques de culture *in vitro*, présenté au chapitre suivant, pourrait remédier à certains de ces défis : améliorer la modélisation des maladies hépatiques, faciliter le développement des approches de pharmaco-toxicologie et engager la recherche sur la voie de la thérapie cellulaire hépatique.

CULTURE *IN VITRO* DU FOIE : MÉTHODES, OBJECTIFS ET LIMITES

2.1	Les modèles cellulaires d'hépatocytes	24
2.1.1	Hépatocytes primaires	24
2.1.2	Lignées cellulaires	25
2.1.3	Hépatoblastes dérivés de cellules souches iPS	28
2.2	Culture en 3D de sphéroïdes	28
2.2.1	Panorama des méthodes de formation de sphéroïdes	29
2.3	Analyse morphologique et biologique des sphéroïdes : choix des critères de validation du modèle <i>in vitro</i>	35
2.3.1	Critères de viabilité	35
2.3.2	Reproductibilité, limite de taille et cœur nécrotique	36
2.3.3	Critères pour la validation fonctionnelle des hépatocytes	37
2.4	Applications actuelles de la culture <i>in vitro</i> du foie	40
2.5	Conclusion du chapitre	42

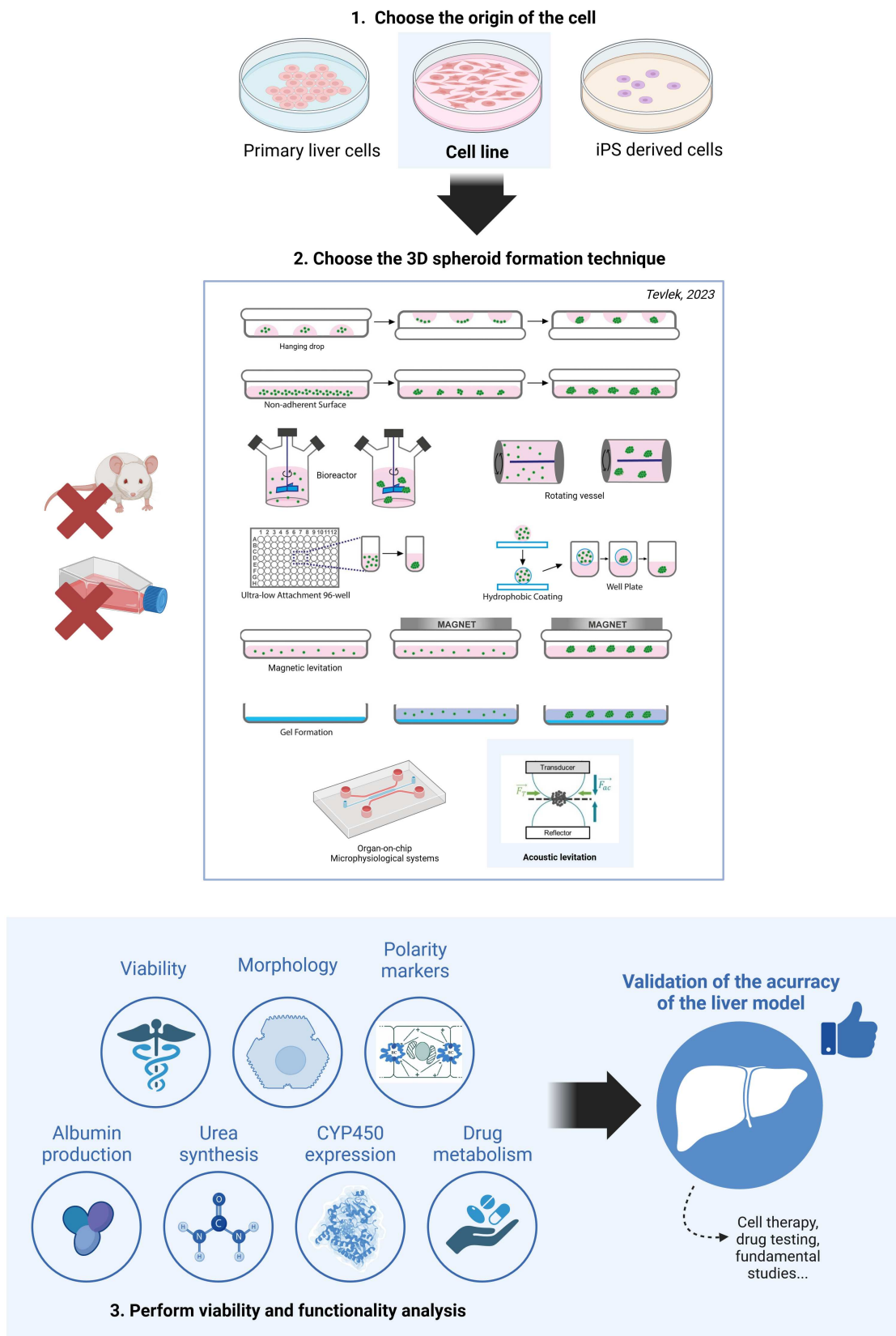


FIGURE 2.1 – Résumé graphique du chapitre 2.

Le foie est connu pour sa capacité exceptionnelle de régénération *in vivo* (MICHALOPOULOS, 2007 ; KHOLODENKO et YARYGIN, 2017). *In vitro* cependant, la culture de cellules hépatiques est complexe. Les hépatocytes primaires, c'est-à-dire prélevés sur des donneurs, perdent leur capacité de prolifération, leur polarisation et leur fonctionnalité en quelques heures ou jours lorsqu'ils sont cultivés en culture classique en deux dimensions sur plastique (BAZOU *et al.*, 2008).

Pour dépasser cet écueil, d'autres modèles hépatiques *in vitro* ont été développés recourant à différentes combinaisons de sources de cellules et de méthodes de culture. Le modèle le plus adapté doit être choisi selon l'application visée : médecine régénérative, tests pour le développement de médicaments, modélisation de maladies, ou encore recherche fondamentale sur le foie.

2.1 Les modèles cellulaires d'hépatocytes

Les sources de cellules pour les applications *in vitro* sont variées. Les plus courantes sont les hépatocytes primaires, les lignées cellulaires et les cellules issues de cellules pluri-potentes, dont les caractéristiques sont détaillées en Figure 2.2.

Hepatocyte source	Animal	HepG2	HepaRG	Primary human	Cryopreserved human	iPSC-derived
Viability	Medium to High	High	High	Medium to High	Medium	High
Attachment to ECM	High	High	High	High	Medium	High
CYP450 Activity	Medium	Low	Medium	High	High	Low to Medium
Longevity in Culture	Medium	High	High	Medium	Low to Medium	Low
Cost	Medium	Low	Low	High	High	High
Availability	Medium	High	High	Low	Medium	Medium

FIGURE 2.2 – Propriétés de différents types cellulaires : hépatocytes issus d'animaux, HepG2, HepaRG, hépatocytes primaires humains, hépatocytes primaires humains cryogénisés et hépatoblastes dérivés des cellules iPSC. Le principal inconvénient des cellules HepaRG relevé ici est leur activité des cytochromes, qualifiée de "moyenne". Leurs principaux avantages sont leur facilité d'obtention, leur bonne viabilité, leur longévité et leur faible coût. D'après BECKWITT *et al.*, 2018.

2.1.1 Hépatocytes primaires

Les hépatocytes primaires sont la référence inégalée (*gold standard*) pour la plupart des études sur la fonctionnalité enzymatique, des tests de pharmaco-toxicologie (évaluation des propriétés ADME-Tox ou ADMET : absorption, distribution, métabolisme, excrétion et toxicité) ou des recherches sur les maladies hépatiques (Figure 2.3 et LAUSCHKE *et al.*, 2019).

Ils sont cependant loin d'être un modèle idéal. Ils proviennent principalement de résections ou ablations de foies malades, ou alors de foies ayant fait l'objet d'un don d'organe trop endommagé pour être greffé (GUGUEN-GUILLOUZO et GUILLOUZO, 2010). Ces dons sont cependant une source limitée et leur principal désavantage est la grande hétérogénéité entre

les lots. Parfois, les tests de pharmaco-toxicologie sont réalisés sur des tranches de foie entières. Celles-ci ne survivent cependant qu'un seul jour *in vitro* (KHETANI et BHATIA, 2008). Le plus souvent, la culture d'hépatocytes primaires est effectuée à partir d'une suspension de cellules individuelles. Le protocole d'isolation mécanique de ces cellules (SEGLEN, 1976) provoque la perte des jonctions intercellulaires et des canalicules biliaires (GUGUEN-GUILLOUZO et GUILLOUZO, 2010). Pour conservation avant utilisation, ces hépatocytes primaires sont également souvent cryopréservés, ce qui peut causer une inhibition de l'adhérence ou de l'expression des CYP450 (EHRlich *et al.*, 2019).

Après décongélation, les hépatocytes primaires ne sont pas cultivés directement sur plastique pour ne pas provoquer de chute immédiate de fonctionnalité. La culture en sandwich (SWIFT, PFEIFER et BROUWER, 2010), qui consiste à ensemencer une grande densité cellulaire dans un hydrogel de collagène, est assez largement utilisée car elle procure aux cellules le degré d'interactions cellule-cellule dont elles ont besoin (MOGHE *et al.*, 1997). Elle demande cependant beaucoup de main-d'œuvre spécialisée, la prolifération reste très réduite, voire inexistante, et la fonctionnalité cellulaire ne peut être maintenue plus de deux semaines (BHANDARI *et al.*, 2001; RAMBOER *et al.*, 2015a; RAMBOER *et al.*, 2015b; ASPLUND *et al.*, 2016).

System	Properties	Established applications	Examples of commercial suppliers
Spheroid systems	Static monoculture system; allows coculture with NPCs; phenotypically stable for >5 weeks; HTS-compatible	Hepatotoxicity, disease models for NASH, fibrosis and cholestasis, and toxicogenomics	InSphero, HepaPredict, and Cypotex
MPCC	Static coculture of hepatic cells with murine fibroblasts; hepatocyte function stable for weeks; HTS-compatible	Hepatotoxicity, pharmacokinetic studies, and toxicogenomics	BioIVT HepatoPac
Liver-on-a-chip	Microfluidic devices with different layouts and designs; setup allows modeling of hepatic zonation; stable for weeks	Hepatotoxicity, pharmacokinetic studies, NASH, and viral hepatitis models	Mimetas, CN Bio Innovations, and HemoShear
Bioprinting	Scaffold-free assembly of PHH and NPCs	Proof-of-concept hepatotoxicity and fibrosis disease models	Organovo
Microfluidic multiorgan devices	Microfluidic, organoid cultures, and transwell system possible	As of yet, only proof-of-concept studies	Draper, CN Bio Innovations, and TissUse

HTS, high-throughput screening.

FIGURE 2.3 – Panorama de l'utilisation des hépatocytes primaires en culture *in vitro*. Ils peuvent être utilisés dans une grande variété de systèmes de culture et d'applications, et ont été exploités dans de nombreuses applications commerciales. D'après LAUSCHKE *et al.*, 2019.

2.1.2 Lignées cellulaires

Pour pallier les limites des cultures primaires, notamment leur coût élevé et leur absence de prolifération, les scientifiques ont recours à des modèles issus de lignées tumorales. Ces cellules immortelles et prolifératives, le plus souvent d'origine cancéreuse, ont cependant un phénotype et un fonctionnement différent de ceux d'un hépatocyte normal *in vivo*. Selon la fonction cellulaire que l'on souhaite exploiter, on choisit la lignée disponible la plus représentative (RAMBOER *et al.*, 2015a).

Lignée HepG2

La lignée HepG2 a été l'une des premières isolées et est donc souvent utilisée dans les études. Cependant, elle est assez éloignée des hépatocytes primaires car elle est immature et a une activité enzymatique anormale : une très faible expression et activité des enzymes de phase I et de phase II (KANEBRATT et ANDERSSON, 2008a ; MONCKTON, BROWN et KHETANI, 2021). Elle reste néanmoins adaptée pour étudier certains cytochromes bien particuliers : CYP1A1, 1A2, 2B6, ou encore 3A4 (WILKENING, STAHL et BADER, 2003 ; WESTERINK et SCHOONEN, 2007).

Lignée HepaRG

La lignée bipotente HepaRG est un modèle plus pertinent pour les études de biotransformation, mitotoxicité et cytotoxicité (GUILLOUZO *et al.*, 2007 ; KAMALIAN *et al.*, 2018). Ces cellules sont dérivées d'une tumeur de cellules progénitrices hépatiques (GRIPON *et al.*, 2002). Lorsqu'elles sontensemencées à une faible densité (densité recommandée de 2.7×10^4 cellules/cm²), les cellules HepaRG présentent un phénotype indifférencié. Leur temps de doublement est de 24 heures lors de la phase de prolifération (GRIPON *et al.*, 2002 ; EHRLICH *et al.*, 2019). Après une semaine de culture, les cellules atteignent la confluence.

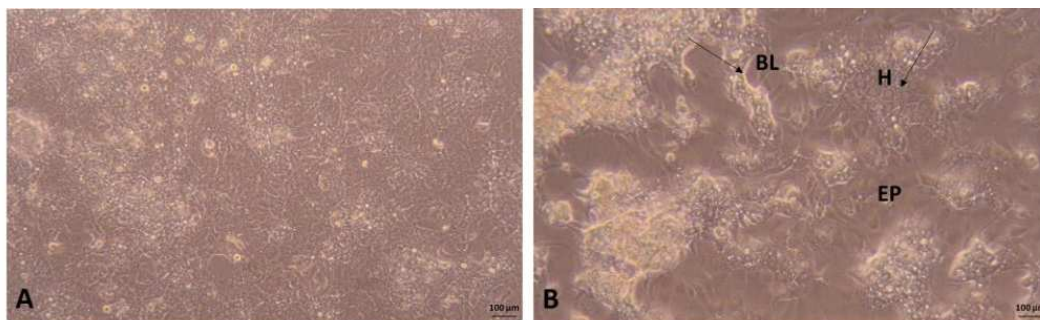


FIGURE 2.4 – Morphologie des cellules HepaRG en culture 2D, observée en microscopie à contraste de phase (amplification 10X, barre d'échelle 100 µm), A) Après 15 jours de culture, B) Après 30 jours de culture, dont 15 jours exposés à du DMSO 2%, montrant des cellules à la morphologie épithéliale (EL), à la morphologie hépatique (H) et des canalicules biliaires (BL) d'après MEIRINHO *et al.*, 2022.

Maturation des cellules HepaRG *in vitro*

L'arrivée à confluence des cellules HepaRG provoque la différenciation en deux types cellulaires différents présentant des marqueurs caractéristiques des hépatocytes (comme l'albumine) ou des cholangiocytes (comme la cytokératine 19) (CEREC *et al.*, 2007). Les cellules ressemblant à des hépatocytes (cellules épithéliales granulaires) se regroupent en îlots entourés de cellules similaires à des cholangiocytes (Figure 2.4). Le ratio hépatocytes/cholangiocytes

obtenu est de 50%. Le traitement avec 1 à 2% de diméthylsulfoxyde (DMSO) et 5×10^5 M d'hémisuccinate d'hydrocortisone entraîne la maturation des cellules HepaRG vers un phénotype encore plus proche des hépatocytes primaires : ils présentent des canalicules biliaires, des marqueurs de polarité et deviennent parfois binucléés (ANINAT *et al.*, 2006).

Le traitement au DMSO augmente l'expression de gènes impliqués dans la détoxification, notamment ceux qui codent des cytochromes P450 comme le CYP3A4, important pour les études cytotoxiques *in vitro*, ainsi que ceux qui codent des récepteurs sensibles aux médicaments tels CAR ou PXR (KANEBRATT et ANDERSSON, 2008a; MAYATI *et al.*, 2018; DUBOIS-POT-SCHNEIDER *et al.*, 2022). Les cellules HepaRG traitées au DMSO produisent aussi de l'albumine, de l'urée, de l'haptoglobine et de l'aldolase B, un marqueur spécifique des hépatocytes matures. Ces caractéristiques fonctionnelles peuvent être maintenues jusqu'à six semaines après confluence (LE VEE *et al.*, 2006; KANEBRATT et ANDERSSON, 2008b).

Cependant, le DMSO n'est pas sans conséquence même à des doses faibles, et peut augmenter la proportion de cellules mortes (NIBOURG *et al.*, 2012). À plus de 10%, il devient même létal pour tous les types cellulaires, car il provoque la formation de pores dans la membrane plasmique (GALVAO *et al.*, 2014). De plus, cette induction n'est pas stable et le retrait du DMSO du milieu de culture induit immédiatement un effondrement de la production de CYP450 (ANINAT *et al.*, 2006).

Pour toutes ces raisons, certains cherchent à remplacer l'utilisation répandue du DMSO en biologie cellulaire (MAYATI *et al.*, 2018). La culture en 3D de cellules HepaRG induit une maturation hépatique et une induction des cytochromes, sans posséder les désavantages du DMSO (ROSE *et al.*, 2021).

Pertinence du modèle cellules HepaRG

Les cellules HepaRG, au contraire des cellules HepG2, présentent une activité métabolique suffisamment proche des hépatocytes primaires (en deux dimensions, voir KANEBRATT et ANDERSSON, 2008a, en trois dimensions, voir RAMAIAHGARI *et al.*, 2017) pour être utilisées dans des tests de clairance de médicaments (KRATOCHWIL *et al.*, 2017) ou d'induction des CYP450 (GERETS *et al.*, 2012). Ainsi, des modèles ont été mis au point pour prédire, à partir de dosages d'ARNm chez les cellules HepaRG après exposition à un médicament, l'induction des cytochromes dans le foie *in vivo* (KANEBRATT et ANDERSSON, 2008b). La sensibilité des cellules HepaRG à la détection de composés toxiques reste cependant inférieure de 30% à celle des hépatocytes primaires (ASPLUND *et al.*, 2016). Pour MONCKTON, BROWN et KHETANI, 2021, cela pose problème pour prévenir les insuffisances hépatiques aiguës d'origine médicamenteuse (*Drug-induced liver injury* ou DILI). La détection des composés pouvant provoquer une DILI est une priorité absolue lors des phases pré-cliniques, afin de ne pas mettre sur le marché un médicament potentiellement mortel. Une amélioration de la maturation *in vitro* des cellules HepaRG pourrait augmenter leur utilisation par les industries pharmaceutiques.

2.1.3 Hépatoblastes dérivés de cellules souches iPS

Une nouvelle source de cellules pourrait concurrencer l'usage des hépatocytes primaires et des lignées. Il s'agit des cellules hépatiques différenciées à partir de cellules souches pluripotentes induites, ou iPS (*induced pluripotent stem cells*).

Les iPS sont des cellules souches issues de la dédifférenciation de cellules adultes (TAKAHASHI et YAMANAKA, 2006; YAMANAKA, 2007). Cette technique de reprogrammation permet d'obtenir des cellules souches pluripotentes sans recourir à la destruction d'embryons. Ces cellules pluripotentes peuvent se différencier en n'importe quel type cellulaire, par exemple hépatique. Les iPS ont déjà été différenciées en hépatocytes, cholangiocytes, cellules endothéliales et cellules de Kupffer (OLGASI, CUCCI et FOLLENZI, 2020). La différenciation en hépatocytes suit trois étapes qui récapitulent le développement embryonnaire grâce à l'administration de facteurs de croissance : l'induction en endoderme définitif (Activine A, BMPs, FGFs et WNT3A), la spécification hépatique (FGF2, FGF4, BMP4, et BMP2), puis la différenciation en hépatocytes (HGF, OSM et DEX) (CHEN *et al.*, 2018). Cependant, la différenciation en hépatocytes n'est pas totalement efficace : les cellules produites, appelées hépatoblastes dérivés d'iPS, ont un phénotype immature plus proche d'un progéniteur hépatique que d'un hépatocyte mature (CARPENTIER *et al.*, 2016; HANNAN *et al.*, 2013; SAMPAZIOTIS, SEGERITZ et VALLIER, 2015; CHEN *et al.*, 2018).

Les hépatoblastes ainsi obtenus peuvent être utilisés pour la fabrication d'organoïdes hépatiques (COTOVIO et FERNANDES, 2020; TAKEISHI *et al.*, 2020; TAKEBE *et al.*, 2012) et de cultures 3D (HARRISON *et al.*, 2021). Cette innovation manque pour l'instant de maturité, mais est cependant déjà exploitée dans de nombreuses études.

2.2 Culture en 3D de sphéroïdes

Les types cellulaires présentés précédemment sont classiquement cultivés en 2D, mais un changement de paradigme est en train de s'effectuer avec le développement de la culture 3D. Celle-ci est plus complexe mais plus pertinente. En effet, un environnement 3D procure plus de degrés de liberté aux agrégats de cellules pour s'organiser, car la polarité cellulaire n'est pas guidée par une surface plane et rigide d'adhésion (DUVAL *et al.*, 2017). Dans une culture 3D, les hépatocytes primaires conservent leur forme native (BAIMAKHANOV *et al.*, 2018) et leur fonctionnalité (notamment l'expression génomique et l'activité des CYPs, de HNF4 α , de CAR et de PXR, la production d'albumine et d'urée) pendant au moins cinq semaines (VORRINK *et al.*, 2017; BELL *et al.*, 2018; BAZE *et al.*, 2018; JARVINEN *et al.*, 2022; DESAI, TSENG et SOUZA, 2017; KOIDE, SAKAGUCHI et KOIDE, 1989), contre deux semaines pour les cultures en sandwich. Pour les cellules HepaRG, on observe également une augmentation de fonctionnalité par rapport à une culture 2D sur plastique (TAKAHASHI *et al.*, 2015).

Différentes techniques peuvent être utilisées pour recréer un environnement 3D (GUILLOUZO *et al.*, 2007). La stratégie standard est de recourir aux échafaudages de matrices ou d'hydrogels (TAKEBE *et al.*, 2013 ; WU *et al.*, 2019 ; CALIARI et BURDICK, 2016), qui sont cependant victimes de leur mauvaise caractérisation moléculaire et de leur composition souvent incompatible avec une utilisation chez l'humain (LUCE *et al.*, 2021 ; NAKAO *et al.*, 2019 ; GOMES *et al.*, 2017). Une autre utilisation consiste à induire les cellules à s'auto-organiser pour créer des formes à la géométrie sphérique, appelées sphéroïdes ("semblables à une sphère") ou organoïdes ("semblables à un organe").

Qu'est-ce qui différencie un sphéroïde d'un organoïde ? Les organoïdes de foie apparaissent en 2013 grâce à l'équipe de Takanori Takebe, pionnière en la matière (TAKEBE *et al.*, 2013 ; TAKEBE *et al.*, 2017). Les équipes de LANCASTER et KNOBLICH, 2014 et DE SOUZA, 2018 proposent deux définitions complémentaires d'un organoïde :

"Un organoïde est une construction tissulaire 3D multicellulaire qui mime *in vitro* l'organe *in vivo* correspondant, et peut être utilisé pour étudier des aspects de cet organe dans une boîte de culture tissulaire" (traduit depuis DE SOUZA, 2018)

"Les organoïdes sont dérivés de cellules souches pluripotentes ou de progéniteurs isolés à partir d'organes, qui se différencient pour former un tissu semblable à un organe, qui possède de multiples types cellulaires s'auto-organisant pour former une structure similaire à l'organe *in vivo*." (traduit depuis LANCASTER et KNOBLICH, 2014)

La définition d'un sphéroïde est la suivante selon CHEN *et al.*, 2019 :

"Les sphéroïdes sont des amas sphériques de cellules auto-assemblées dans un environnement où les interactions cellule-cellule dominent les interactions cellule-substrat" (traduit depuis CHEN *et al.*, 2019)

Les sphéroïdes sont des modèles plus simples en composition et structure, qui ne sont pas forcément multicellulaires et peuvent être issus de cellules non primaires comme les lignées cellulaires. Pour ces raisons de simplicité, c'est ce modèle qui a été choisi dans notre étude.

2.2.1 Panorama des méthodes de formation de sphéroïdes

Plusieurs techniques ont été développées pour former et cultiver des sphéroïdes (JIANG *et al.*, 2010 ; CHEN *et al.*, 2019). Elles sont présentées en Figure 2.5, et leurs avantages et inconvénients sont détaillés dans les paragraphes suivants.

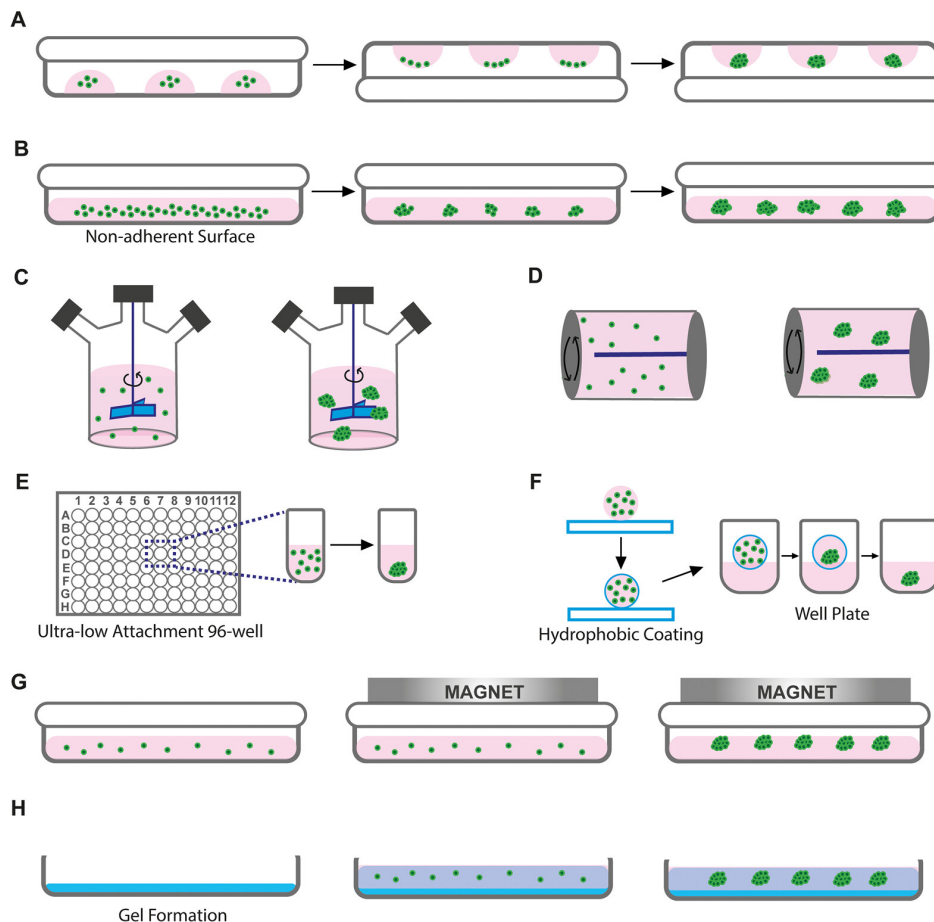


FIGURE 2.5 – Présentation de différentes techniques de formation de sphéroïdes : A) *Hanging drop*, B) Surface non-adhérente, C) Bioréacteur classique, D) Bioréacteur rotatif, E) Plaque à ultra-faible attachement, F) Revêtement hydrophobe, G) Lévitiation magnétique et H) Hydrogel. Tous ces procédés agrègent les cellules loin des surfaces plastiques rigides sur lesquelles sont réalisées la culture cellulaire standard. Ces systèmes 3D favorisent les interactions cellule-cellule plutôt que cellule-surface. D'après TEVLEK *et al.*, 2023.

Bioréacteurs

Les bioréacteurs représentent la principale technique de culture à l'échelle macroscopique. Ce sont des systèmes de culture en suspension 3D sous agitation. Les bioréacteurs permettent une bonne conservation des canalicules biliaires, de l'expression des gènes des cytochromes P450 et de la synthèse d'albumine et d'urée chez les hépatocytes primaires pendant près de deux semaines (LAUSCHKE *et al.*, 2019). Ils sont cependant peu performants pour la culture de cellules HepaRG (ULVESTAD *et al.*, 2012). Ils causent parfois un stress de cisaillement qui peut nuire à la viabilité et à la fonctionnalité des hépatocytes. Les sphéroïdes y sont de tailles très diverses, et même parfois trop grands pour être viables (FARZANEH *et al.*, 2018), voir 2.3.2.

La culture en bioréacteur se situe à l'échelle de taille supérieure des techniques de formation de sphéroïdes (volume souvent supérieur à un litre (YAMASHITA *et al.*, 2018)), ce

qui est recommandé pour les applications nécessitant de grandes quantités de matériel biologique (production en masse d'iPS humaines (SILVA, 2018), thérapie cellulaire, etc.), mais consomme également de grandes quantités de milieu de culture. La culture en bioréacteur n'est pas recommandée pour les tests de pharmaco-toxicologie car tous les sphéroïdes d'un bioréacteur sont exposés au même milieu de culture (LAUSCHKE *et al.*, 2019), compliquant les tests de doses-réponse.

Les autres techniques de formation permettent de cultiver les cellules à plus petite échelle.

Microgouttelettes

L'encapsulation des cellules dans des microgouttelettes (*hanging drop*) déposées sur un couvercle retourné de plaque de culture entraîne la formation de sphéroïdes sous l'effet de la gravité (Figure 2.5 A). Les avantages de cette technique sont le faible volume de milieu de culture requis (SOTO *et al.*, 2021) et la reproductibilité de taille (10% de variabilité pour GravityPLUSTM de InSphero, Switzerland, LAUSCHKE *et al.*, 2019). Elle permet d'obtenir des sphéroïdes d'hépatocytes primaires viables et fonctionnels pendant cinq semaines, mais ne permet pas de maintenir une expression satisfaisante de certains cytochromes et marqueurs de polarité (LAUSCHKE *et al.*, 2019; MONCKTON, BROWN et KHETANI, 2021). De plus, cette technique est très consommatrice de main-d'œuvre.

Surfaces non adhérentes, micro-puits

La culture en plaque à faible adhérence (Figure 2.5 B) est moins coûteuse en main-d'œuvre. Elle maintient la fonctionnalité hépatique pendant plus d'un mois (BELL *et al.*, 2016). Cependant, lorsqu'une grande plaque à faible adhérence (plaque à 24 puits de 1,9 cm² ou à 6 puits de 9,6 cm²) est utilisée pour la formation de plusieurs sphéroïdes par puits, le nombre, la forme et la taille des agrégats sont très aléatoires.

La culture en micro-puits (Figure 2.5 E) permet au contraire d'obtenir des tailles reproductibles d'agrégats cellulaires. Elle n'utilise pas nécessairement de matrice exogène. Elle maintient la morphologie et la fonctionnalité hépatique pendant plusieurs semaines (KHETANI et BHATIA, 2008). Elle permet une bonne reproductibilité de taille (AggreWellTM de Stem Cell Technologies, Canada).

Microfluidique, système microphysiologique et foie sur puce

Initialement : microfluidique en 2D Les foies sur puce résultent d'une volonté de miniaturisation des systèmes de culture cellulaire (Figure 2.6). Ceux-ci ont d'abord été développés en deux dimensions. L'arrivée dans les laboratoires de biologie de technologies

issues de recherches en physique, notamment l'intégration de circuits microfluidiques, a permis l'essor de divers organes sur puce. Les systèmes miniaturisés sont aujourd'hui regroupés sous l'expression générale "systèmes microphysiologiques", dont la définition est donnée ci-dessous.

"Un système microphysiologique (MPS) humain reproduit certains éléments clés de la structure de l'organe, de sa fonction et de sa réponse à un traitement thérapeutique." (traduit d'après GOUGH *et al.*, 2021)

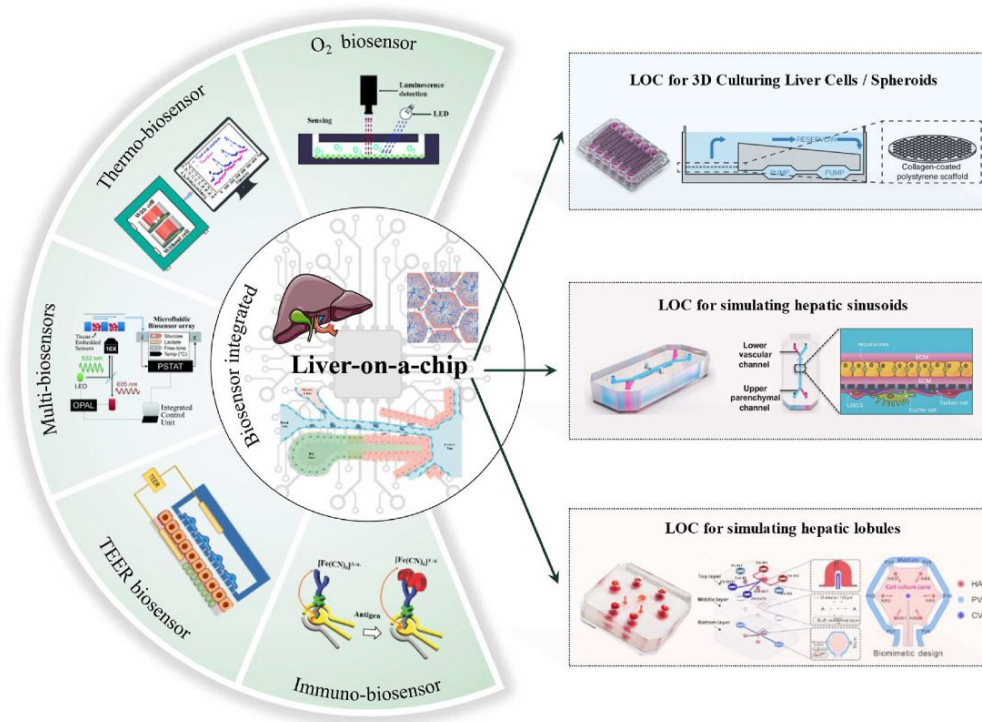


FIGURE 2.6 – L'intégration de biosenseurs dans les foies sur puce permet le suivi en continu de la concentration en oxygène, de la température ou encore de l'activité électrique, et ainsi d'enrichir leur potentiel pour la culture en 3D biomimétique. D'après LIU *et al.*, 2022.

Les foies sur puce (*liver-on-chip*) permettent de travailler à micro-échelle avec des rapports de volume cellule-milieu plus élevés, qui se rapprochent de ceux qui sont observés *in vivo*. L'intégration d'un système de perfusion permet d'instaurer un flux de milieu (BECKWITT *et al.*, 2018; BAUDOIN *et al.*, 2007), ce qui améliore la maturité et la fonctionnalité des hépatocytes primaires (HEGDE *et al.*, 2014) et des cellules HepaRG (TENG *et al.*, 2021). Cet avantage du flux doit être gardé en mémoire lorsque l'on compare des cultures 3D en plaques de culture classiques (statique) à des cellules lévitées dans une puce. Deux conditions de culture sont alors modifiées conjointement : le flux et les ondes acoustiques.

Ces dispositifs microfluidiques sont devenus incontournables dans le domaine biomédical depuis les années 2000 (KANABEKOVA, KADYROVA et KULSHAROVA, 2022; SACKMANN, FULTON et BEEBE, 2014). Les organes sur puce sont plus reproductibles que les organoïdes, et

leurs paramètres de culture sont contrôlables (flux, analyses biologiques) (TAKEBE, ZHANG et RADISIC, 2017).

Sphéroïdes sur puce Afin de cumuler le meilleur de chaque monde, sont apparus il y a quelques années les organoïdes sur puce et les sphéroïdes sur puce, qui combinent la culture 3D et la microfluidique. Les tailles obtenues de sphéroïdes sur puce ont longtemps été hétérogènes, notamment lors de l'utilisation d'hépatocytes primaires ayant des capacités de formation de structures 3D variables d'un lot à un autre (MONCKTON, BROWN et KHETANI, 2021). Mais la technologie des systèmes microphysiologiques atteint aujourd'hui une certaine maturité, et les systèmes se complexifient. Des stratégies sont développées pour contrôler la taille des sphéroïdes et les maintenir en place sans entraînement par le flux.

Techniques d'assemblage externe

Parmi les techniques de contrôle de la position des sphéroïdes, on retrouve l'assemblage imposé par des forces extérieures (*externally driven assembly*, SOTO *et al.*, 2021, Figure 2.7), qui consiste à exercer des forces physiques sur les suspensions cellulaires pour les inciter à s'agglomérer à un endroit choisi (CHOU DHURY *et al.*, 2011). Par exemple, la lévitation (magnétique ou acoustique) maintient le sphéroïde dans le milieu de culture, sans aucun contact avec une paroi solide.

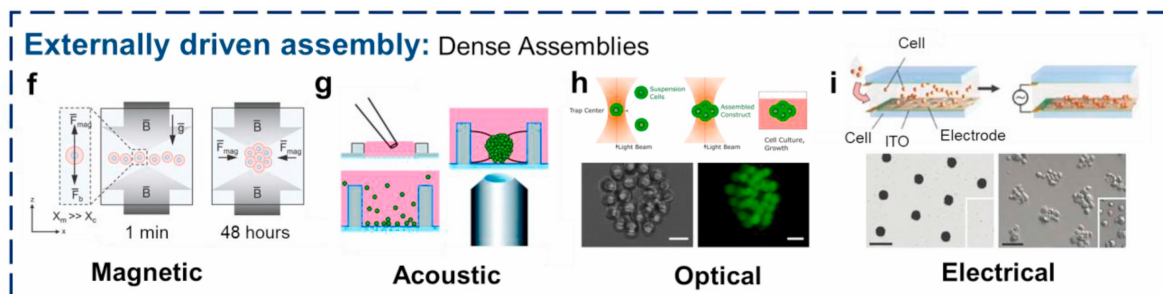


FIGURE 2.7 – Présentation de techniques d'assemblage de cellules imposé par des forces extérieures (*externally driven assembly*). Ces forces peuvent être magnétiques, acoustiques, optiques ou électriques. Adapté d'après SOTO *et al.*, 2021.

Lévitation magnétique Il est possible de marquer les cellules avec un composé magnétique, afin de les manipuler à l'aide d'une bobine Helmholtz, un dispositif d'électro-aimant capable de générer des champs magnétiques localisés (SOTO *et al.*, 2021). Les feuillets cellulaires ainsi formés se contractent spontanément pour former des sphéroïdes. Cette technique augmente la production de CYP3A4 par des hépatocytes primaires par rapport à une culture 2D, une induction des CYP450 et une production (non quantifiée) d'albumine et de MRP2 (DESAI, TSENG et SOUZA, 2017).

Lévitiation acoustique La lévitation acoustique utilise quant à elle des ondes ultrasonores pour manipuler cellules et sphéroïdes. Ses avantages sont l'agrégation rapide des cellules, leur maintien à une position définie, le renouvellement du flux, le contrôle de la taille et la possibilité de mise à l'échelle. Contrairement à la lévitation magnétique, c'est une technique de manipulation sans marqueurs, uniquement basée sur les propriétés physiques intrinsèques des objets manipulés. Comme toute technique émergente, la lévitation acoustique souffre d'un manque de connaissances, en particulier sur l'influence d'une exposition de longue durée aux ultrasons pour les cellules. Y remédier est l'un des objectifs de cette thèse. Une présentation détaillée en est faite dans le Chapitre 3.

Un récapitulatif de comparaisons des différentes méthodes de formation et de cultures de sphéroïdes est présenté sur la Figure 2.8.

Technique	Time required [day]	Cell number required [$\times 10^6$]	Number of spheroids	Uniformity control
Acoustic assembly	1	0.2	High (>6000)	Yes
Spheroid microplate ⁶³	3-7	0.5	Low (96-384)	No
Hanging drop ¹⁷	7	0.5	Low (96-384)	Yes
Magnetic levitation ⁶⁴	7	0.5	Low (96)	Yes
A) Spinner-flask ⁶⁵	14-35	5	High	No

	Spinner Culture	Hanging Drop	Rotating Wall Vessel	External Force	Cell Sheets	Microfluidics
<i>Good Size Control</i>		+			+	+
<i>Low Shear Stresses</i>		+		+	+	+
<i>High Yield</i>	+		+			+
<i>Good Control of Heterotypic Cell to Cell Ratio</i>		+			+	+
<i>Good control of the microenvironment over time</i>		+	+			+
<i>Minimal Labor</i>	+		+			
<i>Easy to Handle Micro-tissues</i>	+		+			+
<i>Possibility of Complex Shapes</i>						
<i>Observe by Microscopy</i>		+			+	+
<i>Cell Type Independent</i>		+		+		+

FIGURE 2.8 – Comparaison de différentes techniques de formation de sphéroïdes. L'assemblage par lévitation acoustique est plus rapide que les autres techniques et permet de former un grand nombre de sphéroïdes uniformes. La microfluidique apporte de nombreux avantages, par exemple le contrôle de la taille, un haut rendement et le contrôle du micro-environnement. D'après CHEN *et al.*, 2019 (A) et ACHILLI, MEYER et MORGAN, 2012 (B).

Aucune méthode n'a pour l'instant pu s'imposer, car toutes ont leurs avantages et leurs

inconvenients. Dans ce contexte, les nouvelles techniques peu étudiées jusqu'à présent, telle la lévitation acoustique, sont une alternative à explorer.

2.3 Analyse morphologique et biologique des sphéroïdes : choix des critères de validation du modèle *in vitro*

Avant de pouvoir s'insérer dans le panorama des modèles présentés en section 2.2, la lévitation acoustique doit satisfaire les critères minimaux de validation. Tous les tests disponibles ne sont pas adaptés aux caractéristiques des sphéroïdes, à cause de leur petite taille et de leur tridimensionnalité. Ceux qui sont utilisés pour la validation des sphéroïdes n'ont jamais été définis strictement; ils sont issus d'un consensus scientifique implicite. Ils peuvent être divisés en trois catégories : viabilité, morphologie et fonctionnalité. Sont présentés dans cette section les tests et valeurs de référence auxquels ont été soumis les sphéroïdes obtenus en lévitation acoustique.

2.3.1 Critères de viabilité

Pour détecter la viabilité des cellules au sein des systèmes, différents tests colorimétriques de viabilité sont disponibles : test au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (ou MTT) (GRABINGER *et al.*, 2014), iodure de propidium (BRÜNINGK *et al.*, 2020) ou marquage LIVE/DEAD calcéine/éthidium (RISBUD *et al.*, 2003).

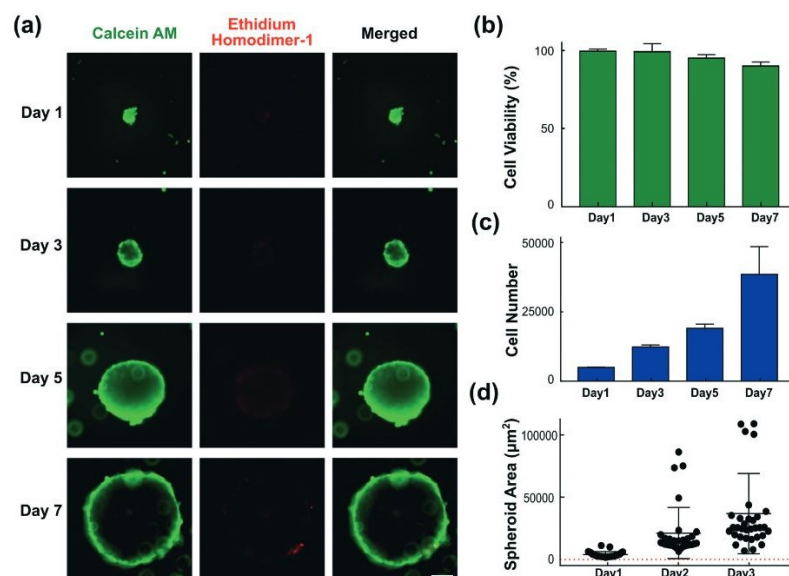


FIGURE 2.9 – Caractérisation de sphéroïdes de cellules pancréatiques de souris Panc02. a) Marquage du sphéroïde entier au LIVE/DEAD, b) Viabilité cellulaire pendant sept jours, c) Nombre de cellules au cours du temps, d) Aire du sphéroïde au cours du temps. D'après CHEN *et al.*, 2019.

2.3.2 Reproductibilité, limite de taille et cœur nécrotique

Un deuxième critère est la reproductibilité de taille. Le facteur limitant qui empêche l'augmentation en taille des sphéroïdes est l'absence de vascularisation. Les efforts en ce sens sont présentés en chapitre 5. En attendant la levée de ce verrou technologique, l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules se fait uniquement par diffusion vers le centre du sphéroïde (NAKAO *et al.*, 2019; GOMES *et al.*, 2017).

En cas de trop grande taille du sphéroïde, on observe la mort par hypoxie des cellules situées au centre, conduisant à la formation d'un cœur nécrotique (Figure 2.10), que les sphéroïdes soient formés dans des conditions classiques ou en lévitation acoustique (JAIN *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2019). La limite maximale de taille conseillée est $500\mu\text{m}$ (MOSHKAYAN *et al.*, 2018; LIN et CHANG, 2008), voire $200\mu\text{m}$ pour des sphéroïdes de cellules HepaRG (MANDON *et al.*, 2019). C'est pourquoi la standardisation de la taille est essentielle (EHRlich *et al.*, 2019; LAUSCHKE *et al.*, 2019). Elle permet de plus de s'assurer d'une réponse identique à un éventuel traitement.

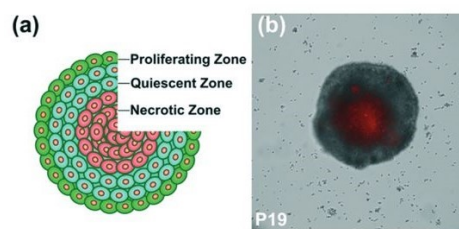


FIGURE 2.10 – Cœur hypoxique (rouge) dans des sphéroïdes a) Schéma des 3 zones, b) Détection du cœur hypoxique dans des cellules P19. D'après CHEN *et al.*, 2019.

L'un des obstacles majeurs pour l'utilisation des sphéroïdes dans le domaine de la biologie fondamentale a justement longtemps été le manque de contrôle de la taille et de la forme des sphéroïdes (EFREMOV *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2018; LIU, CHEN et WIN NAING, 2021). Il a cependant été intensément étudié et est actuellement en passe d'être levé dans de nombreux systèmes de culture. On peut voir par exemple sur la Figure 2.11 qu'il est possible d'obtenir une distribution de taille avec un faible écart type pour des sphéroïdes cultivés dans des puits de cultures.

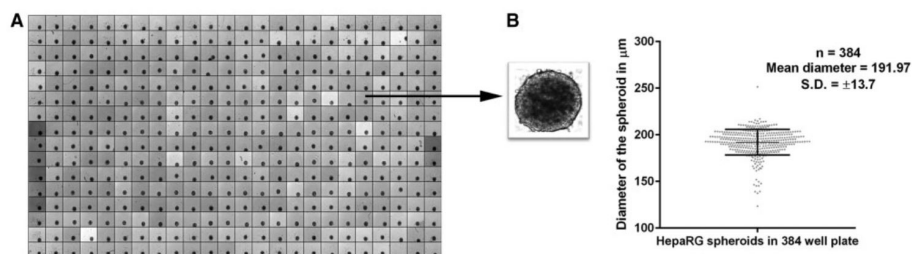


Figure 1. Morphology of HepaRG spheroids. HepaRG cells seeded at 1000 cells per well form spheroids-like structures. Single spheroid per well in a 384-well plate (A); size of the spheroid is approximately $191.97\mu\text{m}$ (B).

FIGURE 2.11 – Répartition en taille de sphéroïdes de cellules HepaRG formés dans une plaque 384 puits. Les tailles sont homogènes. D'après RAMAIAHGARI *et al.*, 2017.

2.3.3 Critères pour la validation fonctionnelle des hépatocytes

Les principaux indicateurs de fonctionnalité des hépatocytes sont :

- Morphologie des cellules, présence de canalicules biliaires, de microvillosités,
- Marqueurs de polarité,
- Expression des marqueurs d'albumine (ALB) et production d'albumine,
- Synthèse d'urée,
- Expression de marqueurs hépatiques au niveau basal, telles les enzymes de type cytochrome-oxydase (CYP450, notamment CYP3A4, CYP4A7, CYP1A1 et CYP2C9),
- Activité des cytochromes après induction,
- Etudes mécanistiques et capacité d'auto-organisation.

Ces critères s'appuient notamment sur les caractéristiques recensées des hépatocytes humains matures (CHEN *et al.*, 2018). Cependant, il est à noter que les témoins, les références et les méthodes de normalisation diffèrent d'une publication à l'autre, compliquant la comparaison de différentes études (TAKEBE *et al.*, 2013; SCHEPERS *et al.*, 2016; TAKEBE *et al.*, 2017; YAMASHITA *et al.*, 2018; FARZANEH *et al.*, 2018; BLACKFORD *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2019; MUN *et al.*, 2019). Ainsi, les quantités d'albumine et d'urée sont normalisées différemment, en fonction du nombre de cellules ou de la masse protéique totale. Une grande variété de médicaments (rifampicine, nifédipine) sont utilisés pour induire l'expression des cytochromes. Les cellules de référence peuvent être des hépatocytes dérivés d'iPS, des tissus primaires, des hépatocytes cryopréservés, ou encore des iPS humaines.

Morphologie et microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage permet de distinguer précisément les détails morphologiques du sphéroïde et des cellules (SOTO-GUTIERREZ *et al.*, 2010), fournissant des informations sur le compactage et les microstructures telles les micropores (Figure 2.12).

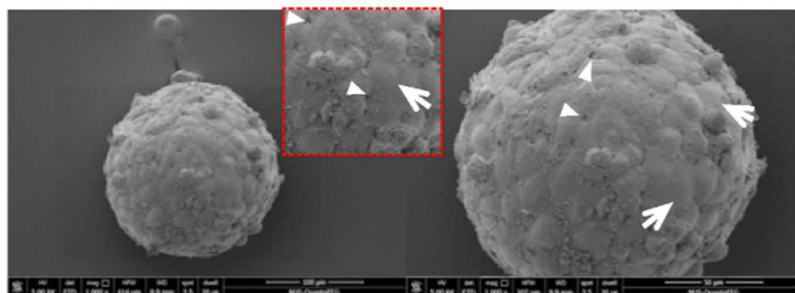
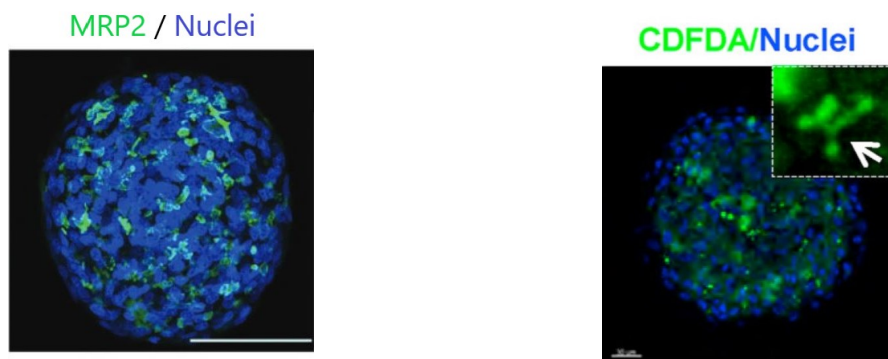


FIGURE 2.12 – Sphéroïde de cellules HepaRG observé en microscopie électronique à balayage après 2 semaines de culture sous flux. Le sphéroïde est compact. Les flèches indiquent les jonctions serrées et les triangles les micropores. D'après TENG *et al.*, 2021).

Marqueurs de polarité et présence de canalicules biliaires

Les études par immunofluorescence mettent en avant la localisation de protéines marqueurs de polarité : ZO-1 (TAKEISHI *et al.*, 2020), transporteur membranaire MRP2 (ABCC2) (HIEMSTRA *et al.*, 2019; TENG *et al.*, 2021 et Figure 2.13a). Elles peuvent aussi détecter l'excrétion de marqueurs, tel le CDFDA, dans les canalicules biliaires (Figure 2.13b).

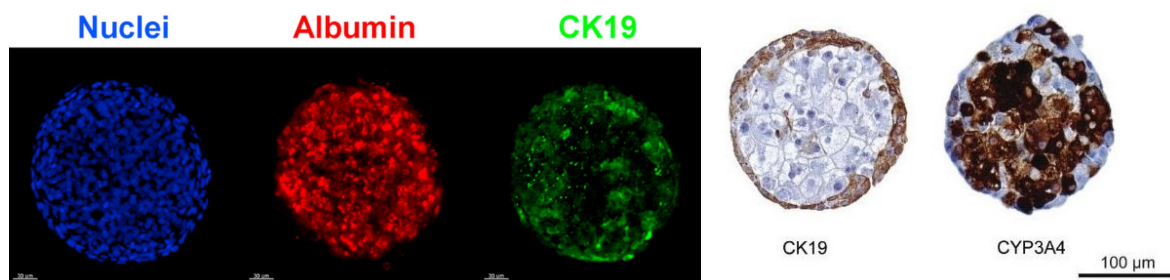


(a) Immunomarquage du transporteur apical MRP2 (barre d'échelle : 100 μm). D'après RAMAIAHGARI *et al.*, 2017. (b) Détection de CDFDA après son excrétion dans les canalicules biliaires (barre d'échelle : 30 μm). D'après TENG *et al.*, 2021.

FIGURE 2.13 – Détection de marqueurs de polarité dans des coupes de sphéroïdes de cellules HepaRG.

Localisation de marqueurs hépatiques

La localisation intrasphéroïdique des marqueurs hépatocytaires tels l'albumine, HNF4 α et CYP3A4, et du marqueur cholangiocytaire cytokératine 19 est présentée dans les travaux de HE *et al.*, 2022 et HIEMSTRA *et al.*, 2019, et illustrée sur les Figures 2.14a et 2.14b. Elle permet de valider la nature bipotente des HepaRG cultivées sous forme sphéroïdale.



(a) Détection du marqueur hépatocyttaire albumine et du marqueur cholangiocytaire KRT19 dans des sphéroïdes de cellules HepaRG après 2 semaines de culture sous flux (barre d'échelle : 100 μm). D'après TENG *et al.*, 2021. (b) Marquages immunohistochimiques de CK19 et CYP3A4 dans des coupes de sphéroïdes de cellules HepaRG (barre d'échelle : 100 μm). D'après RAMAIAHGARI *et al.*, 2017.

FIGURE 2.14 – Visualisation de différents marqueurs hépatiques à l'intérieur d'un sphéroïde grâce à des coupes immunohistochimiques.

Dosage de la production d'albumine et d'urée

Les cellules HepaRG produisent de l'albumine à environ 5-20 μg par million de cellules par jour (LÜBBERSTEDT *et al.*, 2011 ; EHRlich *et al.*, 2019 ; GUNNESS *et al.*, 2013). Les cellules HepaRG ne produisent pas toujours de l'urée en quantité détectable (MATSUI et SHINOZAWA, 2021 ; LÜBBERSTEDT *et al.*, 2011) par rapport à la production des hépatocytes primaires qui est supérieure à 5 μg par million de cellules par jour pendant la première semaine de culture (LÜBBERSTEDT *et al.*, 2011).

Expression génomique et protéique basale

L'expression basale des gènes (en l'absence de répression ou de stimulation) et la production basale protéique de marqueurs de fonctionnalité tels les cytochromes font partie des critères les plus importants de maturité, pour comparer des modèles cellulaires (Figures 2.15) ou des systèmes de culture (BELL *et al.*, 2018).

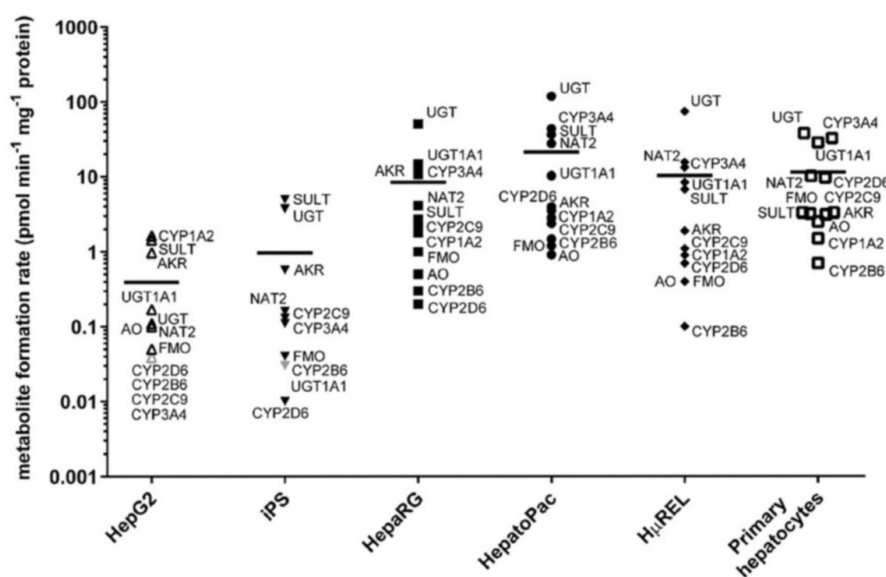


FIGURE 2.15 – Activité métabolique de onze enzymes de phase I et phase II chez différents types cellulaires hépatiques cultivés *in vitro* en 2D : HepG2 (jour 4), iCell® dérivés d'iPS (jour 4), HepaRG™ (jour 7), HepatoPac® (jour 8), HμREL™ (jour 8), et pool d'hépatocytes primaires cryopréservés (jour 0). D'après MONCKTON, BROWN et KHETANI, 2021.

Expression génomique et protéique après induction par un médicament

Des hépatocytes matures répondent à l'exposition à un médicament par une augmentation de l'expression génomique et de l'activité des récepteurs nucléaires (2.16) et des enzymes CYP450 (2.1). Le traitement aux médicaments s'effectue souvent sur une longue du-

rée d'au moins 72 heures *in vitro* (RAMAIAHGARI *et al.*, 2017; MEIRINHO *et al.*, 2022; GERETS *et al.*, 2012). L'induction d'ARNm des CYP450 est partiellement corrélée à la production protéique finale (JARVINEN *et al.*, 2022). Cette induction dépend du médicament utilisé, par exemple l'exposition à la rifampicine induit l'activation du récepteur PXR (YAMASHITA *et al.*, 2013), alors que l'exposition à l'oméprazole active le récepteur AhR (RAMAIAHGARI *et al.*, 2017).

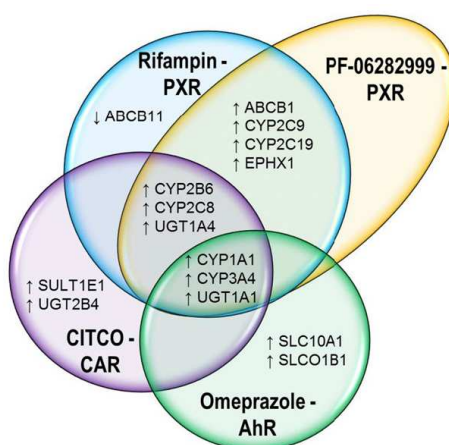


FIGURE 2.16 – Récepteurs et cytochromes impliqués dans la détoxification de la rifampicine, de l'oméprazole, de CITCO et de PF-06282999. D'après MOSCOVITZ *et al.*, 2018.

TABLE 2.1 – Valeurs d'augmentation de l'expression d'ARNm ou de l'activité protéique des cytochromes chez des cellules HepaRG après traitement à la rifampicine (RIF) ou l'oméprazole (OME); "ND" : Non déterminé et "/" : Non étudié

Référence	Médicament	ARNm ou activité	CYP1A1	CYP1A2	CYP2C9	CYP2E1	CYP3A4
GERETS <i>et al.</i> , 2012	RIF	ARNm	ND	ND	/	-2.09	25.71
LÜBBERSTEDT <i>et al.</i> , 2011	RIF	Activité	/	/	3.4	/	2.8
EHRlich <i>et al.</i> , 2019	RIF	Activité	/	/	/	/	5
MANDON <i>et al.</i> , 2019	RIF	Activité	/	ND	2.38	/	1.93
MANDON <i>et al.</i> , 2019	OME	Activité	/	ND	1.27	/	0.08

2.4 Applications actuelles de la culture *in vitro* du foie

Trois applications principales ont pour l'instant été identifiées pour les modèles *in vitro* : la modélisation de maladies (non étudiée lors de cette thèse), les tests de développement et/ou d'évaluation de médicaments et la thérapie cellulaire.

Tests de métabolisme enzymatique et de toxicité des médicaments pour la recherche pharmaceutique

De nombreux tests lors du développement de nouveaux médicaments sont réalisés sur des modèles animaux. Leurs désavantages sont pourtant de plus en plus pointés du doigt : préoccupations éthiques, ou encore différences entre les espèces (longueur du système digestif, faculté d'absorption, nature des transporteurs et des cytochromes) qui affectent pharmacocinétique et pharmacodynamique et font craindre de ne pas détecter des toxicités potentiellement mortelles chez l'humain. De plus, les études *in vivo* pour le développement de médicaments mobilisent d'importants moyens financiers, matériels et humains. Ceux-ci augmentent d'année en année, car le criblage (*screening*) explore un nombre croissant de molécules d'intérêt en parallèle.

Le renouvellement automatique du milieu et l'intégration possible de capteurs dans les dispositifs microfluidiques en font de bons candidats pour les tests de médicaments (CHRISTOFFERSSON et MANDENIUS, 2019 ; SASIKUMAR *et al.*, 2020). La chaîne de développement peut utiliser lors des premières étapes des systèmes en 2D, simples et multipliables, avant d'adopter des systèmes plus complexes comme les sphéroïdes et les modèles animaux lors des étapes suivantes (Figure 2.17).

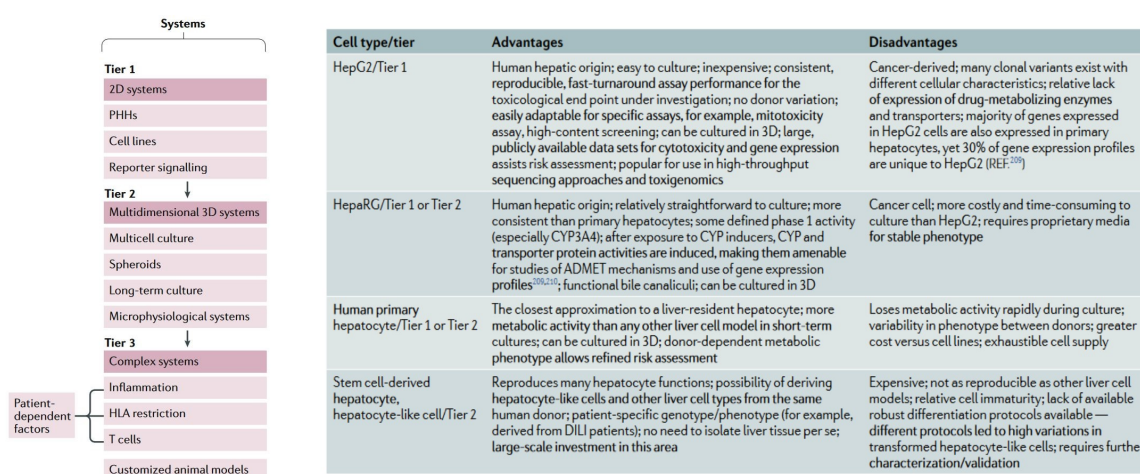


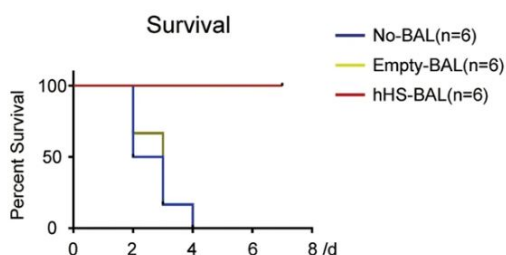
FIGURE 2.17 – Stratégie de détection des insuffisances hépatiques aiguës d'origine médicamenteuse (*Drug-induced liver injury* ou DILI) *in vitro*. Les systèmes en 3D sont recommandés pour la deuxième étape des tests de pharmaco-toxicologie, car ils sont intermédiaires en terme de coût, facilité d'usage et complexité biologique. D'après WEAVER *et al.*, 2020.

Thérapie cellulaire

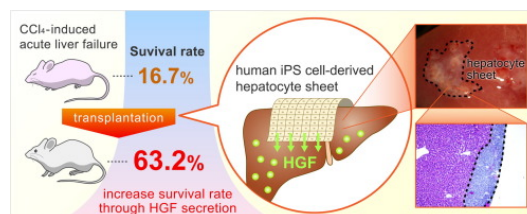
Les cultures hépatiques *in vitro* sont engagées sur la voie des applications en thérapie cellulaire. Pour aider à maintenir leurs fonctions métaboliques hépatiques, les patients en attente de greffe pourraient être reliés à un foie bioartificiel extracorporel (BAL), un bio-réacteur composé d'hépatocytes vivants (KUMAR, TRIPATHI et JAIN, 2011 ; NIBOURG *et al.*,

2012) ou de sphéroïdes d'hépatocytes dérivés d'iPS (Figure 2.18a) qui filtrent le plasma du patient.

D'autre part, l'utilisation de feuillets cellulaires a montré des résultats encourageants chez la souris (Figures 2.18b) dans le traitement de l'insuffisance hépatique aiguë (*acute liver failure*, voir chapitre 1).



(a) Augmentation du taux de survie des porcs souffrant d'insuffisance hépatique aiguë lors d'échange de plasma avec un foie bioartificiel composé de sphéroïdes d'hépatocytes dérivés d'iPS en suspension dans du milieu de culture (hHS-BAL), par rapport à l'absence de BAL (No-BAL), ou à un BAL vide (Empty-BAL). D'après CHEN *et al.*, 2020.



(b) Preuve de concept sur la souris de la transplantation d'un feuillet cellulaire d'hépatocytes dérivés d'iPS. D'après NAGAMOTO *et al.*, 2016.

2.5 Conclusion du chapitre

Les sphéroïdes peuvent être obtenus à partir de nombreux types cellulaires et de nombreuses méthodes de formation et culture. Diverses combinaisons sont déjà suffisamment robustes pour garantir la validité des tests de viabilité et de fonctionnalité établis pour ces modèles *in vitro* de foie. Cependant les techniques ont toutes leurs limitations : perte de fonctionnalité des cellules au cours du temps, mauvais contrôle de la taille, main-d'œuvre, coût, incompatibilité avec les essais cliniques ou la thérapie cellulaire.

Aucun modèle de sphéroïde hépatique n'a pu pour l'instant s'imposer comme une référence, justifiant de plus amples recherches sur l'amélioration des systèmes existants ou l'exploration de nouveaux modèles. Une innovation potentielle, la lévitation acoustique, récemment appliquée à la culture cellulaire, peut représenter une méthode innovante pour former, cultiver, et évaluer les propriétés de sphéroïdes hépatiques.

ACOUSTOFLUIDIQUE POUR LA CULTURE CELLULAIRE

3.1	Principes physiques de la lévitation acoustique et équations descriptives	46
3.1.1	Ondes acoustiques	46
3.1.2	Principes de la lévitation acoustique	47
3.1.3	Équations utilisées pour décrire la force acoustique de radiation (ARF)	50
3.1.4	<i>Streaming</i> acoustique	52
3.1.5	Limite de Rayleigh et influence du milieu de propagation	52
3.2	Lévitation acoustique pour l'ingénierie tissulaire	54
3.2.1	Lévitation de cellules à court terme	54
3.2.2	Impact des ultrasons sur la viabilité et la fonctionnalité des cellules	57
3.2.3	Température	58
3.2.4	Cavitation	58
3.2.5	<i>Streaming</i> acoustique	58
3.2.6	Altération de l'ADN et de l'expression génique	58
3.2.7	Viabilité	59
3.3	Conclusion du chapitre	59

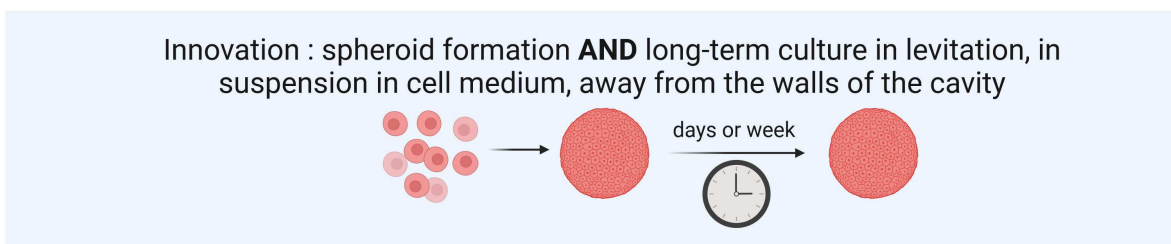
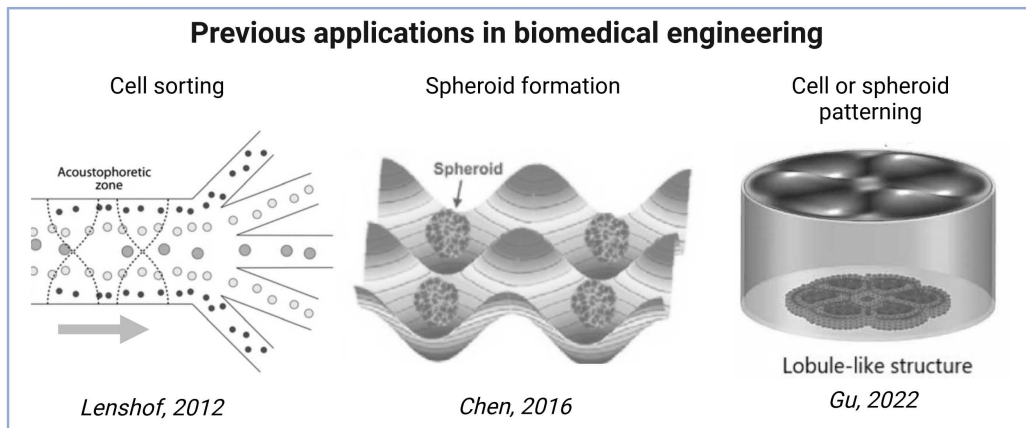
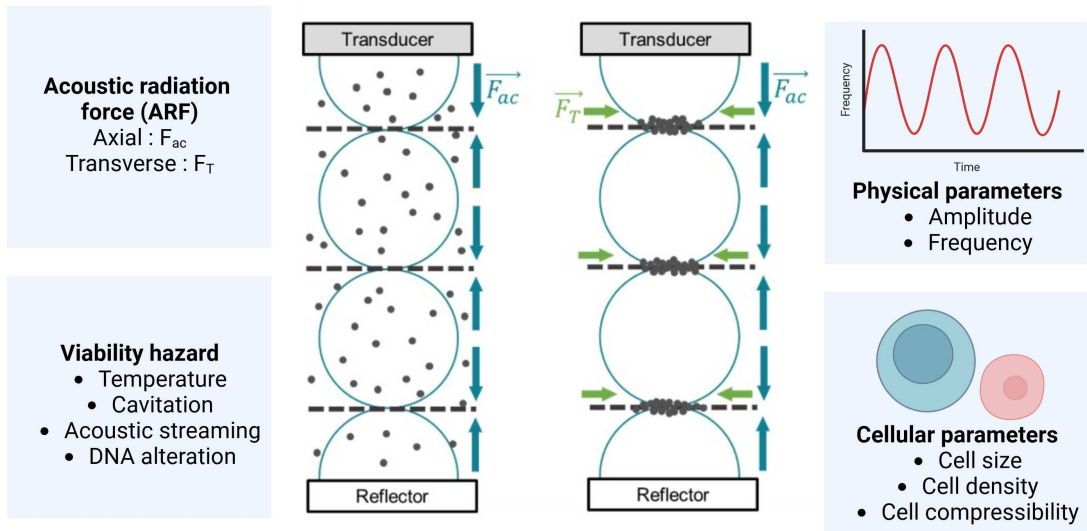
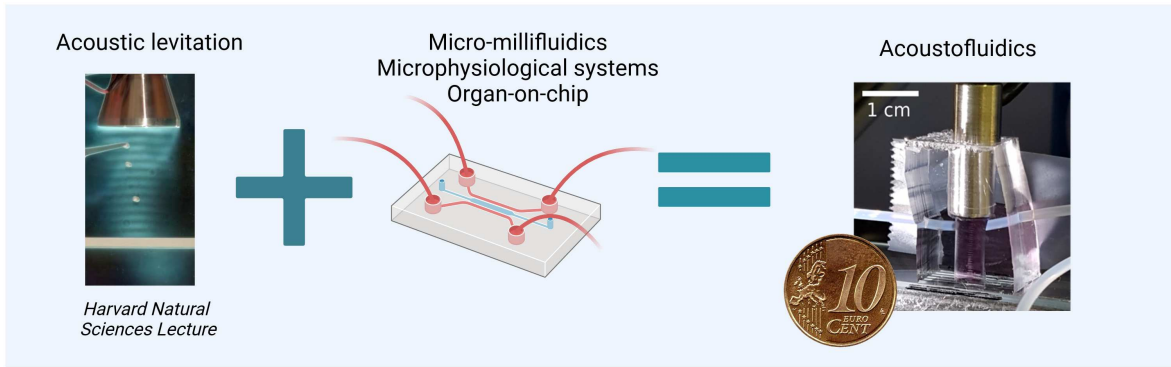


FIGURE 3.1 – Résumé graphique du chapitre 3.

L'émergence de la microfluidique couplée au développement de la génération d'ultrasons a vu naître une nouvelle discipline appelée acoustofluidique qui se révèle être une technique concurrentielle pour la formation et la culture de sphéroïdes, face aux limites des autres techniques présentées au chapitre 2.

L'acoustofluidique est définie de la manière suivante par un consortium d'experts du domaine :

"Acoustofluidique : exploitation des forces des ondes stationnaires ultrasoniques et du *streaming* acoustique dans des systèmes microfluidiques, pour la manipulation de cellules et de particules" (Titre traduit en français d'une série de 24 publications scientifiques tutoriel, BRUUS, 2011).

Avant d'être utilisée sur les cellules, la lévitation acoustique a tout d'abord été mise au point et étudiée sur des particules synthétiques (de latex, polystyrène ou silice) dans un fluide. Les grands principes gouvernant le mouvement des particules ont ainsi pu être étudiés.

L'acoustofluidique a ensuite été appliquée au tri cellulaire en flux ou au lavage cellulaire (SUGIER *et al.*, 2023; LENSHOF *et al.*, 2012), ainsi qu'en tant que moyen de caractérisation des propriétés physiques des cellules (BELLEBON *et al.*, 2022; VAROL *et al.*, 2022; FU *et al.*, 2021) ou pour stimuler la migration, la croissance ou la fonctionnalité cellulaire (STAMP *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2022). La recherche en acoustofluidique est encore développée sur ces applications, et s'y ajoute un champ récent d'applications : la formation de sphéroïdes en lévitation acoustique et la culture sur le long terme (plus de 24h).

À cause de son utilisation récente en biologie, nous n'avons que peu de connaissances sur son potentiel et ses conséquences sur les cellules.

3.1 Principes physiques de la lévitation acoustique et équations descriptives

3.1.1 Ondes acoustiques

Les ondes acoustiques sont des ondes longitudinales, c'est-à-dire qu'elles provoquent une perturbation dirigée parallèlement à la direction de propagation. Lorsque l'onde acoustique est progressive, on observe un phénomène de propagation d'une perturbation de proche en proche, sans transport de matière mais avec transport d'énergie. En effet, les particules du milieu vibrent au passage de l'onde, avant de revenir à leur position initiale. Cela entraîne des variations de pression acoustique. L'onde acoustique progressive est sinusoïdale, elle évolue en fonction du temps et de la distance comme une sinusoïde.

La fréquence f est l'un des paramètres caractéristiques d'une onde acoustique. Lors de nos expériences, nous utiliserons des ultrasons, des ondes acoustiques de l'ordre du Mégahertz (MHz). Cet ordre de grandeur utilisé en échographie ultrasonore classique offre un

bon compromis entre force de radiation, *streaming* acoustique et taille des sphéroïdes. On peut retrouver la longueur d'onde λ grâce à la formule :

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad (3.1)$$

Avec λ la longueur d'onde (μm), c la vitesse propagation dans le milieu (m.s^{-1}) et f la fréquence (Hz).

Un autre paramètre important est l'amplitude de pression acoustique, qui mesure l'amplitude avec laquelle l'onde va compresser et dilater les couches d'air. Elle s'exprime en Pascals (Pa). On ne peut pas mesurer directement la pression acoustique à l'intérieur de notre montage microfluidique car les dimensions sont trop petites pour y insérer un hydrophone sans perturber le champ acoustique. On caractérise donc l'amplitude de l'onde acoustique grâce à la tension électrique crête à crête V_{pp} appliquée à un transducteur ultrasonore par un générateur de signal. On sait alors que la densité d'énergie acoustique E_0 du système varie en fonction du carré du voltage V_{pp} : $E_0 \propto V_{pp}^2$ (DRON et AIDER, 2012).

3.1.2 Principes de la lévitation acoustique

Sans ondes acoustiques En l'absence d'ondes, la dynamique des particules sphériques dans un fluide est soumise à la poussée d'Archimède (la force subie par un corps plongé dans un fluide et soumis à un champ de gravité), à la force de pesanteur et à la force de Stokes (force de frottement du fluide sur une particule en mouvement dans le fluide). L'établissement de l'équilibre entre ces forces (flottabilité et force de Stokes) est à l'origine de la sédimentation des particules de plus forte densité que le fluide (DRON, 2011).

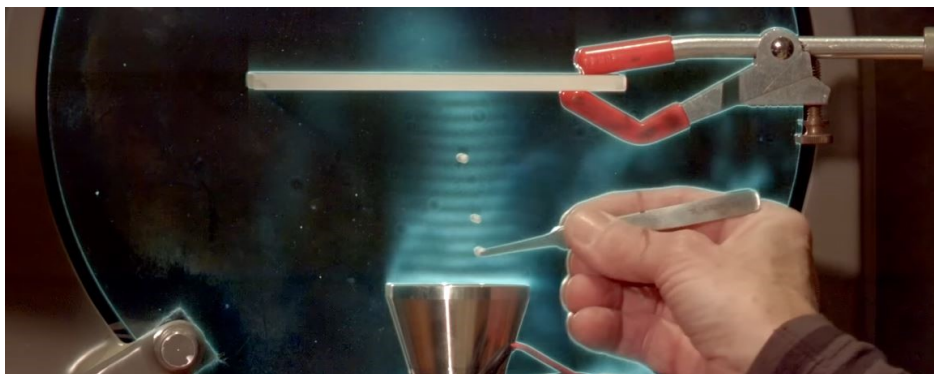


FIGURE 3.2 – Visualisation des plans nodaux (lignes horizontales blanches), des anti-nœuds de pression (lignes horizontales sombres) et de particules macroscopiques en lévitation acoustique dans l'air. Adapté de HARVARD NATURAL SCIENCES LECTURE DEMONSTRATIONS, 2017.

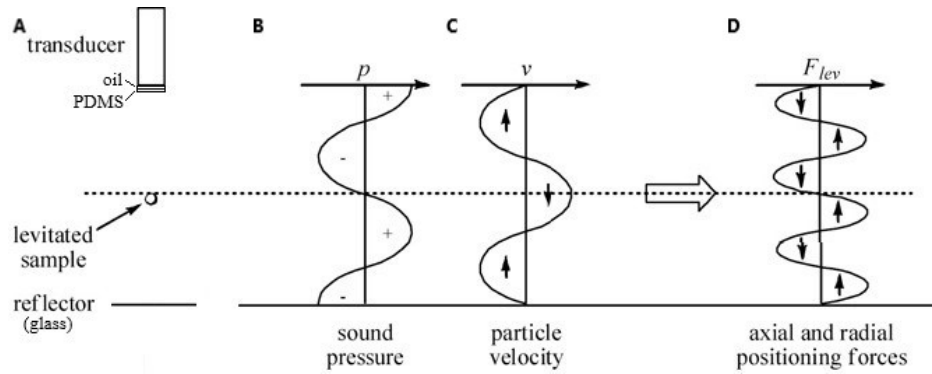


FIGURE 3.3 – A) Représentation d’un dispositif de lévitation acoustique, B) Champ de pression acoustique (centre gauche), C) Champ de vitesse des particules (centre droit), D) Forces de radiation acoustique (droite) d’une onde stationnaire. Adapté d’après LAACKMANN *et al.*, 2011.

L’instauration d’une onde stationnaire L’acoustophorèse consiste à manipuler des objets grâce aux ondes acoustiques. Deux catégories d’ondes sont utilisées à cette fin : les ondes de surface se propageant à la surface d’un matériau élastique (*surface acoustic waves* ou SAWs), dont l’étude est hors du cadre de cette thèse, ou les ondes acoustiques de volume (*bulk acoustic waves* ou BAWs), utilisées dans notre système.

L’onde acoustique produite par notre transducteur est transmise à travers le fluide (dans notre cas, après avoir traversé une couche d’huile et de PDMS) puis réfléchi par une lame de verre (réflecteur) grâce à la différence d’impédance acoustique entre le fluide et la lame. Il est à noter que les positions du transducteur et du réflecteur (lame de verre) sont interchangeables, et donc le système a parfois été utilisé en position inversé. A l’intérieur de la cavité, le champ d’onde peut être vu comme la somme de deux ondes progressives sinusoïdales : l’onde incidente et l’onde réfléchi, qui se propagent en sens inverse. Si la hauteur de la cavité est égale à un multiple de la demi longueur d’onde, leur interférence crée une onde stationnaire d’amplitude maximale. Le système se trouve alors excité sur un mode de résonance, qui permet au système d’amplifier l’énergie acoustique (BRUUS, 2012). Un champ constant spatialement de pression acoustique est ainsi formé dans la cavité résonante (Figure 3.3).

On observe une différence de phase entre les maxima de vitesse de vibration et les maxima de pression (Figure 3.3). Les régions où l’amplitude de changement de pression est la plus faible sont des plans orientés orthogonalement au sens de propagation des ondes et espacés d’une longueur d’une demi longueur d’onde (Figure 3.2). Ils sont appelés plans nœuds, ou nœuds de pression. A l’inverse, les régions où l’amplitude de changement de pression est la plus grande sont appelés ventres ou anti-nœuds de pression (COMEAU, HOCKING et DALECKI, 2016 ; OLOFSSON, HAMMARSTRÖM et WIKLUND, 2018).

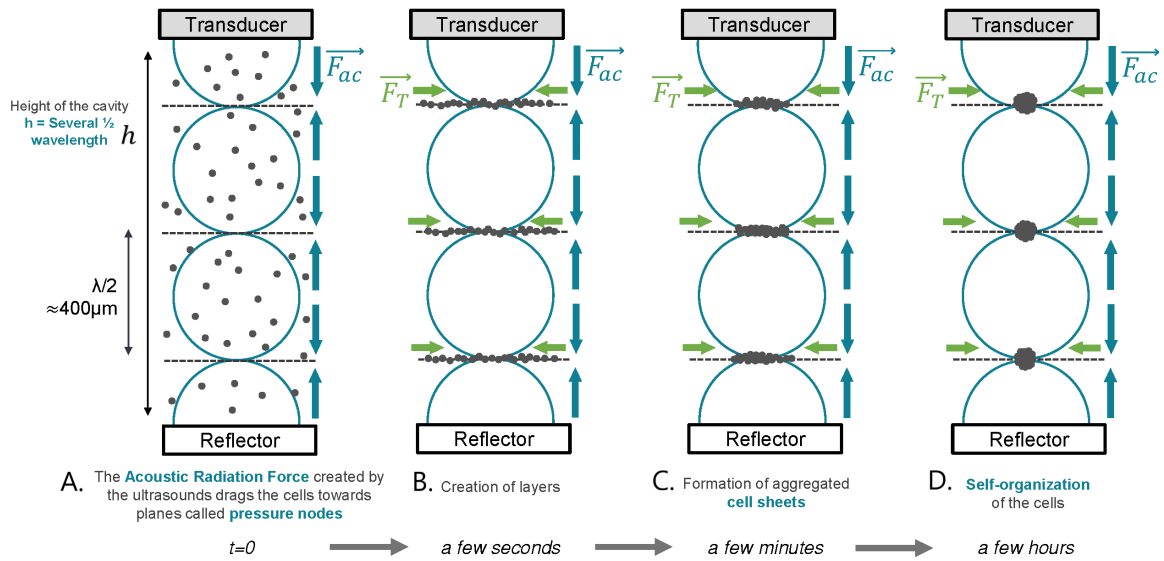


FIGURE 3.4 – Agrégation de cellules dans une cavité acoustofluidique possédant trois plans nodaux (lignes pointillées); F_{ac} : composante axiale de l'ARF; F_T : composante transversale; sinusoïde bleue : représentation des maxima du champ de pression acoustique.

La force de radiation acoustique (ARF) Quand des particules ou des cellules sont exposées à ce champ acoustique, on observe un phénomène de diffusion : l'onde acoustique est déviée par l'interaction avec l'objet (BRUUS, 2012). Les interactions non-linéaires entre l'onde stationnaire et l'onde diffusée sont à l'origine d'une force de radiation acoustique, aussi appelée ARF (*Acoustic Radiation Force*).

La force de radiation acoustique, en fonction de sa fréquence et de son amplitude, peut mettre en mouvement les particules ou cellules initialement réparties aléatoirement dans le fluide. Dans nos configurations (Figure 3.4) la force acoustique a deux composantes, l'une axiale (F_{ac}), l'autre transversale ou radiale (F_T) :

- Les particules sont soumises à l'action de la composante axiale (F_{ac}) de la force acoustique de radiation (l'ARF) (Figure 3.4.A). Cette composante, aussi appelée force de radiation primaire, fait bouger les particules verticalement. Selon les propriétés du fluide et des objets, ces derniers iront vers les nœuds ou vers les ventres de pression acoustique (voir section 3.1.3). Dans notre système, les cellules vont vers les nœuds de pression (Figure 3.4.B).
- Une fois que les particules ont atteint les plans nodaux, la composante axiale s'annule. La composante transverse (F_T) de l'ARF (force de radiation secondaire, environ 100 fois moins puissante que F_{ac} , d'après WOODSIDE, BOWEN et PIRET, 1997; WOODSIDE, 1998) n'est plus négligeable. Elle fait converger les particules vers un point de symétrie central, jusqu'à ce qu'elles forment un agrégat (Figure 3.4.C).

Après ces quelques secondes de mouvement, les particules ou cellules sous forme d'agrégats sont maintenues par la force mécanique invisible en position fixe, loin des parois (Fi-

gure 3.4). Ce phénomène est parfois qualifié de pince acoustique (*acoustic tweezer*). L'agrégat est rendu plus cohésif grâce à une force acoustique inter-particules qui n'est significative que lorsque les particules sont très proches les unes des autres : la force de Bjerknes secondaire (GARCIA2014). Dans le cas où l'on fait léviter des cellules, l'agrégat est aussi consolidé par les jonctions intercellulaires (GARCIA-SABATÉ *et al.*, 2014).

Différences entre lévitation de billes inertes et de cellules vivantes Dans notre équipe, la lévitation acoustique a tout d'abord été étudiée à l'aide de particules en polystyrène, avant d'être testée sur des cellules. Cette étape de validation a été l'objet d'une collaboration entre l'unité de Thérapie Cellulaire de l'hôpital Saint-Louis et le laboratoire PMMH. Si la mise en lévitation des cellules individuelles (immédiatement après passage des cellules) est relativement simple (injection de cellules comme pour les particules), le maintien des cellules dans le plan de lévitation pendant plusieurs heures dans un environnement favorable (gaz, température, matériaux biocompatibles, etc.) est plus délicat.

La première différence avec des particules est que les interactions entre cellules rendent très vite les feuillets cellulaires cohésifs, contrairement à des particules qui se séparent les unes des autres lorsqu'on arrête l'émission des ultrasons. La seconde différence majeure a été observée après quelques heures de culture en lévitation acoustique. En effet, nous avons pu observer que les feuillets de cellules stromales mésenchymateuses se réorganisent spontanément (conditions et paramètres physiques inchangés) sous la forme de sphéroïdes (JEGER-MADIOT *et al.*, 2021, (Figure 3.4.D). Cette première démonstration expérimentale a été le point de départ de ce travail de thèse.

3.1.3 Équations utilisées pour décrire la force acoustique de radiation (ARF)

Plusieurs modèles ont été développés afin de décrire de façon analytique la force acoustique. King a d'abord établi les équations expliquant l'effet des ondes acoustiques sur des particules incompressibles pour un champ d'onde stationnaire unidimensionnel (KING, 1934). Puis Yosioka et Kawasima ont élargi l'étude aux particules compressibles (YOSIOKA et KAWASIMA, 1955). Enfin, Gorkov a effectué une généralisation du modèle (GOR'KOV, 1962). Dans tous les cas, on fait l'hypothèse de particules sphériques très petites devant la longueur d'onde acoustique (régime de Rayleigh).

Seule la composante axiale de l'ARF, la plus étudiée, sera ici détaillée sous forme d'équations. Nous utiliserons le modèle de YOSIOKA et KAWASIMA, 1955, qui est valable dans la plupart des cas utilisés dans cette thèse. La force acoustique y est exprimée sous la forme suivante :

$$F_{ac} = \frac{\pi}{4} E_0 k d_p^3 F_Y \sin(2kz) e_z \quad (3.2)$$

avec E_0 la densité d'énergie acoustique du résonateur, k le nombre d'onde, d_p le diamètre des particules/cellules, F_Y le facteur de contraste acoustique, z la position axiale de la particule par rapport au plan nodal. On peut ainsi constater que plus le diamètre de l'objet est important et plus la densité d'énergie acoustique est importante, plus la force subie par l'objet sera grande.

Expliquons ces facteurs individuellement :

- La densité d'énergie acoustique E_0 correspond à l'énergie emmagasinée par le fluide sous forme d'énergie cinétique et d'énergie potentielle.
- Le nombre d'onde k est égal à $k = 2\pi/\lambda$, c'est-à-dire $k = \omega/v_f$ avec $\omega = 2\pi f$, f la fréquence, λ la longueur d'onde, et v_f la vitesse de propagation dans le fluide. Il est proportionnel au nombre d'oscillations effectuées par l'onde par unité de longueur.
- Le facteur de contraste acoustique F_Y dépend de la densité (facteur de densité F_K) et de la compressibilité (facteur F_Y) des particules utilisées, ainsi que des propriétés du fluide. S'il est supérieur à zéro (comme c'est le cas pour des cellules), les particules migrent vers les plans nodaux. Sinon elles se dirigent vers les ventres de pression (NOVOTNY, LENSCHOF et LAURELL, 2021). On comprend ainsi que plus la différence de densité par rapport au fluide est importante, plus la force acoustique subie par l'objet est grande et donc plus la vitesse de migration est élevée vers les nœuds de pression.

Le facteur de contraste acoustique s'écrit de la façon suivante :

$$F_Y = F_K + F_Y = \frac{1 + \frac{2}{3}(1 - \frac{\rho_f}{\rho_p})}{2 + \frac{\rho_f}{\rho_p}} - \frac{\rho_f c_f^2}{3 \rho_p c_p^2} \quad (3.3)$$

avec :

- ρ_f la densité du fluide, $\rho_f = 998 \text{ kg.m}^{-3}$ pour de l'eau.
- ρ_p la densité de la particule, $\rho_p = 1050 \text{ kg.m}^{-3}$ pour des particules de polystyrène.
- c_f la célérité du son dans le fluide, $c_f = 1480 \text{ m.s}^{-1}$ pour de l'eau à $T=293 \text{ K}$.
- c_p la célérité du son dans la particule, $c_p = 2407 \text{ m.s}^{-1}$ pour des particules de polystyrène.

Comme on peut le voir, le facteur de contraste acoustique peut être calculé pour des particules dont les dimensions et les propriétés physiques sont connues. En revanche, il est inconnu pour des cellules. En général il est positif, ce qui est confirmé par l'accumulation des cellules aux nœuds de pression. En effet, si le contraste acoustique est négatif, cela change le signe de la force acoustique et les particules ou cellules s'accumulent aux anti-nœuds de pression. Il est possible de mesurer le facteur de contraste acoustique de cellules en mesurant leurs vitesses de migration vers les nœuds de pression après avoir au préalable mesurer l'énergie acoustique du système avec des particules dont on connaît les propriétés (BELLEBON *et al.*, 2022 ; DRON et AIDER, 2012). Ceci n'a malheureusement pas pu être réalisé au cours de cette thèse.

3.1.4 Streaming acoustique

Un autre phénomène est créé par les ultrasons dans la cavité : le *streaming* acoustique, qui crée des flux dans le fluide. Il s'agit d'un effet du second ordre moyenné au cours du temps qui génère des rouleaux dans le fluide (Figure 3.5). L'aspect théorique de ce phénomène n'a pas été étudié pendant cette thèse, mais a fait l'objet d'études spécifiques telle celle de WIKLUND, GREEN et OHLIN, 2012. Les auteurs y décrivent le *streaming* de la manière suivante :

"L'état du volume d'un fluide, à travers lequel une onde acoustique se propage peut être décrit par des oscillations de pression et vitesse. Dans un fluide idéal, le déplacement des particules moyenné au cours du temps, c'est-à-dire le flux net du fluide, est égal à zéro en tout point. Cependant, dans un fluide réel, à cause de l'atténuation visqueuse, le déplacement des particules du fluide pendant chaque cycle d'oscillation devient non nul. Cet effet local peut provoquer la formation de flux de *streaming* à l'échelle globale. **Ainsi, le *streaming* acoustique est un flux continu de fluide formé par l'atténuation visqueuse des ondes acoustiques.**" (traduit depuis WIKLUND, GREEN et OHLIN, 2012)

Il existe trois types de *streaming* :

- Le *streaming* de Schlichting (au niveau de la frontière interne de la cavité)
- Le *streaming* de Rayleigh (au cœur du fluide)
- Le *streaming* d'Eckart (formé par la dissipation de l'énergie acoustique dans le fluide)

Le principal *streaming* observé dans nos systèmes est le *streaming* d'Eckart. Il a été pris en compte lors de la conception de la puce (voir Chapitre 4.5). Il est bénéfique s'il reste faible et permet de brasser le milieu de culture, mais trop fort, il devient problématique car il déstabilise les cellules ou sphéroïdes en lévitation.

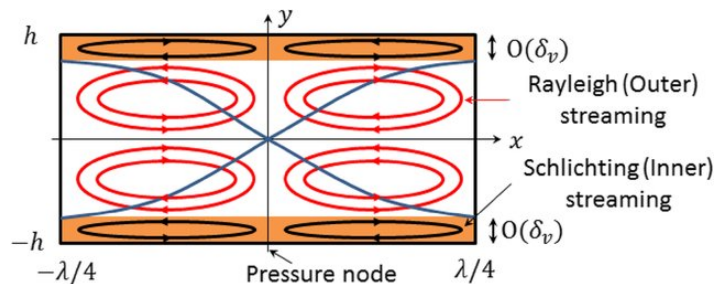


FIGURE 3.5 – Établissement de *streaming* dans une cavité acoustofluidique ; bleu : champ de pression acoustique ; rouge et noir : rouleaux de *streaming*. Plusieurs rouleaux de *streaming* se forment dans une cavité. D'après LEI *et al.*, 2018.

3.1.5 Limite de Rayleigh et influence du milieu de propagation

Comme évoqué précédemment, les modèles théoriques utilisés pour obtenir l'expression analytique de la force acoustique reposent sur l'hypothèse que le diamètre de la parti-

cule est beaucoup plus petit que la longueur d'onde acoustique, c'est-à-dire $d_p \ll \lambda$ (BRUUS, 2012). Cette limite est appelée limite ou approximation de Rayleigh (DOINIKOV, 1994; SILVA et BRUUS, 2014).

Les domaines de validité et d'applications en fonction de la taille des objets sont résumés dans le Tableau 3.1. Si l'objet est trop petit ($d_p \ll 1\mu\text{m}$), la force acoustique est trop faible et risque d'être dominée par le flux de *streaming*, créé par l'atténuation de l'onde acoustique dans le milieu. L'effet du flux sur l'objet en lévitation se matérialise au travers de la force de Stokes $F_s = -6\pi\nu rrv$. Il y a donc compétition entre la force de radiation ($\propto d^3$) et la force de Stokes ($\propto d$), et le rapport des deux est proportionnel au carré du diamètre de la particule. Avec notre configuration, les dimensions optimales sont comprises entre $1\mu\text{m}$ et $\lambda/10$. Cependant, comme nous le verrons par la suite, nous arrivons à maintenir en lévitation acoustique des sphéroïdes cellulaires de grandes dimensions ($d_p \propto \lambda$), donc bien au-delà du régime de Rayleigh, dans le régime de diffusion de Mie.

TABLE 3.1 – Influence théorique de l'ARF selon la taille de la particule

diamètre $< 1\mu\text{m}$	$1\mu\text{m} < \text{diamètre} < \lambda/10$	diamètre $> \lambda/10$
L'ARF n'est pas suffisante pour piéger la particule qui est entraînée par le <i>streaming</i> acoustique du fluide, à travers la force de Stokes.	L'ARF devient prépondérante tel que décrit par les équations présentées plus haut.	La théorie développée au chapitre 3.1.2 ne s'applique plus, les hypothèses ne sont plus respectées. Cependant, nous arrivons à maintenir en lévitation des agrégats de cellules d'une centaine de micromètres de diamètre.

Les ondes acoustiques se propagent à une vitesse différente selon les propriétés du milieu de propagation : température, masse volumique et constante de compressibilité. La vitesse des ondes est ainsi plus élevée dans un liquide que dans un gaz : elle est de $1482\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ dans l'eau à 20°C et de $343\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ dans l'air à 20°C . Pour une même fréquence, la longueur d'onde sera plus petite dans l'eau que dans l'air, selon l'équation 3.1.1. Dans l'air, il est possible de faire léviter des organismes entiers (Figure 3.6) en utilisant des "basses" fréquences (quelques kHz). Lors de nos expériences, la cavité est remplie de milieu de culture, assimilable à de l'eau d'un point de vue physique. La vitesse du son dans l'eau étant de $1.5 \times 10^3\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, les ondes produites avec une fréquence proche de 2 MHz et de longueur d'onde de $\sim 750\mu\text{m}$ forment des plans nodaux éloignés d'approximativement $400\mu\text{m}$ (demi longueur d'onde). Cela permet d'avoir une trentaine de plans nodaux dans une seule cavité de hauteur $h = 10\text{mm}$.

Lors de nos expériences, nous faisons léviter des particules et des amas cellulaires d'une dimension ($\sim 200\mu\text{m}$) de même ordre de grandeur que la longueur d'onde acoustique ($\sim 700\mu\text{m}$) dépassant ainsi la limite théorique. L'expression de la force acoustique va-

lable au-delà de la limite de Rayleigh fait l'objet de recherches actives dans la communauté acoustofluidique (DUPUIS *et al.*, 2021 ; THIRISANGU, HEMACHANDRAN et SUBRAMANI, 2023 ; BAASCH et DUAL, 2018).

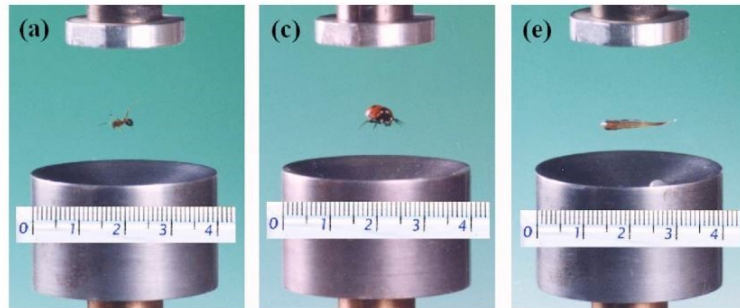


FIGURE 3.6 – Lévitiation de petits organismes macroscopiques dans l'air. La limite de Rayleigh est plus élevée dans l'air que dans l'eau. D'après XIE *et al.*, 2006 .

3.2 Lévitiation acoustique pour l'ingénierie tissulaire

L'acoustofluidique a récemment été identifiée comme une technique prometteuse pour l'ingénierie tissulaire (Figure 3.7).

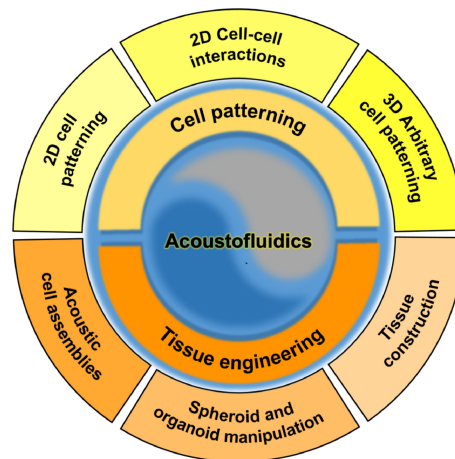


FIGURE 3.7 – Illustration des applications de l'acoustofluidique en structuration de motifs cellulaires et ingénierie tissulaire. Elle permet à la fois de créer des assemblages cellulaires, et de manipuler les sphéroïdes ainsi créés. D'après WU *et al.*, 2022.

3.2.1 Lévitiation de cellules à court terme

Les principales publications présentant la lévitation acoustique pour l'ingénierie tissulaires sont présentées dans le Tableau 3.2.

TABLE 3.2 – Expériences de lévitation acoustique de cellules, classées par durée croissante

Référence	Type de cellules	Durée de lévitation (min)	Fréquence (MHz)	Tension (V_{pp}) ou pression acoustique (Pa)	Nombre d'agré-gats par puce	Après lévitation
CHEN <i>et al.</i> , 2019	Cellules tumorales Panc02	3 min	Proche de 13.13-13.41 MHz	Non communiqué	Plus de 12 000	Culture dans des plaques à faible adhérence
BAZOU <i>et al.</i> , 2008	HepG2	5 min	Non précisé	0.85 MPa pendant 1 min puis 0.09 MPa pendant 4 min	1	Encapsulation dans un hydrogel, suivie de 10 jours de culture sans lévitation
BAZOU, 2010	HepG2	5 min	2.23 MHz	0.85 MPa/20 V_{pp} pendant 1 min puis 0.09 MPa/3.5 V_{pp} pendant 4 min	1	Encapsulation dans un hydrogel, suivie de 10 jours de culture sans lévitation
COMEAU, HOCKING et DALECKI, 2016	HUVEC	15 min	Entre 1 et 2 MHz	Non communiqué	Plusieurs	Culture pendant 10 jours
LIU <i>et al.</i> , 2007	HepG2	30 min	2.24 MHz	1 min à 60 V_{pp} puis 29 min à 20 V_{pp}	Plusieurs	
EDWARDS <i>et al.</i> , 2007b	HepG2	10 à 30 min	1.5 MHz	110 kPa	Plusieurs	Etude de la viabilité par bleu Trypan
KUZNETSOVA <i>et al.</i> , 2009	HepG2 et hématies RBCs	30 min	2 MHz	60 V_{pp} pendant 1 min puis 20 V_{pp} pendant 29 min	1 ou plusieurs	
KHEDR <i>et al.</i> , 2019	Huh7 (<i>human hepatoma cell line</i>)	1 à 16 h	Balayage entre 1.44 et 1.51 MHz	Environ 380 kPa	9 à 12 discoïdes	
IM <i>et al.</i> , 2022	MSC	12h				
PARK, 2023	MSC	12h				
TAIT <i>et al.</i> , 2019	Cellules épithéliales et fibroblastes	24 h	Balayage entre 1,95 et 2,12 MHz	Non communiqué	1	
JEGER-MADIOT <i>et al.</i> , 2021	Cellules stromales mésenchymateuses	24 h	2,15 MHz	3.5 V_{pp}	Jusqu'à 30	Étude de la viabilité, marquages H&E et Ki67, remise en culture et différenciation

En ingénierie tissulaire, l'acoustofluidique est principalement utilisée pour agréger pendant une courte durée les cellules dans des pièges acoustiques. La conception des dispositifs doit être soigneusement étudiée pour ne pas créer de sphéroïdes trop grands présentant des cœurs nécrotiques (WU *et al.*, 2018; SHOURABI, 2021). Après quelques minutes, les cellules piégées à l'emplacement des plans nodaux sont immobilisées assez durablement pour qu'un réseau de jonctions intercellulaires s'établisse (OLOFSSON, HAMMARSTRÖM et WIKLUND, 2018), formant des feuillettes cellulaires (Figure 3.8a) et des sphéroïdes (Figure 3.8b).

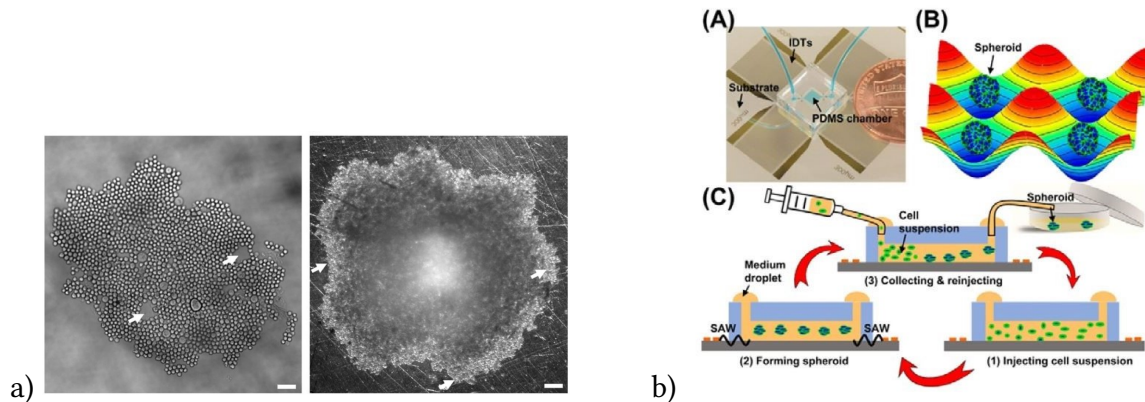
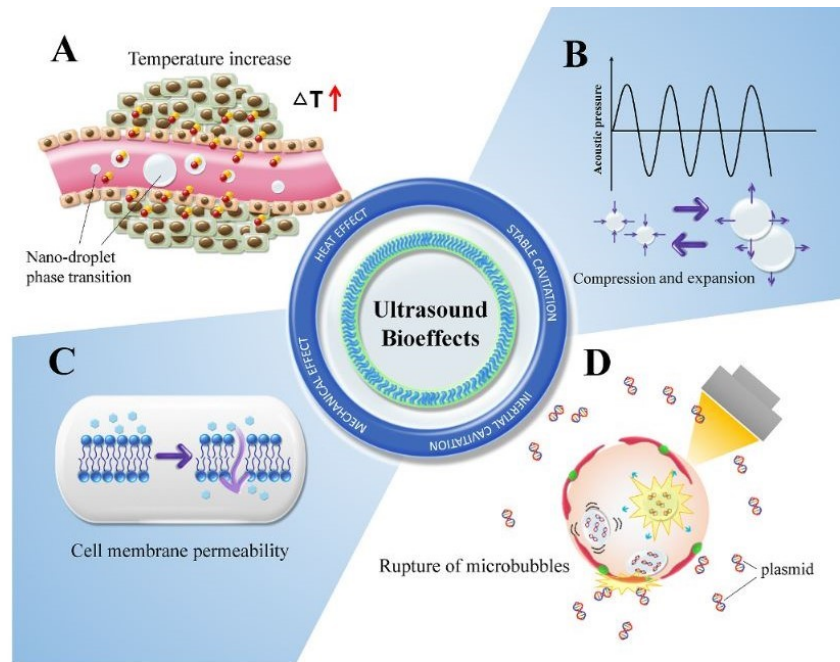


FIGURE 3.8 – a) Agrégation de cellules HepG2 (feuillet cellulaire) pendant 5 minutes en lévitation acoustique. D’après BAZOU *et al.*, 2008, b) Agrégation de cellules HepG2 (sphéroïdes) grâce à des ondes acoustiques de surface (SAW). D’après CHEN *et al.*, 2016.

La validation de paramètres ultrasonores biocompatibles a permis le développement de la culture à moyen terme (quelques heures) en lévitation acoustique (JEGER-MADIOT *et al.*, 2021; KHEDR *et al.*, 2019; IM *et al.*, 2022; PARK *et al.*, 2023; TAIT *et al.*, 2019). L’enjeu n’est alors plus seulement d’agréger les cellules mais de caractériser leur auto-organisation et comparer leur fonctionnalité à celle de cellules cultivées avec des méthodes plus classiques. Ainsi, KHEDR *et al.*, 2019 ont observé une augmentation de la production d’albumine et d’urée par des cellules d’hépatomes lévitées, par rapport à une culture 2D. JEGER-MADIOT *et al.*, 2021 mettent en évidence le passage spontané d’un feuillet cellulaire à un sphéroïde, une bonne viabilité et une fonctionnalité augmentée chez des cellules stromales mésenchymateuses cultivées en lévitation acoustique pendant 24 heures.

Les agrégats formés dans la cavité peuvent également être encapsulés dans un hydrogel, tel que de l’alginate, si l’on souhaite conserver leur forme 3D plus longtemps (BAZOU *et al.*, 2008). Cependant, l’ajout de xénocontaminants comme l’alginate n’est pas conseillé dans un milieu de culture adapté à une utilisation chez l’humain. L’alternative explorée par notre équipe est de garder les cellules en lévitation acoustique pendant toute la durée de la culture, c’est-à-dire plusieurs jours, voire semaines. La culture pendant une telle durée permet de caractériser entièrement la dynamique d’auto-organisation et d’exposer plus longtemps les cellules à cet environnement favorable.

Un dispositif acoustofluidique inspiré de JEGER-MADIOT *et al.*, 2021 a été développé dans le cadre de la thèse. Il a été adapté pour pouvoir être utilisé sur de plus longues durées. Il est détaillé en chapitre 4.



The bioeffects of ultrasound in our body. A. The thermal effect of ultrasound causes local temperature increase and volatilization of liquid fluorocarbon. B. The stable cavitation effect of ultrasound causes the microbubbles in the medium to expand or shrink. C. The mechanical effect of ultrasound increases cell membrane permeability. D. Ultrasound causes inertial cavitation and rupture of microbubbles in the medium.

FIGURE 3.9 – Synthèse des différents effets potentiellement induits par les ultrasons sur les cellules. Ils s’agit de l’augmentation de température, de la compression, de la perméabilité des membranes et des microbulles. D’après DU *et al.*, 2022.

3.2.2 Impact des ultrasons sur la viabilité et la fonctionnalité des cellules

L’utilisation d’ondes ultrasonores pendant une plus longue durée induit des défis propres, en particulier leur incidence sur les cellules. Plusieurs études ont ainsi cherché à caractériser l’effet des ultrasons sur les cellules pour vérifier l’innocuité de la lévitation acoustique (WIKLUND, 2012). Les ondes acoustiques sont impliquées dans de nombreuses applications biomédicales à visée exploratrice (échographie) ou destructrice (destruction de tumeurs). La nocivité potentielle des ultrasons dépend des paramètres physiques de l’onde appliquée (fréquence et amplitude). Ainsi, les ultrasons de haute intensité (HIFU) (LIU *et al.*, 2018) peuvent provoquer des dégâts mécaniques et biologiques. Ils créent des pores dans la membrane plasmique, des lyses cellulaires, ou encore des dégradations de l’ADN (FURUSAWA *et al.*, 2014; DU *et al.*, 2022). Les risques liés aux ultrasons de moyenne intensité sont l’augmentation de température, la cavitation, le stress de cisaillement, ou encore l’altération de l’ADN (Figure 3.9).

3.2.3 Température

La génération d'ondes acoustiques par le transducteur peut provoquer un échauffement du transducteur, qui peut ensuite augmenter la température dans la cavité acoustique. Or la température recommandée pour la culture cellulaire est 37°C avec une tolérance de plus ou moins un degré Celsius. En dehors de cette limite, il y a un risque de surchauffe des cellules. Une élévation de température de quelques degrés est parfois suffisante pour déstabiliser les protéines intracellulaires et provoquer un arrêt de la croissance cellulaire ou du cycle cellulaire. Il est donc essentiel de s'assurer que la température n'augmente pas dans la cavité. La hausse de la température en fonction de la tension a été caractérisée dans le cadre d'une autre thèse (thèse X. Mousset, soutenue en juin 2023). Nous avons vérifié que la configuration utilisée (fréquence 2 MHz et voltage de l'ordre de 3.5 V_{pp}), déjà testée sur des cellules stromales mésenchymateuses, ne provoque pas d'élévation de température.

3.2.4 Cavitation

La cavitation, c'est-à-dire la formation de bulles, est un autre phénomène provoqué par les ultrasons. Elle est en général causée par des ultrasons compris entre 20 kHz et quelques Mégahertz. La cavitation peut induire la rupture des membranes cellulaires, ou encore la destruction des cellules. Cependant, ce phénomène est très limité dans le cas d'une onde stationnaire de faibles amplitudes, comme dans notre cas, qui plus est pour de faibles puissances ($P < 0.5$ W). De plus, du fait que la cavitation apparaît là où la variation de pression est la plus forte, c'est-à-dire aux ventres de pression, elle aura plus d'effet dans les ventres que dans les plans nodaux où se trouvent nos cellules (WIKLUND, 2012).

3.2.5 Streaming acoustique

Le flux créé par les ondes acoustiques, appelé plus couramment *streaming* acoustique, est également une source potentielle de danger pour les cellules, car il génère une contrainte de cisaillement. Lorsque le *streaming* est modéré, comme c'est le cas dans nos expériences, il est bénéfique. Il permet de favoriser le mélange du milieu de culture dans la puce, ce qui favorise l'oxygénation et l'apport en nutriments (WIKLUND, 2012; MARSHALL et WU, 2015; SURI *et al.*, 2002).

3.2.6 Altération de l'ADN et de l'expression génique

Les ondes acoustiques peuvent causer des dommages à l'ADN (MILOWSKA et GABRYELAK, 2007). L'exposition aux ultrasons a aussi été rapportée comme cause de modifications d'expression génique, augmentant par exemple l'expression du gène agrégane chez des rats traités avec des ultrasons de faible intensité (YANG *et al.*, 1996; UN *et al.*, 2011).

3.2.7 Viabilité

Les tensions appliquées aux transducteurs dans notre étude sont faibles (moins de $5 V_{pp}$), de même que la puissance ($< 0.1 W$), empêchant tout phénomène de cavitation. Les fréquences proches de 2 MHz sont couramment utilisées en imagerie médicale pour des échographies Doppler. L'ordre de grandeur de l'ARF subie par une particule dans la cavité peut être calculée grâce aux équations présentées plus haut, et est de quelques picoNewton pour une cellule de $15 \mu m$ de diamètre. Elle est comparable à la force de gravité qui s'exerce sur cette cellule.

A priori, notre dispositif ne présente donc pas de risque pour les cellules. Par ailleurs, le processus d'auto-organisation est en soit un bon indicateur de viabilité des cellules. Cependant, le consensus scientifique est que la biocompatibilité ne peut pas être prédite et doit être évaluée individuellement pour chaque appareil grâce à des tests de viabilité cellulaire (bleu Trypan, LIVE/DEAD, *etc.*, voir Chapitre 2). Certaines études ont montré que des cellules soumises à des ultrasons de l'ordre de 2.6 MHz pendant plusieurs heures restent viables et n'ont pas de réduction de leur taux de croissance (VANHERBERGHE *et al.*, 2010). Les premières cellules mises en lévitation par notre équipe étaient des cellules stromales mésenchymateuses (MSCs) pendant 24h, sur lesquelles aucun problème de viabilité n'a été observé. Ces résultats sont confirmés par les nombreuses études de lévitation qui ne rapportent pas de dommage particulier sur les cellules.

3.3 Conclusion du chapitre

L'acoustofluidique, et plus particulièrement l'utilisation de la lévitation acoustique dans un environnement microfluidique ou millifluidique, a été beaucoup caractérisée du point de vue physique. Le comportement de particules dans ces dispositifs acoustiques est prédit par des équations prenant notamment en compte l'énergie acoustique, la fréquence de l'onde acoustique, la taille, la forme, la densité et la compressibilité des particules. Le comportement de cellules humaines dans ces dispositifs peut être assimilé en première approximation à celui de particules aux propriétés similaires. Utilisée pour le tri cellulaire et la formation de sphéroïdes, la lévitation acoustique est étudiée par notre équipe pour la culture cellulaire pendant des durées de plusieurs jours. De nouvelles problématiques doivent alors être étudiées : augmentation de température, influence sur la viabilité cellulaire ou altérations de l'ADN.

CONCEPTION DES SYSTÈMES MICROPHYSIOLOGIQUES

4.1	Considérations à prendre en compte lors de la conception de la cavité	64
4.2	Choix de l'échelle	64
4.3	Processus de fabrication et matériaux utilisés	66
4.4	Bulles et dispositifs microfluidiques	69
4.4.1	Sources d'apparition des bulles	69
4.4.2	Gestion des bulles	70
4.5	<i>Streaming</i> acoustique	71
4.6	Conclusion du chapitre	72

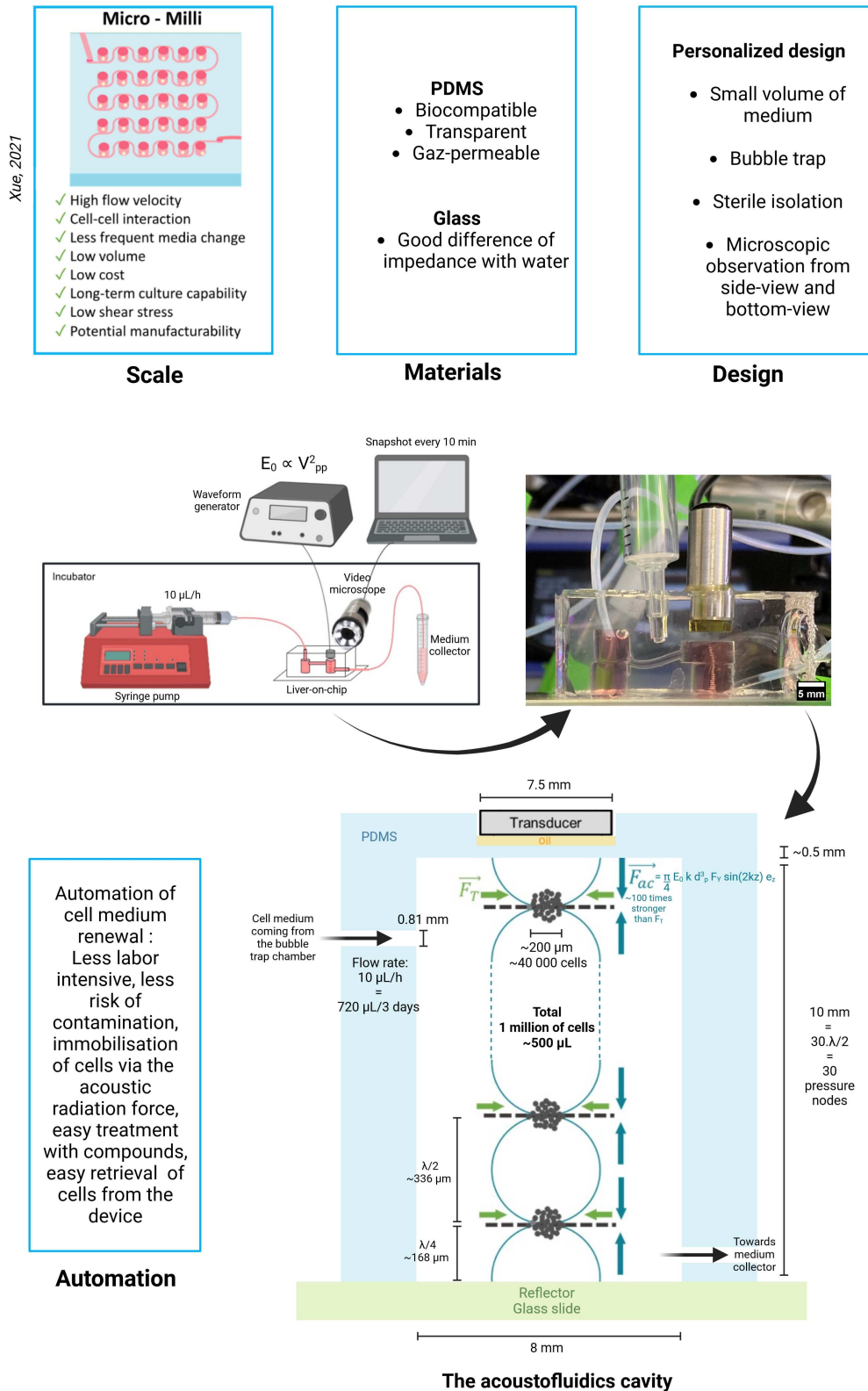


FIGURE 4.1 – Résumé graphique du chapitre 4.

4.1 Considérations à prendre en compte lors de la conception de la cavité

Les systèmes microphysiologiques (présentés au chapitre 2.2.1) promettent de contrôler très précisément le micro-environnement des cellules : maîtrise de la composition chimique du milieu, instauration d'un flux de milieu (YOSHIMITSU *et al.*, 2014), calcul et maîtrise des contraintes physiques telles que le stress de cisaillement (*shear stress*) (BISSOYI *et al.*, 2016), *etc.* Ces dispositifs augurent une évolution vers des systèmes de cultures plus biomimétiques et à fort rendement (*high throughput*) (ZHANG *et al.*, 2017), mais seulement s'ils sont conçus avec soin. Ainsi, la conception des systèmes microphysiologiques pour la culture cellulaire à long terme en lévitation acoustique doit être optimisée et réfléchie. Elle doit répondre à un cahier des charges minimal : une biocompatibilité, l'absence de bulles dans le système fluide et un apport suffisant en nutriment et oxygène, souvent *via* le renouvellement du milieu de culture. Idéalement, le design de la puce doit aussi favoriser une conception modulable, avoir un haut rendement (par exemple parallélisation et rapidité des tests dose-réponse de médicaments), fournir une bonne reproductibilité (de forme et taille des sphéroïdes, de viabilité, de fonctionnalité), faciliter la manipulation par l'utilisateur, autoriser le bon fonctionnement d'éventuels stimuli extérieurs comme les ondes acoustiques et enfin permettre l'utilisation de divers moyens d'analyses optiques ou de capteurs (microscopie optique et confocale, mesure d'oxygène...) (MOSHKAYAN *et al.*, 2018).

4.2 Choix de l'échelle

La première étape est de choisir une échelle de dispositif adaptée à l'application souhaitée. En Figure 4.2 sont présentés les avantages de différentes échelles de culture.

Un compromis doit être trouvé pour la taille de la cavité où sont cultivées les cellules : trop petite, elle risque d'induire un stress de cisaillement affectant la viabilité cellulaire ; trop grande, elle provoque des soucis de diffusion d'oxygène (LEDEZMA *et al.*, 1999 ; TILLES *et al.*, 2001). Notre cavité de dix millimètres de haut (Figure 4.3), bien qu'étant de grande taille par rapport à un dispositif microfluidique, reste éloignée des tailles critiques pour l'approvisionnement en oxygène, qui concernent plutôt les bioréacteurs macrofluidiques. Notre système se classe entre la micro et la millifluidique, ce qui confère notamment moins de stress de cisaillement que l'échelle millifluidique et de nombreuses interactions cellules-cellules (XUE *et al.*, 2021).

Dans le cadre de notre étude, il a également fallu respecter les contraintes imposées par l'acoustofluidique, à savoir une hauteur de cavité proportionnelle à la demi-longueur d'onde acoustique (Figure 4.3). Pour compenser les légères différences de hauteur d'une puce à l'autre, dues au moulage, nous utilisons en pratique un transducteur large bande qui peut émettre une onde ultrasonore avec suffisamment d'énergie sur une bande de fréquence de

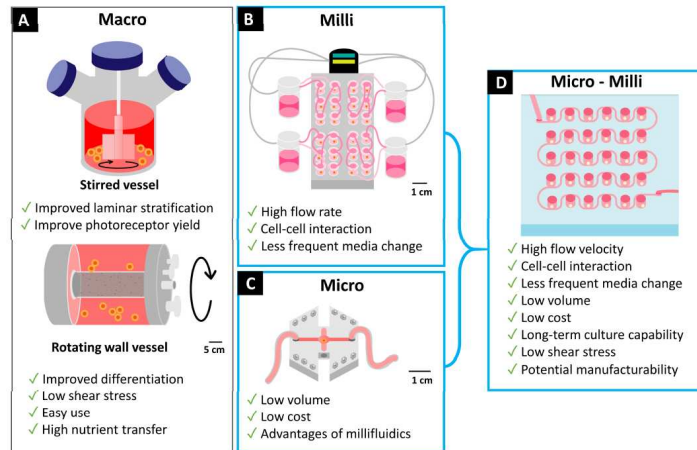


FIGURE 4.2 – Synthèse des différents bioréacteurs mettant en oeuvre différentes échelles de culture. Les systèmes micro-milli fluidiques combinent certains avantages des systèmes millifluidiques avec certains des systèmes microfluidiques. D’après XUE *et al.*, 2021.

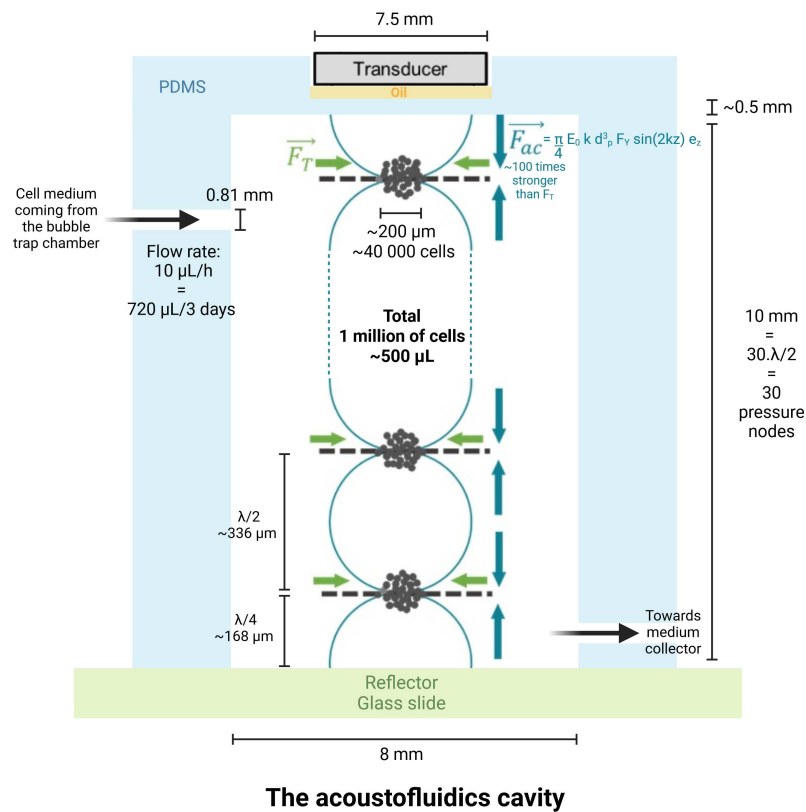


FIGURE 4.3 – Représentation de la cavité acoustique utilisée pour former puis cultiver les sphéroïdes cellulaires en lévitation acoustique. Les principaux paramètres géométriques, acoustiques et fluidiques sont résumés sur ce schéma. La hauteur des cavités utilisées a été fixée à 10 mm, ce qui permet de créer 30 plans de lévitation et donc environ 30 sphéroïdes par puce.

+/- 15% autour de la fréquence nominale du transducteur (2 MHz pour les transducteurs utilisés). Cela permet d'ajuster la fréquence d'émission à la hauteur réelle de la cavité, afin de respecter la hauteur théorique $h = n \cdot \lambda / 2$; ainsi l'énergie acoustique dans la cavité est maximisée et la lévitation de sphéroïdes est possible.

4.3 Processus de fabrication et matériaux utilisés

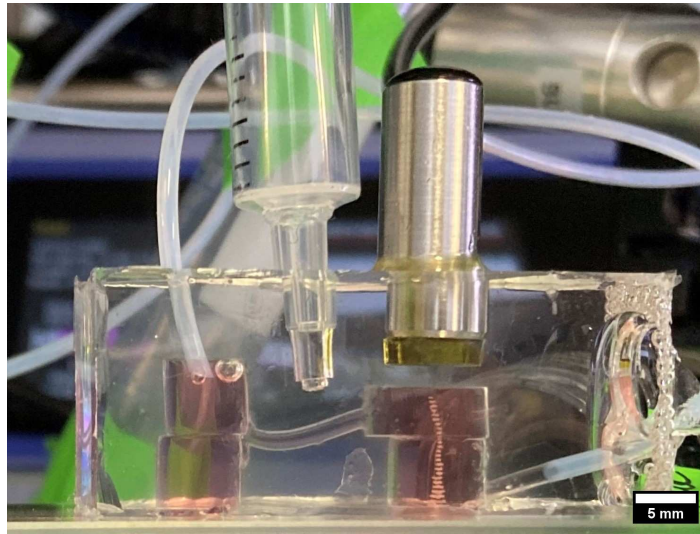


FIGURE 4.4 – Photo de notre puce micro-millifluidique conçue pour notre système microphysiologique. La première cavité (à gauche) permet le passage du milieu de culture et la capture des bulles d'air. Elle est reliée par un conduit à la seconde cavité (à droite) dans laquelle sont créés et cultivés en lévitation acoustique les sphéroïdes.

Une cavité acoustofluidique La conception de la cavité résonnante de notre dispositif correspond à un dispositif acoustofluidique multi-couches, tel celui qui est présenté en Figure 4.5. Les parois de la cavité ainsi que la membrane au sommet de la cavité sont en Polydiméthylsiloxane (PDMS), fabriqué avec un ratio 1 :10 d'agent durcisseur et de base. Le transducteur est relié à un générateur de signaux (TiePie™). Il est possible de contrôler les différents paramètres (fréquence et voltage) du signal électrique, qui est ensuite converti en onde acoustique par le transducteur. Partant du transducteur, les ondes acoustiques traversent une membrane de PDMS puis une couche d'huile avant d'arriver dans la cavité remplie de milieu de culture. L'insertion d'huile entre le transducteur et le PDMS permet un bon couplage acoustique qui diminue les pertes acoustiques et maximise l'ARF. Les ondes acoustiques traversent la cavité pour arriver sur le réflecteur au fond de la cavité. Dans notre cas il s'agit d'une lame de verre, matériau biocompatible (Figure 4.4) et bon réflecteur acoustique.

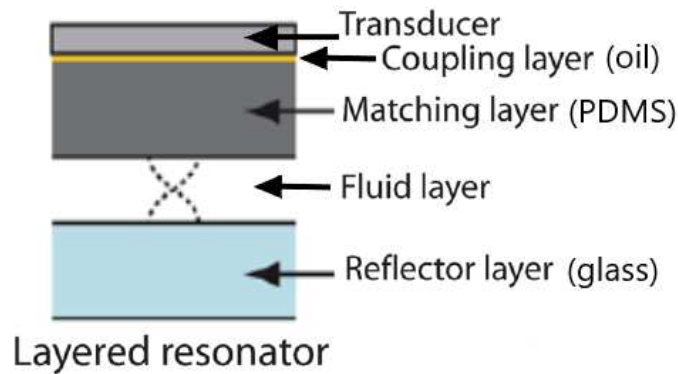


FIGURE 4.5 – Coupe longitudinale d'une puce acoustofluidique "multi-layer", mettant en évidence les différentes couches la composant : le transducteur émet l'onde ultrasonore qui traverse une couche d'adaptation acoustique (*matching layer*) puis la paroi supérieure de la cavité (*transmitter*). Après avoir traversé toute la cavité, l'onde ultrasonore est réfléchié par la paroi inférieure (*reflector*). Les matériaux et épaisseurs de ces différentes couches jouent un rôle critique dans l'efficacité de la cavité résonante. En fonction de ces paramètres, il sera possible ou non de faire léviter des cellules et / ou des sphéroïdes. Adapté de LENSOF *et al.*, 2012.

Des parois latérales absorbant les ondes acoustiques Pour fabriquer les parois de la cavité, le PDMS sous forme liquide est coulé dans un moule fabriqué sur mesure. Cette manipulation est aisée à mettre en œuvre et couramment utilisée en microfluidique. Au bout de quelques heures à 70°C, le PDMS est démoulé puis collé après traitement au plasma sur une lame de verre. Les propriétés du PDMS ont déjà été très étudiées (voir Tableau 4.1). Le PDMS est facile à mouler, biocompatible (OLMOS *et al.*, 2019; WIKLUND, 2012; BÉLANGER et MAROIS, 2001), hydrophobe, transparent, peu adhérent aux cellules (MOSHKAYAN *et al.*, 2018), perméable aux gaz (LECLERC, SAKAI et FUJII, 2003) et peu réflecteur des ondes acoustiques. L'oxygénation permise par le PDMS est essentielle en particulier pour les cellules très consommatrices tels les hépatocytes (TILLES *et al.*, 2001). L'élasticité du PDMS permet le raccord sans fuite de tubes en polytétrafluoroéthylène (PTFE) pour le renouvellement du milieu de la puce.

L'impédance acoustique Z d'un milieu est définie comme (LENSOF *et al.*, 2012) :

$$Z = \rho \cdot c \quad (4.1)$$

avec ρ la densité du milieu et c la vitesse du son dans ce milieu.

Le coefficient de réflexion pour une incidence normale est défini de la façon suivante :

$$R_p = \frac{Z_2 - Z_1}{Z_1 + Z_2} \quad (4.2)$$

avec R_p le coefficient de réflexion, Z_1 l'impédance caractéristique du milieu 1, Z_2 l'impédance caractéristique du milieu 2. Le coefficient de réflexion sur l'interface eau-PDMS est de 4.13% (LIU *et al.*, 2018; WIKLUND, 2012).

TABLE 4.1 – Propriétés de l'eau et du PDMS (ratio 1 :10 d'agent durcisseur et de base) à une température de 25°C (LIU *et al.*, 2018).

Type de milieu	Impédance acoustique	Densité	Vitesse du son
Eau	1.4955 MPa	997 kg/m ³	1500 m/s
PDMS	0.9904 MPa	920 kg/m ³	1076.5 m/s

Absorption de composés L'un des désavantages du PDMS est sa capacité d'absorption des molécules du milieu de culture (protéines, médicaments). Il peut ainsi biaiser les résultats d'expériences de doses-réponse de médicaments ou de dosage protéique. Ces études peuvent être réalisées (par exemple, dosage d'albumine par LECLERC, SAKAI et FUJII, 2003), mais une imprécision demeure sur les concentrations réellement administrées aux cellules ou relarguées par celles-ci. Une solution possible est d'ajouter un revêtement (*coating*) à l'intérieur de la cavité, mais cette option rajoutant une étape lors du processus de fabrication n'a pas été retenue lors de nos travaux. Cette absorption par le PDMS a cependant été gardée à l'esprit lors des tests d'administration de composés chimiques, de médicaments et des dosages d'albumine.

Stérilisation et manipulation stérile La stérilisation de la puce peut être effectuée par rinçages successifs à l'éthanol 70% et à l'eau, par autoclavage ou par exposition aux rayons UV (MATA, FLEISCHMAN et ROY, 2005). Ce sont ces deux dernières options qui ont été utilisées de manière interchangeable lors de notre étude. Les puces en verre/PDMS, les seringues et réservoirs de milieu ainsi que les tubes en PTFE ont été changés à chaque utilisation.

Grâce à l'automatisation du renouvellement du milieu, les systèmes microphysiologiques limitent les interactions du manipulateur avec les cellules, ce qui minimise les possibilités de contamination (WU, HUANG et LEE, 2010).

Choix de la valeur du flux de renouvellement de milieu En cas de trop grande vitesse de renouvellement du milieu ou de trop petite taille de la cavité, d'importantes contraintes de cisaillement peuvent se créer. Afin d'éviter les éventuels effets négatifs sur la viabilité et la fonctionnalité cellulaire que peut provoquer le stress de cisaillement (Figure 4.6), notamment sur les hépatocytes primaires (TILLES *et al.*, 2001; LEDEZMA *et al.*, 1999) et les HepaRG (jusqu'à 10 fois moins d'expression de CYP3A4 et 1000 fois moins de production d'albumine, d'après EHRLICH *et al.*, 2019), nous avons choisi d'établir un faible cisaillement dans notre dispositif (grande cavité et faible flux).

Le renouvellement complet du milieu dans la cavité s'effectue en un peu moins de 3 jours (Figure 4.7). Puisque le dispositif est micro-millifluidique, il ne présente pas d'écou-

Biological effects of shear stress			
Cell type	Shear stress/ dyn cm ⁻²	Experimental conditions	Biological effect
Vascular endothelial cells	10–100	<i>in vivo</i>	Normal <i>in vivo</i> range
Hepatocytes	<2	<i>in vivo</i>	Normal <i>in vivo</i> range
Mouse embryonic stem cells	6.5	<i>in vitro</i>	No significant negative effects on proliferation or self-renewal.
Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)	4 25	<i>in vitro</i> <i>in vitro</i>	Same c-fos levels as in static controls Elevated c-fos levels compared with static controls

FIGURE 4.6 – Effets biologiques du stress de cisaillement sur différents types cellulaires, recensés dans KIM *et al.*, 2007

lement laminaire comme dans les canaux plus minces des dispositifs microfluidiques. Le renouvellement du milieu se fait à la fois par convection et diffusion.

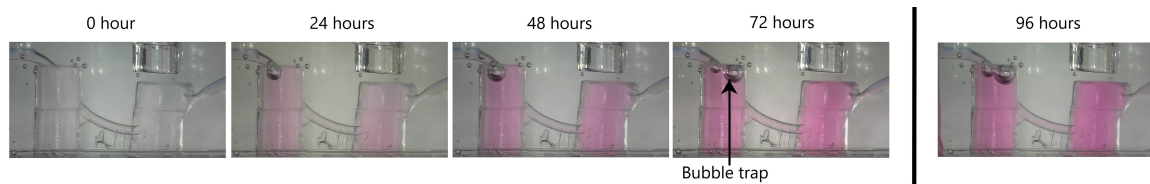


FIGURE 4.7 – Renouvellement complet du milieu dans la cavité en 3 jours (remplacement d’eau par du milieu HepaRG, flux 10 $\mu\text{L}/\text{h}$). Sur chaque image, à droite se trouve la cavité anti-bulle qui alimente à gauche la cavité acoustofluidique. On peut ainsi observer la formation des bulles piégées dans la cavité antibulle à partir de 24 heures de culture. Aucune bulle ne se forme dans la cavité acoustofluidique, même après 96 heures de culture.

4.4 Bulles et dispositifs microfluidiques

4.4.1 Sources d’apparition des bulles

Les dispositifs microfluidiques sont enclins à l’apparition de bulles d’air indésirables. Plus le temps d’utilisation est long, plus l’on observe l’apparition de bulles (KWAPISZEWSKA *et al.*, 2012), ce qui est problématique pour les temps de culture de plusieurs jours. Dans notre dispositif acoustofluidique, les bulles d’air posent problème lorsqu’elles interfèrent avec le champ acoustique dans la cavité, par exemple lorsqu’elles sont situées entre l’émetteur et le récepteur acoustique.

Les principales sources de bulles d’airs sont :

- Transport depuis le réservoir de milieu (seringue),
- Nucléation de microbulles dans des infractuosités de la paroi de PDMS lors du remplissage de la puce avec le milieu de culture, suivi d’un grossissement de la taille de ces microbulles,
- Arrivée dans la cavité à cause d’un manque d’étanchéité (souvent à l’interface entre la tubulure en PTFE et son canau d’insertion en PDMS),

- Relargage par le milieu au cours du temps,
- Cavitation créée par les ultrasons.

4.4.2 Gestion des bulles

De nombreuses techniques actives (optiques, électriques, acoustiques, ou encore mécaniques) et passives (tension de surface, optimisation de la micro-géométrie et des propriétés de surface) permettent de remédier au problème des bulles (Figure 4.8).

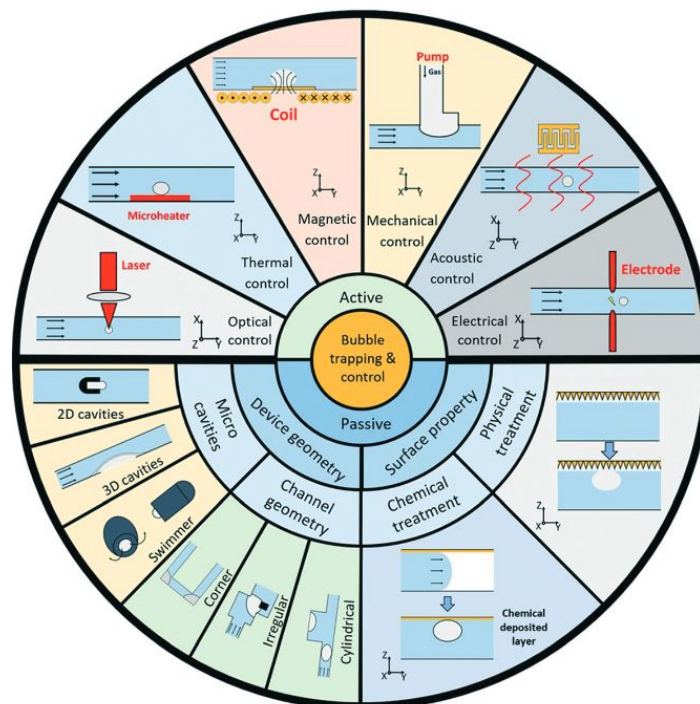


FIGURE 4.8 – Les méthodes de capture de bulles les plus communes selon GAO *et al.*, 2020.

La nucléation de microbulles (noyaux de Harvey) est particulièrement courante dans les matériaux hydrophobes tels que le PDMS (PEREIRO *et al.*, 2019). Pour augmenter l'hydrophilie du PDMS, un traitement au plasma est effectué quelques heures ou quelques jours avant l'introduction du milieu. Le nombre de connections avec l'extérieur a été réduit au maximum et les canaux ont été formés par moulage pour être exempts de défaut (KIM *et al.*, 2007 ; GAO *et al.*, 2020). La géométrie de la cavité est optimisée pour éviter les angles droits, les culs-de-sac et les géométries non optimales qui sont source de bulles lors du remplissage (PEREIRO *et al.*, 2019).

Pour capturer les bulles, MENG, KIM et KIM, 2006 suggèrent l'intégration de puits à bulles sous la forme de creux dans la surface en PDMS (Figure 4.9a) ou de cavités entières situées à un endroit du circuit microfluidique (Figure 4.9b et KWAPISZEWSKA *et al.*, 2012 ; LOCHOVSKY,

YASOTHARAN et GÜNTHER, 2012), la bulle y pénétrant respectivement par sa propension à être en contact avec des surfaces hydrophobes ou à aller vers le haut.

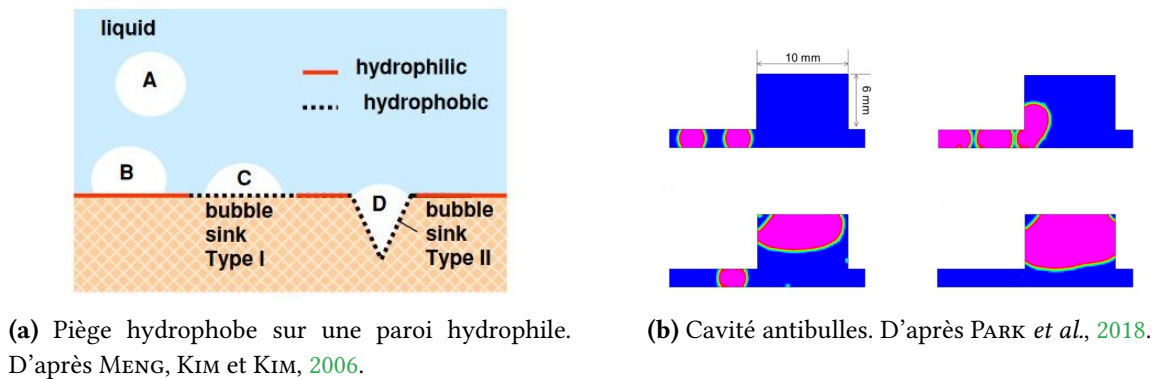


FIGURE 4.9 – Exemples de pièges antibulles.

Les bulles ainsi piégées grossissent au cours du temps à cause des échanges avec le gaz dissous dans le milieu de culture. L'utilisation d'ondes acoustiques peut également amplifier le phénomène. En effet, le *streaming* acoustique crée des microbulles au sein du fluide (CHONG *et al.*, 2015). Pour limiter la croissance des bulles, il est conseillé de maintenir le fluide sous pression positive plutôt que négative ; le pousse-seringue a pour cela été utilisé en mode poussée (KIM *et al.*, 2007 ; VOLK *et al.*, 2015).

La meilleure solution pour la culture longue durée est de déplacer les bulles hors des régions critiques. Les techniques exploitant les ultrasons (MENG *et al.*, 2011 ; KIM *et al.*, 2023b ; WANG, HUANG et YANG, 2011) entrent en conflit avec l'onde stationnaire déjà instaurée dans la cavité. Les solutions requérant la présence de capillaires hydrophobes dans les parois de la cavité sont incompatibles avec le PDMS (MENG, KIM et KIM, 2006). Afin de faire disparaître une bulle présente dans notre cavité, il faut plutôt tirer parti de la perméabilité du PDMS. Il suffit de placer un vide d'un côté d'une fine membrane de PDMS, par exemple grâce à une seringue, pour aspirer la bulle sans avoir à percer le matériau (JOHNSON *et al.*, 2009 ; YU *et al.*, 2017 ; ABATE et WEITZ, 2011 ; EDDINGS et GALE, 2006 ; SKELLEY et VOLDMAN, 2008 ; YU *et al.*, 2017).

4.5 *Streaming* acoustique

Le *streaming* acoustique (voir chapitre 3.2.5) doit rester modéré. Dans le cas contraire, il est susceptible de contrer l'action de l'ARF latérale (F_T) et de pousser les cellules hors des plans de lévitation (SPENGLER, COAKLEY et CHRISTENSEN, 2003), comme illustré sur la Figure 4.10. Afin de minimiser l'action des *streamings* de Schlitching et Rayleigh, les mesures suivantes ont été prises en compte lors du design de la puce : utilisation de fréquence et tension les plus faibles possible (Figure 4.10) et pas d'angles aigus dans la cavité. Le *streaming* d'Eckart a été reporté dans des cavités de 1 mm de hauteur ou plus. Afin de le contrer, la hauteur de la cavité a été limitée à 1 mm.

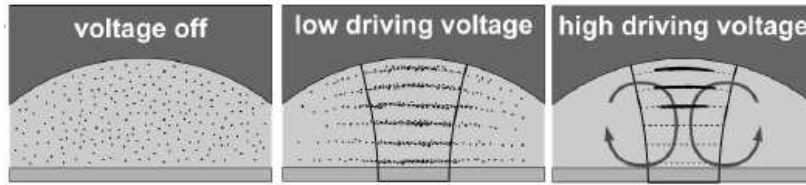


FIGURE 4.10 – Effet de l’augmentation du voltage sur le *streaming* acoustique menant à des distributions inhomogènes de particules sur les différents noeuds de pression. D’après WIKLUND *et al.*, 2004).

4.6 Conclusion du chapitre

La conception initiale de la puce micro-milli-acoustofluidique avait été établie lors de travaux précédents pour optimiser la résonance acoustique, limiter les pertes acoustiques, minimiser le *streaming* acoustique et produire plus d’une vingtaine d’agrégats par cavité. La géométrie et les dimensions de la cavité n’ont pas été modifiées depuis ces études de JEGER-MADIOT *et al.*, 2021 ; JEGER-MADIOT *et al.*, 2022. Des adaptations (antibulle et anti-contamination) ont été réalisées pour permettre la culture stérile à long terme pendant 6 jours au lieu de 24 heures.

Les mesures antibulles mises en place dans notre puce sont :

- Une géométrie sans angles aigus,
- Seules deux connections avec l’extérieur (entrée et sortie de milieu),
- Un piège à bulles passif en amont de la cavité acoustique (Figure 4.4),
- Un traitement au plasma pour augmenter l’hydrophilie du PDMS,
- Un dégazage de 30 minutes effectué avant l’insertion du milieu dans les puces,
- Le pousse-seringue en mode poussée,
- L’aspiration à travers une fine membrane de PDMS en cas de bulle initiale dans la cavité acoustique.

L’ensemble de ces mesures nous a permis d’éviter l’apparition de bulles au cours des cultures de longue durée.

Les mesures anticontamination sont :

- Isolation totale de la cavité via une membrane en PDMS,
- Usage jetable des puces et du matériel en contact avec les cellules,
- Traitement aux UV ou à l’autoclave avant utilisation des composants de la puce.

Après cette mise au point de la culture à long terme dans notre dispositif, un autre défi de la culture *in vitro* a été exploré. Pour augmenter le biomimétisme des sphéroïdes hépatiques, d’autres types cellulaires non hépatocytaires ont été intégrés lors des lévitations. Ces modèles de coculture deviennent aujourd’hui incontournables.

COCULTURE DE CELLULES HÉPATIQUES AVEC D'AUTRES TYPES CELLULAIRES

5.1	Le dialogue entre types cellulaires <i>in vivo</i>	76
5.2	Coculture <i>in vitro</i>	76
5.2.1	Types cellulaires cocultivés avec des cellules de type hépatocytes	77
5.2.2	Apport des cocultures pour la fonctionnalité	77
5.2.3	Prévascularisation	78
5.2.4	Auto-organisation	78
5.3	Recensement de cocultures d'hépatocytes avec d'autres types cellulaires	79
5.4	Conclusion du chapitre	81

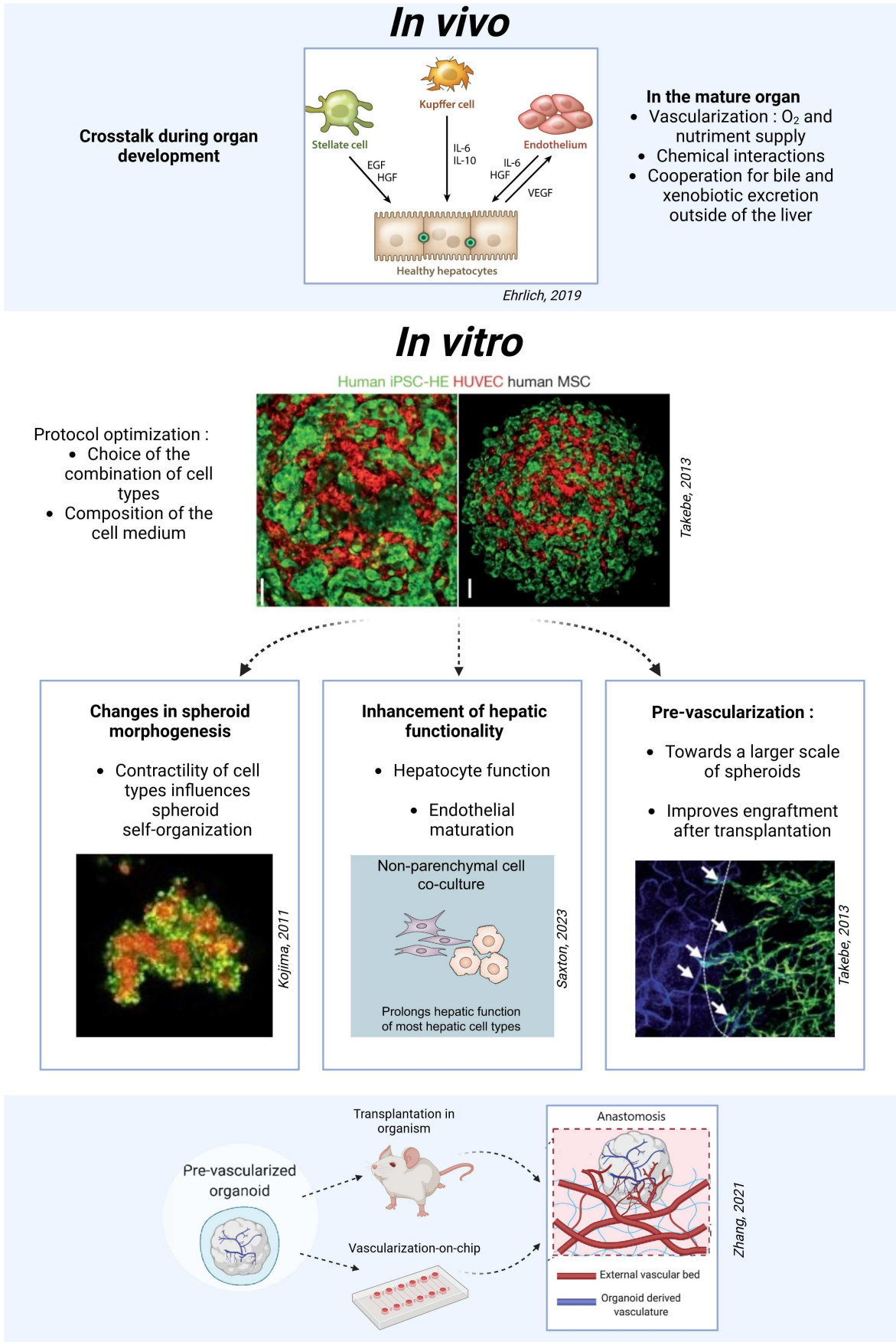


FIGURE 5.1 – Résumé graphique du Chapitre 5.

5.1 Le dialogue entre types cellulaires *in vivo*

In vivo, lors du développement embryonnaire et foetal, une intermodulation (*cross-talk*) est observée entre les différents types de progéniteurs hépatiques (VARGAS-VALDERRAMA *et al.*, 2020). Les cellules endothéliales jouent un rôle dans la spécification hépatique (MUÑOZ-CHÁPULI *et al.*, 2005) et dans la maturation des progéniteurs des cholangiocytes (OBER et LEMAIGRE, 2018), avant même que ces cellules n’assurent un rôle dans la vascularisation de l’organe (MATSUMOTO *et al.*, 2001). Une accumulation de preuves suggère que les cellules endothéliales subissent elles-mêmes une maturation lors d’une coculture (VARGAS-VALDERRAMA *et al.*, 2020).

La coopération entre différents types cellulaires hépatiques se maintient dans le foie mature et prend plusieurs formes :

- L’intégration dans les tissus de vaisseaux sanguins bordés de cellules endothéliales permet la vascularisation et l’apport de nutriments et d’oxygène aux autres cellules,
- Comme détaillé au Chapitre 1, la plupart des fonctions hépatiques (détoxification des xénobiotiques, excrétion de bile en dehors du foie) implique un contact et une coopération entre plusieurs types cellulaires,
- Les messagers chimiques circulent entre types cellulaires : les hépatocytes produisent des facteurs de croissance endothéliaux (VEGF) et de l’interleukine-6 (IL-6), alors que les cellules endothéliales sécrètent des facteurs de croissance hépatocytaire (HGF). Cet équilibre peut être rompu lors d’une réponse inflammatoire incontrôlée et provoquer d’importants dommages aux hépatocytes,
- Les cellules endothéliales (ISHIKAWA *et al.*, 2021) et les cholangiocytes seraient également impliqués dans le contrôle de la prolifération hépatocytaire lors de la régénération hépatique après une hépatectomie.

5.2 Coculture *in vitro*

La fonctionnalité des hépatocytes étant soumise à l’influence des cellules voisines, il n’est pas surprenant que les modèles *in vitro* les plus fidèles se révèlent être ceux qui mêlent différents types cellulaires. Parmi les types cellulaires utilisés en coculture avec des hépatocytes, on trouve des fibroblastes, des cellules stellaires, ou encore des cellules endothéliales (BHANDARI *et al.*, 2001).

5.2.1 Types cellulaires cocultivés avec des cellules de type hépatocytes

Cellules endothéliales

Aucun protocole efficace d'isolement des cellules endothéliales hépatiques sinusoidales du foie (*Liver sinusoidal endothelial cells* ou LSEC) n'a été développé à ce jour. Les cellules obtenues après isolement perdent leur fenestration.

Les cellules endothéliales étudiées lors de cette thèse ne sont donc pas d'origine hépatique. Ce sont des progéniteurs endothéliaux isolés à partir de la veine du cordon ombilical (HUVEC) ou des cellules dérivées des progéniteurs circulants endothéliaux isolés à partir du sang de cordon ombilical (dPEC). Ces deux types de cellules sont souvent utilisés en coculture avec des cellules hépatiques. Ils ont un temps de doublement dans une culture non confluyente de 24 à 36 heures (LAU *et al.*, 2022), comparable à celui des cellules HepaRG.

Cellules stromales mésenchymateuses (MSC)

Les cellules stromales mésenchymateuses (*mesenchymal stromal cells* ou MSCs) sont des cellules non-hépatiques qui ont notamment été utilisées pour l'étude preuve de concept de la culture cellulaire à long terme en lévitation acoustique (JEGER-MADIOT *et al.*, 2021). Autrefois appelées cellules souches mésenchymateuses (CAPLAN, 2017), elles sont caractérisées par leur capacité à adhérer à une surface en plastique, à se répliquer et à se différencier en trois lignées différentes : ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes après traitement par des facteurs de croissance (BAKSH, SONG et TUAN, 2004). Elles peuvent être prélevées dans différents tissus, dont le plus courant est la moelle osseuse. Les MSCs présentées dans nos travaux sont issues du tissu adipeux (*Adipose-derived mesenchymal stromal cells* ou AD-MSCs). Ces cellules ont un intérêt en thérapie cellulaire en raison de leur capacité de réparation tissulaire, de leur effet anti-inflammatoire et de leur propriété d'immunomodulation (UCCELLI, MORETTA et PISTOIA, 2008). Leur temps de doublement est d'environ 15 heures (SHARMA et DIETZ, 2020) et diminue au cours des passages.

5.2.2 Apport des cocultures pour la fonctionnalité

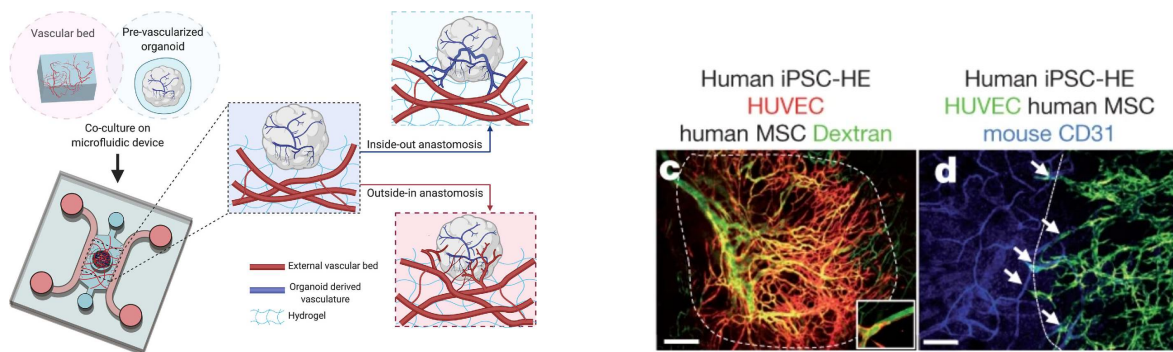
Importance du contact direct

Lorsqu'ils sont cocultivés dans un hydrogel, hépatocytes et cellules endothéliales migrent l'un vers l'autre sous l'action de médiateurs chimiques (EHRlich *et al.*, 2019) et se disposent en contact étroit qui favorise la maturation des cellules endothéliales (CHIEW *et al.*, 2015). L'interaction entre les cellules endothéliales et les hépatocytes oriente la différenciation

des premières vers un phénotype angiogénique et le développement de structures vascularisées en forme de tubes (SALERNO *et al.*, 2018). Quant aux hépatocytes, leur fonctionnalité est toujours améliorée par la coculture et leur polarité peut également être augmentée (RAMACHANDRAN *et al.*, 2015; BAZE *et al.*, 2018). Ainsi, l'ajout de cellules endothéliales dans les organoïdes améliore leur fonctionnalité et la réussite de leur greffe chez l'animal (VARGAS-VALDERRAMA *et al.*, 2020; TAKEBE *et al.*, 2013).

5.2.3 Prévascularisation

Ces cocultures sont également un premier pas vers la vascularisation des sphéroïdes (STROBEL, MOSS et HOYING, 2022). Les cellules endothéliales ne forment pas de vaisseaux sanguins fonctionnels dans les sphéroïdes ou organoïdes cultivés uniquement *in vitro*. Cependant, les sphéroïdes contenant des cellules endothéliales, qualifiés d'organoïdes prévascularisés, ont la capacité de se connecter à un réseau vasculaire après intégration dans un hydrogel vascularisé sur puce ou après transplantation dans un organisme (Figures 5.2a et 5.2b).



(a) Intégration d'un organoïde prévascularisé dans un hydrogel vascularisé. D'après ZHANG, WAN et D. KAMM, 2021.

(b) c) Réseau vasculaire après transplantation, d) Connexion du réseau vasculaire de l'hôte (bleu) et du réseau de cellules HUVEC de l'organoïde (vert) après transplantation chez une souris. D'après TAKEBE *et al.*, 2013.

FIGURE 5.2 – a) Vascularisation sur puce. b) Vascularisation après transplantation chez une souris.

5.2.4 Auto-organisation

Les sphéroïdes de coculture sont également utilisés pour l'étude de l'auto-organisation et l'organogenèse (voir chapitre 6). En ce qui concerne l'auto-organisation à l'échelle du sphéroïde entier, le type cellulaire le plus contractile entraîne souvent l'autre dans son sillage.

Les cocultures sont aussi l'occasion d'étudier de plus près la structuration interne des sphéroïdes (Figure 5.3). Après avoir étéensemencées au hasard au sein du sphéroïde, les

cellules HUVEC migrent par exemple vers l'extérieur dans des sphéroïdes de petite taille (environ $200\ \mu\text{m}$ de diamètre) mais pas dans les sphéroïdes de plus grande taille (environ $250\ \mu\text{m}$ de diamètre) (PATRA *et al.*, 2014). C'est pourquoi PATRA *et al.*, 2014 suggèrent que les conditions d'hypoxie à l'intérieur des grands sphéroïdes pourraient surexprimer le VEGF intracellulaire et inhiber cette migration vers l'extérieur.

La localisation initiale des types cellulairesensemencés au sein du sphéroïde peut être aléatoire, par simple mélange de deux suspensions cellulaires, ou alors dirigée, en utilisant des techniques de microstructuration (HONG *et al.*, 2021).

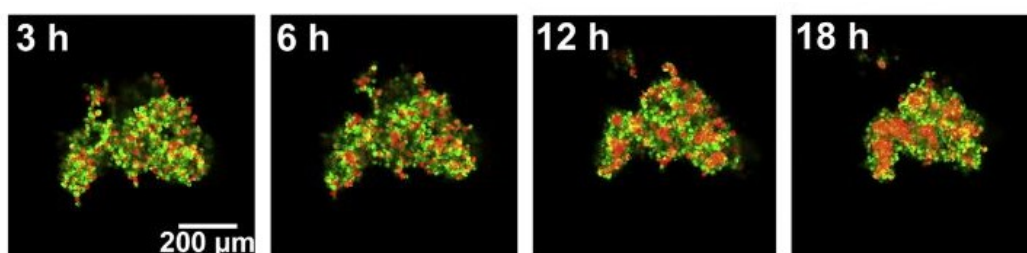


FIGURE 5.3 – *Timelapse* de l'auto-organisation de sphéroïdes d'une coculture de cellules MS1 (rouge) et de cellules HUVEC (vert). D'après KOJIMA, TAKEUCHI et SAKAI, 2011.

5.3 Recensement de cocultures d'hépatocytes avec d'autres types cellulaires

La coculture est en général réalisée en deux temps : chaque type cellulaire est d'abord cultivé individuellement, avant d'être mis en contact (BALE *et al.*, 2015).

Cependant, une étape critique consiste à adapter le milieu de culture afin de le rendre compatible pour les deux types cellulaires, ce qui peut se révéler particulièrement délicat. Ainsi, des cellules HUVEC ne survivent pas dans un milieu de culture composé uniquement de milieu hépatique. Elles doivent être cultivées dans un mélange de milieu hépatique et de milieu de croissance endothélial complet, ou alors dans un milieu hépatique supplémenté en compléments endothéliaux. Les composés les plus cruciaux pour la croissance des cellules endothéliales sont l'extrait bovin hypothalamique qui contient le facteur de croissance *endothelial cell growth factor* (ECGF), l'héparine, le facteur de croissance *basic fibroblast growth factor* (bFGF) et l'insuline (FREYER *et al.*, 2017).

Il est à noter que l'utilisation d'un milieu de coculture hépatico-endothélial augmente la maturation des hépatocytes dérivés d'iPS, même lorsque ces cellules sont en monoculture (FREYER *et al.*, 2017). Le Tableau 5.4 présente différentes cocultures réalisées avec des cellules hépatiques. La coculture est l'une des priorités absolues du domaine de la culture tridimensionnelle *in vitro*. La coculture hépatique en lévitation acoustique n'a cependant pas été rapportée jusqu'à maintenant dans la littérature (voir chapitre 3).

Premier auteur	Titre	Type de culture	Type de cellule et proportions	Durée (jours)	Milieu de co-culture	Apport de la co-culture
HÉPATOCYTES PRIMAIRES						
Ahmed (Ahmed <i>et al.</i> , 2017)	3D liver membrane system by co-culturing human hepatocytes, sinusoidal endothelial and stellate cells	<u>Bioréacteur avec membrane</u> Culture 3D dans un bioréacteur, les 3 types étant ensemencés couche par couche sur une membrane Polyéthersulfone (PES)	Hépatocytes primaires humains + Cellules endothéliales sinusoidales + Cellules stellaires (En proportions respectives 100:4:4)	28	Mélange des 3 milieux, renouvelé quotidiennement	A préservé la structure et la fonction des hépatocytes (production d'albumine et d'urée, biotransformation)
Salerno (Salerno <i>et al.</i> , 2011)	Human hepatocytes and endothelial cells in organotypic membrane systems	<u>Bioréacteur avec membrane</u> Culture en couches sur une membrane constituée d'un mélange de polymères	Hépatocytes primaires humains + Cellules endothéliales HUVECs (10:1)	13	Mélange des 2 milieux	A préservé la fonction des hépatocytes (production d'albumine et d'urée, biotransformation)
Salerno (Salerno <i>et al.</i> , 2018)	Gas permeable membrane bioreactor for the co-culture of human skin derived mesenchymal stem cells with hepatocytes and endothelial cells	<u>Bioréacteur avec membrane</u> Cultures séparées par des membranes perméables aux gaz	Hépatocytes humains primaires (hHeps) + Cellules endothéliales humaines (hECs) + Cellules souches mésenchymateuses humaines dérivées de peau (hSSCs) (30:3:10)	19	Mélange des 3 milieux	A préservé la fonction des hépatocytes (production d'albumine et d'urée, biotransformation) Observation d'une vascularisation
Ware (Ware <i>et al.</i> , 2017)	A Cell Culture Platform to Maintain Long-term Phenotype of Primary Human Hepatocytes and Endothelial Cells	<u>Bioréacteur</u> Culture d'hépatocytes et de cellules endothéliales en contact ou séparés par un couche de fibroblastes ou un gel protéique mimant l'espace de Disse Culture microstructurée	Hépatocytes primaires humains (PHHs) + cellules endothéliales sinusoidales humaines primaires (LSECs) ou HUVEC (5:1) + Fibroblastes 3T3-J2	3 semaines		LSEC induit la sécrétion d'albumine (mais pas HUVEC) Meilleurs résultats observés pour le gel protéique et la tri-culture, en comparaison avec la co-culture
CELLULES IPS						
Pettinato (Pettinato <i>et al.</i> , 2019)			hiPSCs et cellules endothéliales humaines (hECs)			
HepaRG						
German (German & Madhally, 2019)	Type of endothelial cells affects HepaRG cell acetaminophen metabolism in both 2D and 3D porous scaffold cultures	<u>Echafaudage</u> 2D et 3D	HepaRG + HUVEC (ou LSEC)	8		
Rennert (Rennert <i>et al.</i> , 2015)	A microfluidically perfused three dimensional human liver model	<u>Organoïdes</u> sur une biopuce (membrane)	<u>Couche hépatique</u> Cellules stellaires et HepaRG + <u>Couche vasculaire</u> HUVEC et macrophages tissulaires			
Ryu (Ryu <i>et al.</i> , 2019)	Targeting CYP4A attenuates hepatic steatosis in a novel multicellular organotypic liver model	<u>Culture sur Matrigel</u> dans un tube conique	HepaRG + HUVEC + cellules stromales mésenchymateuses (8:1:1)			
HepG2						
Suurmond (Suurmond <i>et al.</i> , 2019)	In Vitro Human Liver Model of Nonalcoholic Steatohepatitis by co-culturing Hepatocytes, Endothelial Cells, and Kupffer Cells	<u>Sphéroïdes</u> 4 jours pour la formation des sphéroïdes puis 8 jours	Expérience 1 : 80% HepG2 cells and 20% HUVECs Expérience 2 : 70% HepG2, 15% HUVECs, and 15% HKCs (Cellules de Kupffer)	8		

FIGURE 5.4 – Différents exemples de coculture d'hépatocytes avec d'autres types cellulaires et milieux de culture associés. Les proportions de cellules et de milieux peuvent se révéler critiques et difficiles à déterminer *a priori*.

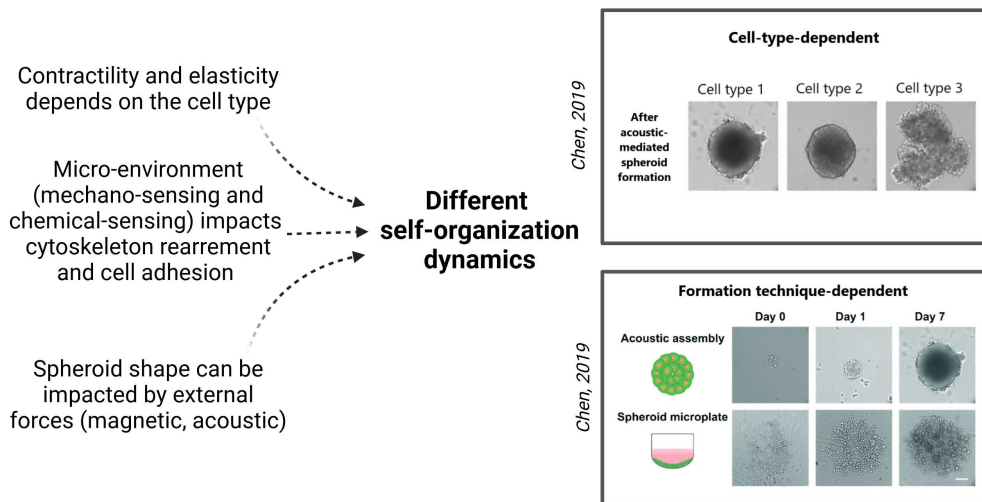
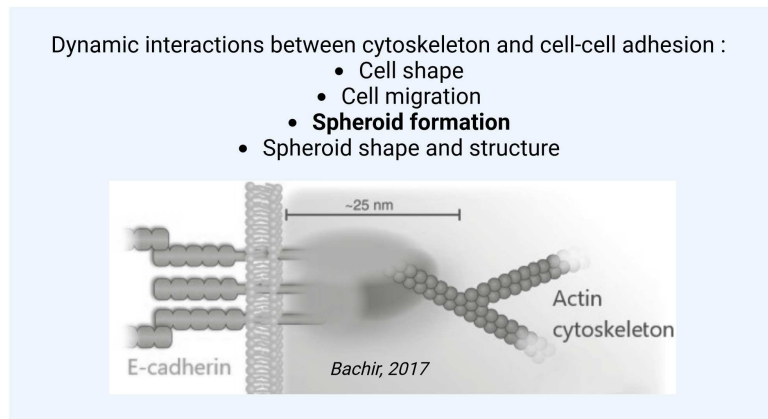
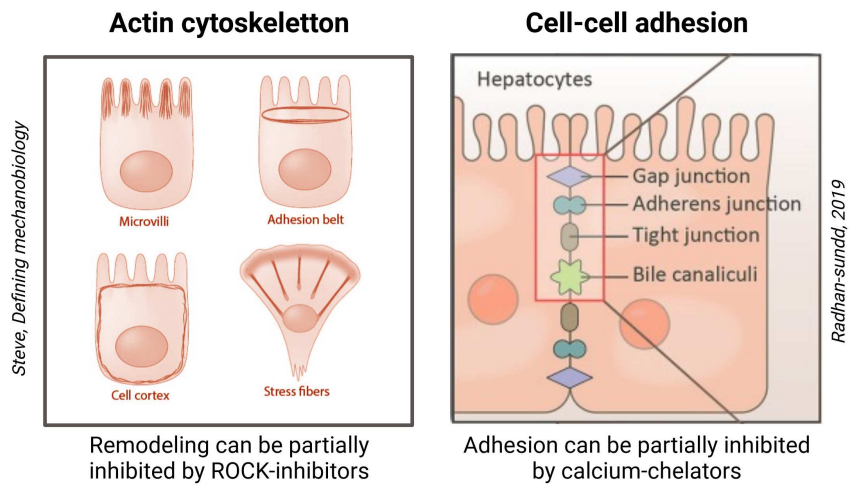
5.4 Conclusion du chapitre

La coculture *in vitro* est une avancée indispensable vers la prochaine génération de systèmes microphysiologiques. Elle améliore plusieurs marqueurs de fonctionnalité et prévascularise les sphéroïdes, ce qui élève le taux de réussite des greffes et est un premier pas vers une augmentation de taille. La coculture nécessite des adaptations de protocole, mais est compatible avec la lévitation acoustique. Elle doit faire partie de l'avenir du développement de l'acoustofluidique.

La coculture change également la dynamique de formation des sphéroïdes. Cette auto-organisation dépend en effet des propriétés de chaque type cellulaire.

AUTO-ORGANISATION DES SPHÉROÏDES ET ORGANOÏDES : MÉCANIQUE CELLULAIRE ET TISSULAIRE APPLIQUÉE AUX ORGANOÏDES

6.1	Approches <i>top-down</i> et <i>bottom-up</i>	86
6.2	Définition du vocabulaire relatif à l'auto-organisation	87
6.2.1	Apport des dynamiques d'auto-organisation des sphé- roïdes pour la biologie fondamentale	88
6.3	Analyses comparatives des dynamiques d'auto-organisation . . .	89
6.3.1	Influence des types cellulaires	89
6.3.2	Influence des méthodes de culture	90
6.4	Auto-organisation en lévitation acoustique	90
6.5	Implication du cytosquelette et de l'adhésion cellulaire dans l'auto- organisation	92
6.5.1	L'adhésion cellulaire	92
6.5.2	Le cytosquelette	95
6.6	Conclusion du chapitre	96



6.1 Approches *top-down* et *bottom-up*

Depuis une dizaine d'années, les biologistes ne laissent plus au hasard la phase de structuration des cultures 3D. L'ingénierie tissulaire étudie rationnellement la formation des tissus *in vitro* et les moyens de la contrôler (CHOUDHURY *et al.*, 2011). Les stratégies d'ingénierie tissulaire peuvent être divisées en deux catégories (Figure 6.2) :

- L'approche *top-down*, ou descendante : on injecte des cellules sur un échafaudage (*scaffold*) constitué d'un biomatériau micro-structuré, souvent biomimétique. C'est une organisation dirigée. Elle s'appuie sur des techniques comme l'impression 3D et des matériaux tels que les hydrogels de polymères,
- L'approche *bottom-up*, ou ascendante : on agrège des cellules dans un environnement moins rigide, et on les laisse s'auto-organiser librement (ATHANASIOU *et al.*, 2013). Cette approche est particulièrement appropriée pour des tissus pouvant être construits à partir de briques individuelles répétitives (*building blocks*), tels les lobules hépatiques. De nombreux dispositifs microfluidiques, comme celui qui est présenté dans ce manuscrit, s'inscrivent dans cette approche ascendante. Les cultures de sphéroïdes sont des exemples d'auto-organisation cellulaire.

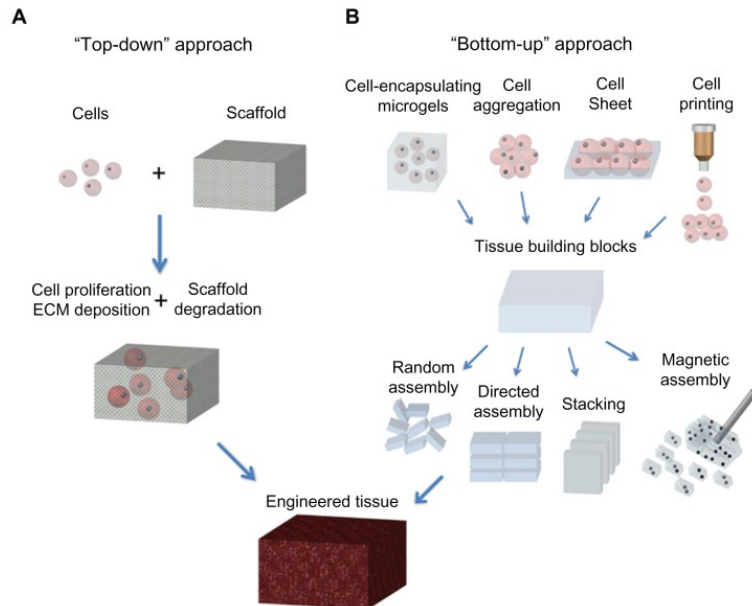


FIGURE 6.2 – Illustration des approches d'ingénierie tissulaire *top-down* et *bottom-up*. D'après LU, LI et CHEN, 2013. Dans un cas, on s'appuie sur un support (*scaffold*) existant sur lequel on va faire adhérer les cellules (A). Dans l'autre, on assemble les cellules pour tenter de fabriquer le tissu cible grâce aux mécanismes d'auto-assemblage cellulaire (B).

6.2 Définition du vocabulaire relatif à l'auto-organisation

Le concept d'auto-organisation est longtemps resté imprécis en biologie. Afin de permettre une caractérisation universelle, les concepts et le vocabulaire correspondant ont été précisés et définis plus formellement (Figure 6.3). On peut ainsi distinguer trois grands principes d'auto-organisation cellulaire :

Auto-assemblage ou *self-assembly*

"En absence d'attachement à une surface ou un échafaudage, les cellules s'agrègent et suivent le processus d'auto-assemblage. Les cellules mono-dispersées forment des micro-tissus 3D appelés sphéroïdes multicellulaires" (traduit depuis ACHILLI, MEYER et MORGAN, 2012). "Au sens strict, l'auto-assemblage désigne la formation spontanée de motifs structuraux par l'agrégation sélective de cellules ou par la réorganisation des positions relatives des cellules à l'intérieur de la structure (auto-tri ou *self-sorting*)" (traduit depuis SASAI, 2013).

Auto-structuration ou *self-patterning*

"Des motifs tissulaires complexes peuvent apparaître spontanément à partir d'un agrégat cellulaire (ou d'un feuillet cellulaire) homogène, grâce au contrôle spatio-temporel par des règles locales de l'état des cellules, sans intervention d'un signal extérieur" (traduit depuis SASAI, 2013).

Auto-morphogenèse ou *self-morphogenesis*

L'auto-morphogenèse : pendant l'organogenèse, des formes tissulaires complexes mais stéréotypées se développent grâce à des déformations, des croissances locales et des remodelages. Au cours de l'auto-organisation, la morphogenèse multicellulaire est actionnée par des mécaniques tissulaires intrinsèques et se déroule de façon autonome, en l'absence de forces externes ou de contraintes spatiales" (traduit depuis SASAI, 2013).

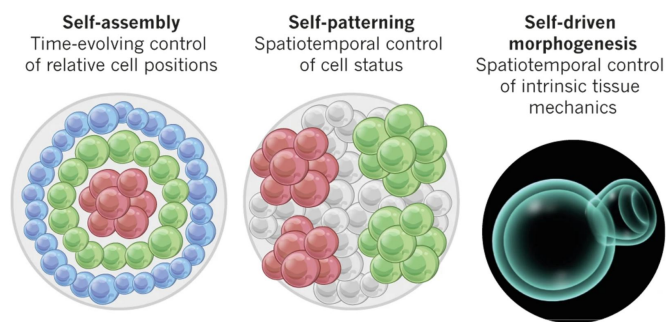


FIGURE 6.3 – Trois mécanismes basiques d'auto-organisation spontanée, c'est-à-dire sans intervention ou force extérieure. Dans les trois cas présentés, au moins deux types cellulaires sont présents. D'après SASAI, 2013.

Dans notre propre étude, la dynamique d'auto-assemblage a été observée au microscope, tandis que l'auto-structuration et l'auto-morphogenèse ont été observées *a posteriori* par des marquages immunofluorescents de coupes de sphéroïdes (HOF *et al.*, 2021). Pour des

sphéroïdes intestinaux, l'auto-morphogénèse consiste en la formation de cryptes et villosités. Pour des sphéroïdes de foie, elle est révélée à plus petite échelle par la polarisation des cellules hépatiques et la formation de canalicules biliaires.

Pourquoi une forme sphérique ? Même si les sphéroïdes sont des solides visco-élastiques, les biophysiciens de la matière molle expliquent leur auto-assemblage par analogie avec le comportement d'un liquide (EFREMOV *et al.*, 2021) qui forme des gouttes (TSAI *et al.*, 2015 ; GONZALEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2012 ; YU *et al.*, 2018). Selon ARMSTRONG, 1989 (cité par TZANAKAKIS, HANSEN et HU, 2001), l'état le plus stable pour un agrégat consiste à maximiser l'aire de contact cellule-cellule tout en minimisant l'aire d'exposition au milieu de culture ou au substrat.

6.2.1 Apport des dynamiques d'auto-organisation des sphéroïdes pour la biologie fondamentale

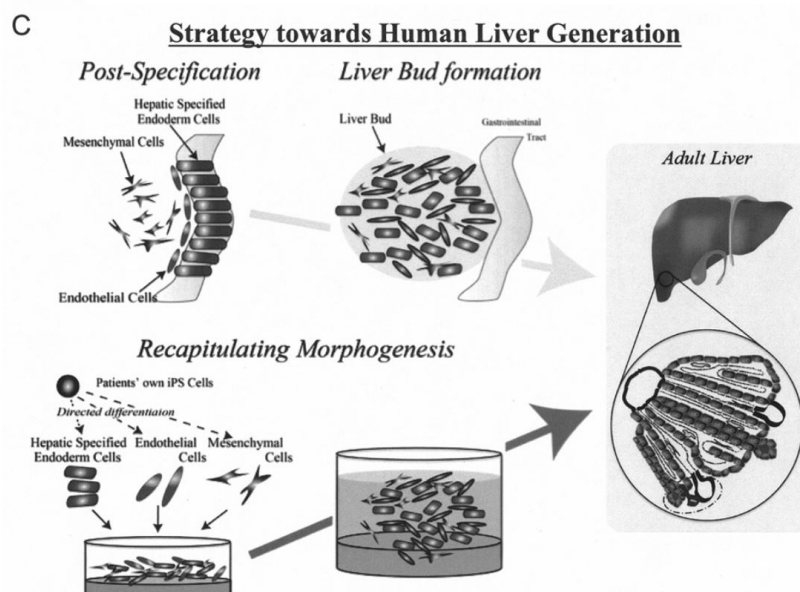


FIGURE 6.4 – Représentation de la stratégie du groupe de recherche de Takebe *et al.* pour générer du foie humain *in vitro* en mimant le processus de morphogénèse *in vivo*. D'après TAKEBE *et al.*, 2012.

Lors de leur auto-organisation, les sphéroïdes et organoïdes miment spontanément le comportement de création d'organes (organogénèse). Le domaine de l'ingénierie tissulaire prend comme postulat que des cellules cultivées dans un système adéquat pourraient récapituler l'enchaînement des étapes du développement embryonnaire. Ce principe est illustré sur la Figure 6.4 pour la génération d'un foie *in vitro*.

À l'heure actuelle, ces promesses semblent encore lointaines car les tissus cultivés sont

immatures et de petite taille. Cependant, même si l'organogenèse *in vitro* est incomplète, les cultures de sphéroïdes fournissent des informations cruciales sur les processus d'auto-assemblage, de morphogenèse et d'établissement de la polarité des organes lors du développement (HUCH *et al.*, 2017; VYAS *et al.*, 2018). Ils sont facilement observables, et le faible nombre de cellules en font également d'excellents candidats pour les modélisations biophysiques (DAHL-JENSEN et GRAPIN-BOTTON, 2017). Pour toutes ces raisons, sphéroïdes et organoïdes se révèlent être des modèles d'organogenèse beaucoup plus faciles d'usage et adaptables que les modèles animaux (BAYIR, SENDEMIR et MISSIRLIS, 2019; HUCH *et al.*, 2017; VIANELLO et LUTOLF, 2019) et la biologie fondamentale du développement a largement adopté leur usage (LANCASTER et KNOBLICH, 2014; PRIOR, INACIO et HUCH, 2019).

6.3 Analyses comparatives des dynamiques d'auto-organisation

6.3.1 Influence des types cellulaires

Les propriétés mécaniques des cellules et tissus dépendent du type cellulaire (LEVAYER et LECUIT, 2012; EFREMOV *et al.*, 2021) : contractilité (propriété que possèdent certains tissus de se contracter), élasticité (propriété de certains tissus de se laisser distendre puis de revenir à leur forme et volume initiaux), etc.

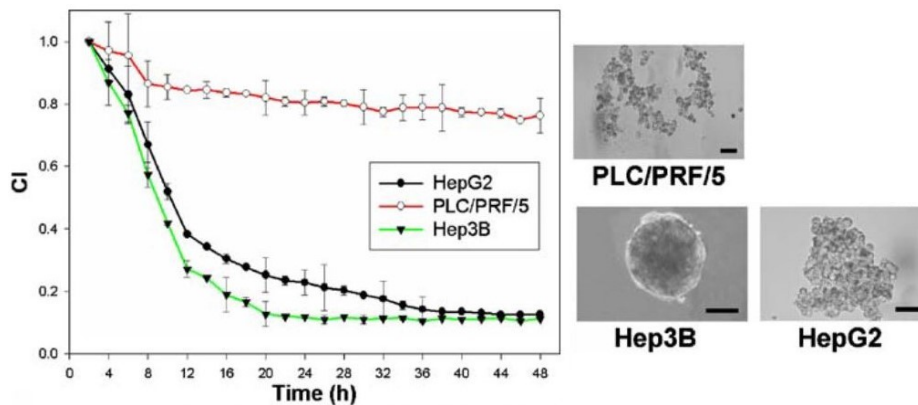


FIGURE 6.5 – Des agrégats de trois types d'hépatocarcinome cultivés en culture *hanging drop* pendant 48 heures ont des morphologies très différentes. Les courbes illustrent la dynamique de compactage des agrégats (réduction de l'aire projetée par rapport à l'aire initiale) pour les trois types cellulaires. Le compactage le plus lent est celui des PLC/PRF/5. Adapté d'après LIN *et al.*, 2006.

Les MSCs et les LSECs (*liver sinusoidal endothelial cells*) sont deux fois plus contractiles que les cellules HepaRG (ZHAO *et al.*, 2015), elles-mêmes plus contractiles que les hépatocytes primaires (TASCHER *et al.*, 2019; ROCKEY, HOUSSET et FRIEDMAN, 1993). Le compactage des sphéroïdes dépend fortement des propriétés contractiles des cellules, comme illustré sur la Figure 6.5. Les dynamiques de formation de sphéroïdes sont plus rapides pour des types cellulaires plus contractiles (EFREMOV *et al.*, 2021). Lorsque deux types cellulaires sont co-

cultivés, le plus contractile entraîne l'autre par la force des interactions cellule-cellule. Ainsi, des fibroblastes peuvent favoriser la contraction et le repliement d'un feuillet cellulaire de cellules HepaRG (Figure 6.6), et la formation de sphéroïdes hépatocytaires est favorisée par une coculture avec un autre type cellulaire plus contractile (TAKEBE *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2020; CHOI, SEOK et KIM, 2020).

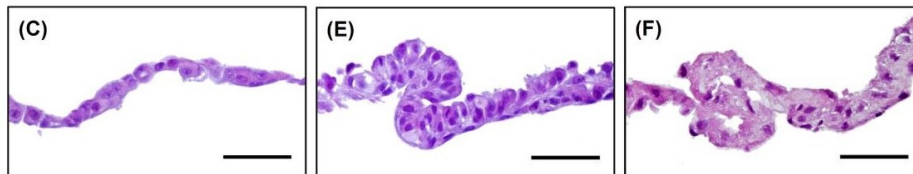


FIGURE 6.6 – Auto-plierage de feuillets cellulaires (coupe), composés de cellules HepaRG (C), d'une coculture de cellules HepaRG et fibroblastes dérivés de peau humaine TIG-118 (E) ou de fibroblastes TIG-118 seuls (F). Adapté d'après SAKAI *et al.*, 2013.

6.3.2 Influence des méthodes de culture

La comparaison de différentes techniques de culture doit évidemment être réalisée indépendamment pour chaque type cellulaire.

Sphéroïdes d'hépatocytes primaires La formation de sphéroïdes cohésifs d'hépatocytes primaires a été rapportée en 48h en lévitation magnétique (DESAI, TSENG et SOUZA, 2017), en 5 à 7 jours (BAZE *et al.*, 2018) ou en 7 à 10 jours (BELL *et al.*, 2018) en plaques à faible adhérence.

Sphéroïdes de cellules HepaRG Pour les cellules HepaRG, la formation d'agrégats cohésifs a été rapportée en trois nuits dans des micro-plaques à faible adhérence 384 puits (HORN *et al.*, 2023), en trois jours via la technique *hanging drop* GravityPLUS (GUNNESS *et al.*, 2013) et en sept jours en plaques à faible adhérence 96 puits (MANDON *et al.*, 2019).

6.4 Auto-organisation en lévitation acoustique

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons à la formation de sphéroïdes d'hépatocytes en lévitation acoustique. Cette technique émergente présente de nombreux avantages dont certains ont déjà été illustrés lors de travaux précurseurs.

Rapidité de formation En lévitation acoustique, les cellules sont rapidement (quelques secondes) amenées vers le plan de lévitation, maximisant dès le début de la culture la surface de contact entre les cellules. COAKLEY *et al.*, 2004 *et al.* expliquent que la forme de l'agrégat

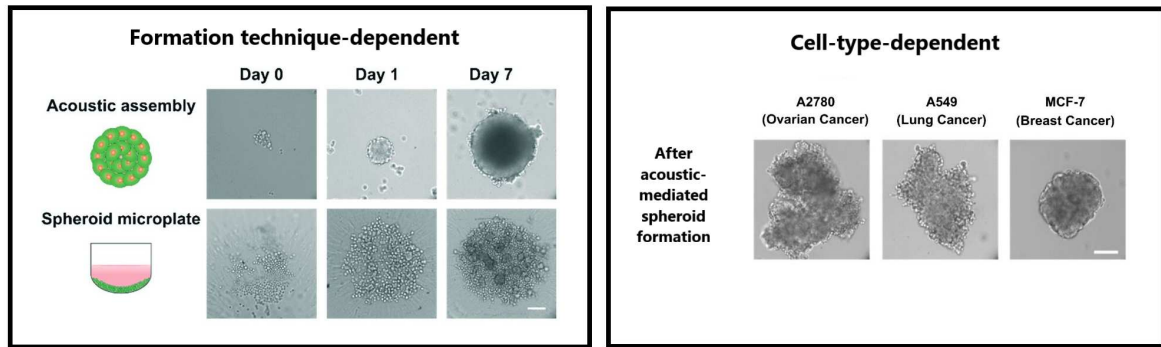


FIGURE 6.7 – Des agrégats de lignées cancéreuses pancréatiques formés en lévitation acoustique sont plus rapidement cohésifs que ceux qui sont formés en plaque à faible adhérence à fond rond avec centrifugation initiale de 3 minutes à 400 g (figure de gauche). Des agrégats formés grâce à l’acoustophorèse ont des formes différentes selon le type cellulaire (figure de droite). D’après CHEN *et al.*, 2019.

lévité n’est pas uniquement dépendante des contacts aléatoires initiaux entre les cellules, mais également de réarrangements cellulaires qui surviennent alors que l’agrégat cellulaire est encore sous la forme de feuillet. Sous l’influence de la composante transverse de l’ARF, mais aussi des forces d’interaction acoustique à courte portée (force de Bjerknes), les éventuels interstices sont comblés par un réarrangement des cellules voisines, ce qui crée une forme circulaire compacte. La dynamique d’auto-organisation est souvent plus rapide en lévitation acoustique qu’avec d’autres techniques, comme illustré sur la Figure 6.7.

Contraintes mécaniques La culture en lévitation permet de ne pas mettre les cellules en contact avec une quelconque surface rigide (plastique, collagène...) qui risquerait de perturber les caractéristiques mécaniques des cellules (DAHL-JENSEN et GRAPIN-BOTTON, 2017 ; EFREMOV *et al.*, 2021). Les cellules sont amenées dans le plan de lévitation acoustique par la seule force acoustique, n’entraînant ainsi aucun stress mécanique.

Il est cependant possible d’augmenter l’amplitude de l’ARF appliquée aux sphéroïdes ou aux cellules. On peut en particulier modifier la pression acoustique appliquée sur les sphéroïdes. Ainsi, des agrégats de glioblastomes cultivés pendant 3 jours ont été soumis à une ARF 4 fois plus élevée (voltage de 10 V contre 5 V). On a alors pu observer un volume équivalent mais une forme plus aplatie (thèse de X. Mousset soutenue en juin 2023, publication en préparation).

Interactions cellule-cellule non contraintes Les forces acoustiques qui s’appliquent sur le sphéroïde sont toujours assez faibles pour laisser aux forces cellulaires une grande liberté d’action. Pour preuve, elle ne gomme pas les différences de forme d’agrégats entre types cellulaires, comme illustré sur la Figure 6.7. Cette liberté de mouvement et d’interactions est conseillée par STHIJNS, LAPOINTE et VAN BLITTERSWIJK, 2019 et WOODFORD et ZANDSTRA, 2012, afin de laisser libre cours aux processus cellulaires.

Auto-organisation dirigée (*guided self-organization*) : homogénéité des formes et des tailles d'agrégats JEGER-MADIOT *et al.*, 2021 et IM *et al.*, 2022 ont montré que la culture en lévitation acoustique pendant plusieurs heures permettait d'obtenir des agrégats de diamètre, circonférence et hauteur reproductibles. Les cellules sont déplacées vers le plan de lévitation le plus proche de leur position initiale, créant des sphéroïdes de taille identique à partir d'une suspension cellulaire homogène.

6.5 Implication du cytosquelette et de l'adhésion cellulaire dans l'auto-organisation

L'analogie entre la formation d'un sphéroïde et d'une goutte d'eau s'arrête dès lors que l'on considère les mécanismes moléculaires impliqués. L'auto-organisation des sphéroïdes est un processus actif qui repose sur la génération de mouvements cellulaires et l'instauration de liaisons entre cellules voisines.

Deux mécanismes cellulaires sont particulièrement impliqués :

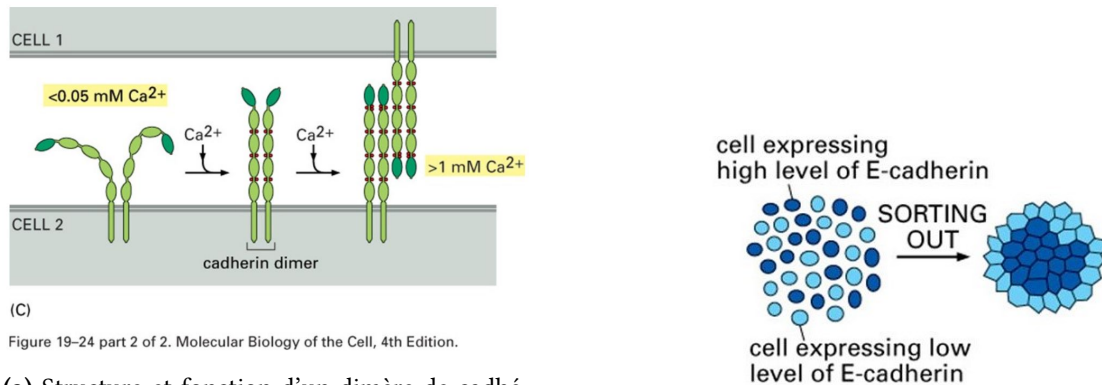
- Les adhésions cellulaires influencent la cohésion du sphéroïde,
- Les modifications du cytosquelette déterminent la forme et la migration des cellules.

Cytosquelette et molécules d'adhésion fonctionnent en coopération et s'adaptent à l'environnement cellulaire. Puisque cette voie est complexe et répond à de nombreuses stimulations, plusieurs méthodes ont été utilisées lors de notre étude pour la perturber, afin de mieux la comprendre (LIN *et al.*, 2006; LUEBKE-WHEELER *et al.*, 2009; NAKAMURA *et al.*, 2014; KHEDR *et al.*, 2019).

6.5.1 L'adhésion cellulaire

Parmi les quatre types d'adhésion cellulaire qui assurent la cohésion des tissus (LIM *et al.*, 2022; LECUIT et YAP, 2015; LEVAYER et LECUIT, 2012), les adhésions cellule-cellule de type jonction adhérente jouent un rôle prédominant lors de l'auto-organisation en lévitation acoustique. Les interactions cellules-ECM sont négligeables car la seule matrice extracellulaire dans le système est celle qui est produite par les cellules au cours de la lévitation, une production qui est faible pour les cellules hépatiques.

La fixation d'une cellule à ses voisines est effectuée par des complexes macro-moléculaires d'adhésion comportant plus de 150 protéines différentes (BACHIR *et al.*, 2017; HUVENEERS et DE ROOIJ, 2013), parmi lesquelles les cadhérines (BACHIR *et al.*, 2017). Deux monomères de cadhérine (N-, P-, R- ou E-cadhérine) de deux cellules adjacentes interagissent de façon homophile en présence de calcium (BISWAS, 2020). Les mécanismes d'adhésion à l'origine des interactions membranaires sont illustrés sur la Figure 6.8a (ALBERTS *et al.*, 2002; CUVELLIER *et al.*, 2021; ROSE *et al.*, 2021).



(C)
Figure 19-24 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

(a) Structure et fonction d'un dimère de cadhérine, en fonction du taux de calcium extracellulaire.

(b) Tri cellulaire en fonction de la concentration de cadhérines produites par un type cellulaire.

FIGURE 6.8 – Les cadhérines sont impliquées dans l'adhésion cellule-cellule et l'auto-tri. D'après ALBERTS *et al.*, 2002.

Auto-tri Deux cellules exprimant les mêmes types de cadhérines en même quantité se lient plus facilement l'une à l'autre (ALBERTS *et al.*, 2002; DISCHER, JANMEY et WANG, 2005), régissant les phénomènes d'auto-tri cellulaire (Figure 6.8b).

En lévitation acoustique Une liaison tout juste formée entre deux cellules se renforce au cours du temps grâce au recrutement de nouvelles E-cadhérines (BRAGA, 2002) et devient de plus en plus cohésive. En lévitation acoustique, ce remodelage est très rapide. La distribution de N-cadhérine et N-CAM (*neural cell adhesion molecule*) est modifiée dans les premières minutes de lévitation acoustique (BAZOU *et al.*, 2005 May-Jun). Des chondrocytes en lévitation forment des jonctions communicantes (*gap junctions*) en moins d'une heure (BAZOU *et al.*, 2006). L'établissement d'adhésions cellule-cellule fortes est observée après quelques heures de lévitation et mis en évidence par des marquages anti-connexin 32 ou anti-E-cadhérine (CHEN *et al.*, 2015; IM *et al.*, 2022). Les sphéroïdes formés en lévitation acoustique restent cohésifs après arrêt des ultrasons (LIU *et al.*, 2007; JEGER-MADIOT *et al.*, 2021).

Compactage et réadhésion Le taux d'expression des cadhérines affecte le compactage du sphéroïde (YU *et al.*, 2018) et les phénomènes de mouvements collectifs (PARSONS, HORWITZ et SCHWARTZ, 2010). Ainsi, il est intéressant de noter que le niveau de cohésion d'un agrégat 3D influence sa dynamique de recolonisation d'une surface adhérente, comme illustré sur la Figure 6.9.

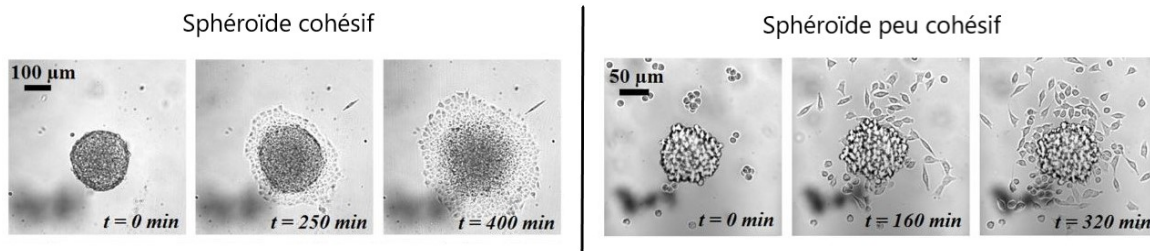


FIGURE 6.9 – Des agrégats très cohésifs (forte adhésion cellulaire) ou peu cohésifs auront des dynamiques de réadhésion différentes, respectivement similaires au comportement d'un liquide ou d'un gaz. D'après DOUEZAN *et al.*, 2011.

Inhibition des interactions liées au calcium

Pour inhiber l'adhésion cellulaire, il est possible d'utiliser des anticorps anti-cadhérine ou des chélateurs de calcium tels l'EDTA ou l'EGTA. La présence d'EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) dans le milieu de culture chélate de nombreux composés, parmi lesquels les ions magnésium Mg^{2+} et les ions calcium Ca^{2+} , et affecte ainsi l'action des E-cadhérine. L'EGTA (acide egtazique) est un dérivé d'EDTA avec une plus faible affinité pour le magnésium. L'inhibition des cadhérines empêche la formation de sphéroïdes d'hépatocytes primaires de rat (LUEBKE-WHEELER *et al.*, 2009) en culture 3D classique, de sphéroïdes de cellules épithéliales en lévitation acoustique (TAIT *et al.*, 2019) et de sphéroïdes de cellules hépatiques Huh7 en lévitation acoustique (KHEDR *et al.*, 2019), comme illustré sur la Figure 6.10.

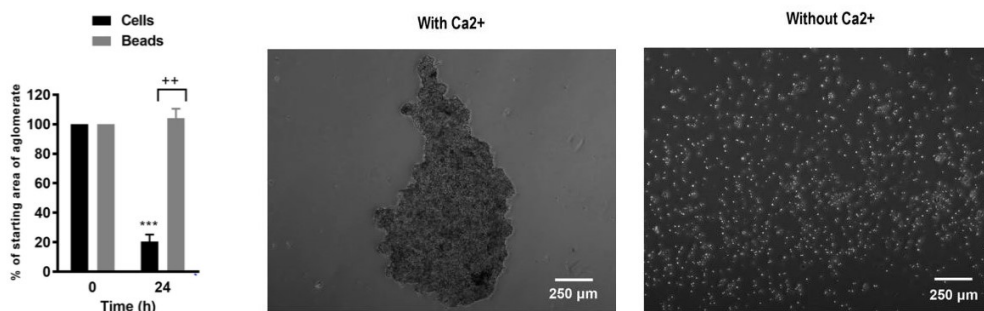


FIGURE 6.10 – Gauche : taille (pourcentage de l'aire initiale) d'agrégats de cellules épithéliales 16HBE14o- ou de billes inertes lévitées pendant plusieurs heures ; un feuillet cellulaire se contracte au cours des 24 heures de lévitation, alors que les billes gardent leur répartition initiale. Milieu et droite : après l'arrêt des ultrasons, l'agrégat consolidé par les jonctions adhérentes en présence de Ca^{2+} reste cohésif, alors que l'agrégat cultivé en l'absence de Ca^{2+} est dispersé dès que les forces acoustiques cessent de s'exercer. D'après KHEDR *et al.*, 2019.

6.5.2 Le cytosquelette

Le cytosquelette est la charpente d'une cellule. Il est composé principalement de micro-filaments d'actine, de microtubules et de filaments intermédiaires. Les plus impliqués dans l'auto-organisation sont les micro-filaments d'actine dont les réarrangements dynamiques gouvernent la forme et le déplacement de la cellule.

La localisation de l'actine diffère entre environnement 2D et 3D

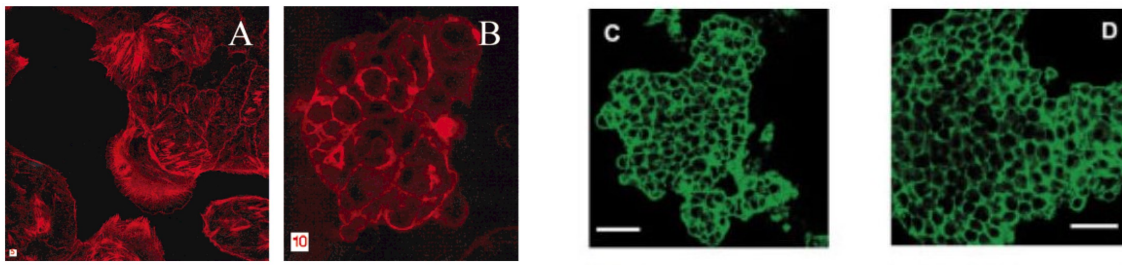
La conformation de l'actine est définie par l'environnement de la cellule. Les complexes d'adhésion jouent le double rôle de glu et de capteur (BISWAS, 2020) et servent d'interface entre le micro-environnement et le cytosquelette d'actine interne de la cellule (BAYIR, SENDEMIR et MISSIRLIS, 2019).

Les cultures en 2D sur plastique favorisent l'étalement des cellules. Les filaments d'actine y sont organisés sous forme de fibre de stress (Figure 6.11a). Lorsque les cellules sont placées dans un environnement 3D, par exemple en lévitation acoustique, les fibres d'actine liées au complexe d'adhésion sont réorientées de façon à devenir parallèles et le réseau d'actine devient localisé à l'emplacement du cortex cellulaire (TZANAKAKIS, HANSEN et HU, 2001; LEITE *et al.*, 2012; Figure 6.11a). Ce phénomène est sous l'influence de la cascade de signalisation RhoA-ROCK-myosine (BACHIR *et al.*, 2017; BAYIR, SENDEMIR et MISSIRLIS, 2019). Les GTPases RhoA agissent sur les protéines ROCK (*rho-associated protein kinases*), transduisant jusqu'à l'intérieur de la cellule des signaux qui changent l'expression des gènes, l'organisation des molécules d'actine, la contractilité des réseaux d'acto-myosine, la motilité, la contraction et la polarité cellulaire (SHARANNEK *et al.*, 2016). Les protéines RhoA et ROCK sont exprimées par les hépatocytes et par les HepaRG (TASCHER *et al.*, 2019).

Cette réorganisation se déroule en quatre jours pendant la formation d'organoïdes d'hépatocytes primaires de rat dans des plaques de culture où l'adhésion est défavorisée (TZANAKAKIS, HANSEN et HU, 2001). En lévitation acoustique, où le passage en 3D est beaucoup plus rapide, on observe un remodelage presque immédiat, après seulement 10 minutes pour des cellules HepG2 (EDWARDS *et al.*, 2007a; KUZNETSOVA *et al.*, 2009). La morphologie de l'actine acquise en lévitation acoustique est conservée lors d'une remise en culture non adhérente, comme illustré sur la Figure 6.11b.

Inhibition de l'actine

L'inhibition de l'actine peut être réalisée par traitement avec de la cytochalasine D, ou encore avec du Y-27632 (Y27), un inhibiteur de la phosphorylation de la protéine ROCK. Le traitement par Y-27632 perturbe l'activité de l'actine, empêche la génération de tension par le cytosquelette d'actine (KUMAR *et al.*, 2006) et affecte ainsi la contractilité cellulaire (ZHAO *et al.*, 2015; KHEDR *et al.*, 2019) et le compactage des sphéroïdes (TSAI *et al.*, 2015).



(a) Réorganisation des filaments d'actine lors de l'auto-assemblage de sphéroïdes d'hépatocytes primaires de rat dans des plaques de culture à la surface chargée positivement : sous forme de fibres de stress après 24 heures de culture (A) et en réseau localisé au cortex cellulaire à 4 jours de culture (B). D'après TZANAKAKIS, HANSEN et HU, 2001.

(b) Localisation de la F-actine après 30 minutes de lévitation acoustique (pendant 1 minute à 60 V puis 30 minutes à 20 V), suivies d'un jour (C) ou de 18 jours (D) de remise en culture non adhérente (plaque P-HEMA, SigmaAldrich). D'après LIU *et al.*, 2007.

FIGURE 6.11 – Organisation des filaments d'actine dans différents systèmes de culture 2D ou 3D.

L'effet d'un certain dosage de Y-27632 dépend du type cellulaire et du type de culture : il peut retarder l'auto-assemblage ou totalement le bloquer (KIM, KOROTKEVICH et HIIRAGI, 2018; KOJIMA, TAKEUCHI et SAKAI, 2011).

6.6 Conclusion du chapitre

L'auto-organisation des sphéroïdes est un phénomène biologique qui réorganise les agrégats cellulaires et mime *in vitro* le développement embryonnaire. Les cultures cellulaires placées dans un environnement favorisant l'auto-organisation passent spontanément d'une forme en feuillet à une forme de type sphéroïde. Ce phénomène est observé à la fois en culture traditionnelle et en lévitation acoustique. Les dynamiques d'auto-organisation dépendent des propriétés biomécaniques des cellules (notamment leur contractilité), elles-mêmes définies par les propriétés du cytosquelette et de l'adhésion cellulaire.

Puisque la lévitation acoustique procure une grande liberté d'auto-organisation, sans contact avec une surface rigide, et qu'elle permet la coculture, elle représente une technologie séduisante pour la recherche fondamentale sur l'organogenèse hépatique.

De plus, elle est propice à la manipulation de la forme des agrégats, via des modulations de l'ARF (amplitude de la tension), l'administration d'un inhibiteur de ROCK ou le traitement avec un chélateur de calcium. Ce contrôle précis de la forme des sphéroïdes est l'un des critères recherchés pour l'ingénierie tissulaire.

Deuxième partie

Contribution

INTRODUCTION DES ARTICLES

Le foie est un organe vital et complexe au cœur de nombreux défis sociétaux, qu'il s'agisse des problématiques posées par la pénurie de greffons pour la transplantation d'organe, ou de la détection des toxicités médicamenteuses avant mise sur le marché (chapitre 1). Afin de pouvoir les utiliser pour ces débouchés, il est nécessaire d'améliorer encore le biomimétisme des modèles *in vitro* de foie (structure en trois dimensions et fonctionnalité hépatocytaire), de ne pas employer de composés mal caractérisés comme des hydrogels et de s'assurer de la reproductibilité de leur production. Les sphéroïdes peuvent répondre à tous ces critères, mais se heurtent aux limites actuelles des méthodes de formation et culture (chapitre 2) : un manque de reproductibilité, une taille qui ne peut dépasser 500 μm , un manque de complexité (BOCK *et al.*, 2021) dû à l'utilisation de monocultures, un manque de structuration (KHETANI et BHATIA, 2008), des méthodes de culture coûteuses en main-d'œuvre et en moyens.

Selon ROSSI, MANFRIN et LUTOLF, 2018, il est nécessaire de passer à la prochaine génération d'organoïdes et de sphéroïdes, en procédant aux améliorations suivantes : augmenter la taille et la durée de vie (chapitre 2), intégrer différents tissus dans le système de culture (chapitre 5) et contrôler le micro-environnement et l'auto-organisation (chapitre 6).

Ces trois pistes ont été abordées lors de cette thèse, dans le cadre de l'étude d'une nouvelle technique de formation et de culture de sphéroïdes : la lévitation acoustique. Le principal inconvénient qui freine son utilisation est le manque de connaissances sur la culture cellulaire acoustofluidique à long terme. En effet, si les principes physiques régissant la lévitation de particules sont bien connus, la culture cellulaire pendant plus de quelques minutes a rarement été réalisée (chapitre 3), et jamais pendant plusieurs jours en dehors des travaux de notre équipe. Après adaptation du dispositif acoustofluidique (chapitre 4), des cultures hépatiques à long terme en lévitation acoustique ont ici été réalisées. Les résultats obtenus sont présentés dans les deux publications scientifiques suivantes.

La première phase d'études a concerné les mécanismes d'auto-organisation et la dynamique de formation de sphéroïdes en lévitation acoustique. BRASSARD et LUTOLF, 2019 et KIM *et al.*, 2021 proposent de concevoir des sphéroïdes de manière plus rationnelle, par exemple en contrôlant les conditions aux limites pour guider l'auto-structuration. La lévitation acoustique procure l'opportunité de contrôler l'emplacement des cellules. Lorsque celles-ci sont maintenues en lévitation pendant une longue durée, une auto-organisation cellulaire est observée. Nous avons étudié les processus en cause grâce à la comparaison entre trois types cellulaires. Cette étude a également été l'occasion d'explorer la coculture en lévitation.

Afin de valider le potentiel de la lévitation acoustique pour la culture à long terme (six jours), il a fallu ensuite étudier les défis qui lui étaient propres : la reproductibilité de taille, la dynamique de formation et la non-nocivité des ultrasons, que ce soit au niveau de la viabilité cellulaire ou de l'intégrité de l'ADN. Enfin, la morphologie, la viabilité et la fonctionnalité cellulaire ont également été explorées en comparaison avec des méthodes de culture classiques en 2D et en 3D. Ce travail fait l'objet d'un second article.

ACOUSTIC LEVITATION AS A TOOL FOR CELL-
DRIVEN SELF-ORGANIZATION OF HUMAN CELL
SPHEROIDS DURING LONG-TERM 3D CULTURE

Acoustic levitation as a tool for cell-driven self-organization of human cell spheroids during long-term 3D culture

Lucile Rabiet^{1,2} | Lousineh Arakelian² | Nathan Jeger-Madiot¹ | Duván Rojas García¹ | Jérôme Larghero² | Jean-Luc Aider¹

¹Laboratoire Physique et mécanique des milieux Hétérogènes (PMMH), CNRS, ESPCI, Paris, France

²Inserm U976, CIC-BT CBT501, AP-HP, Université Paris-Cité, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

Correspondence

Lucile Rabiet
Email: lucile.rabiet@gmail.com

Present address

Jean-Luc Aider, Laboratoire Physique et mécanique des milieux Hétérogènes (PMMH), 7 Quai Saint-Bernard, 75005 Paris, France.

Abstract

Acoustic levitation, which allows contactless manipulation of micro-objects with ultrasounds, is a promising technique for spheroids formation and culture. This acoustofluidic technique favors cell-cell interactions, away from the walls of the chip, which leads to the spontaneous self-organization of cells. Using this approach, we generated spheroids of mesenchymal stromal cells, hepatic and endothelial cells, and showed that long-term culture of cells in acoustic levitation is feasible. We also demonstrated that this self-organization and its dynamics depended weakly on the acoustic parameters but was strongly dependent on the levitated cell type. Moreover, spheroid organization was modified by actin cytoskeleton inhibitors or calcium-mediated interactions inhibitors. Our results confirmed that acoustic levitation is a rising technique for fundamental research and biotechnological industrial application in the rapidly growing field of microphysiological systems. It allowed easily obtaining spheroids of specific and predictable shape and size, which could be cultivated over several days, without requiring hydrogels or extracellular matrix.

KEYWORDS

acoustofluidics, acoustic levitation, self-organization, spheroids, microphysiological system

1 | INTRODUCTION

Spheroids are *in vitro* multicellular spherical structures formed by self-assembly. Due to their three-dimensional (3D) arrangement, they exhibit a higher structural complexity than traditional two-dimensional (2D) cultures (Ryu, Lee, & Park, 2019). Although they display evident limitations, because they fail to mimic *in vivo* cell composition and size, spheroids provide a useful overview of cell behaviors and functions in 3D configurations. What they lack in complexity, they compensate in simplicity, reproducibility and ease of use.

Spheroids can be cultured in microfluidic chips, which provide several advantages: a controlled environment, the possibility of continuous

monitoring by the integration of live microscopy and sensors, an efficient control of fluid flow and shear stress and precise dosage during drug screening (Skardal, Shupe, & Atala, 2016; Sakai et al., 2014). These innovative microphysiological systems are an excellent tool for fundamental research, such as self-organization, organogenesis and developmental biology studies. Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) tests for drug development are also keen to integrate spheroids into their pipeline. Furthermore, spheroids are the first step in the path towards engineering complex tissues for regenerative medicine (Clevers, Lancaster, & Takebe, 2017; Takebe & Wells, 2019; Hafiz et al., 2021; Huch, Knoblich, Lutolf, & Martinez-Arias, 2017).

Several techniques have been developed to create spheroids, such as suspension cultures, hanging drops, low-attachment surfaces, scaffolds and magnetic levitation (Ramos et al., 2023; Li et al., 2019; Kelm, Timmins, Brown, Fussenegger, & Nielsen, 2003). Recently, acoustic levitation has emerged as an additional method to form and culture spheroids. This externally driven assembly technique (Soto et al., 2021) prevents direct contact or interaction of the cells with the solid walls. It consists in a contactless manipulation mediated by ultrasonic standing waves. The standing waves are obtained by matching the acoustic

Abbreviations: 2D, two-dimensional; 3D, three-dimensional; ADMET, absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity; ALARA, as low as reasonably achievable; AR, aspect ratio; ARF, acoustic radiation force; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGM2-mv, endothelial cell growth medium 2; EGTA, egtazic acid; FBS, fetal bovine serum; Hz, hertz; LSEC, liver sinusoidal endothelial cell; MEM, minimum essential medium; MSC, mesenchymal stromal cell; NCAM, neural cell adhesion molecule; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; PBS, phosphate-buffered saline; PDMS, polydimethylsiloxane; ROCK, rho-associated protein kinase.

wavelength with the height of a resonant cavity. The use of ultrasounds does not require any marker or hydrogel.

Ultrasonic standing waves of a few megahertz can produce an acoustic radiation force (ARF) able to manipulate small particles as well as mammalian cells.

Up to now, acoustic levitation of cells had been mainly used to pattern cell structures into hydrogels, or to aggregate cells for a few minutes (Olofsson, Carannante, Takai, Önfelt, & Wiklund, 2021; Chen et al., 2019; Liu et al., 2007; Edwards, Bazou, Kuznetsova, & Coakley, 2007; Bazou, Coakley, Hayes, & Jackson, 2008; Bazou, 2010; Kuznetsova, Bazou, Edwards, & Coakley, 2009; Khedr et al., 2019; Comeau, Hocking, & Dalecki, 2016). We and others recently showed that this technique could be used to culture mesenchymal stromal cells (MSCs) in acoustic levitation up to 24 hours (Jeger-Madiot et al., 2021; Im, Kim, Lee, & Bhang, 2022).

In our devices, we used a 2 MHz ultrasound broadband transducer, in order to create a multi-mode acoustic standing wave in a cavity of 10 mm of height. Cells in suspension can be levitated and trapped into the multiple acoustic pressure nodes. The acoustic frequency is tuned to match the resonance condition leading in general to 30 levitation planes for an acoustic frequency of 2.2 MHz, resulting in the formation of 25 to 30 spheroids in acoustic traps.

In this case, cells are aggregated by the external acoustic radiation force, and then undergo a cell-driven self-assembly while being levitated. It has been shown that MSCs can then self-organize freely, from cell sheets to spheroids (Jeger-Madiot et al., 2021), similarly to what had been previously reported in magnetic levitation (Lee & Hur, 2014). MSCs were maintained in levitation during hours without affecting their viability or functionality (Jeger-Madiot et al., 2021).

We investigated for the first time longer cell culture times in acoustic levitation, up to 6 days. We performed a comparative analysis of three cell types. We continued the study of MSCs, which are broadly used for tissue engineering, cell therapy and tumor modeling (Ryu et al., 2019). We also investigated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), which are a lever of action to vascularize spheroids and upscale tissue engineering. Thirdly, considering the high potential of liver-on-chip for cell therapy, drug testing and fundamental research (Brooks et al., 2021; Beckwitt et al., 2018; Sae-be et al., 2023; Prior, Inacio, & Huch, 2019; Zuchowska, Kwapiszewska, Chudy, Dybko, & Brzozka, 2017), we levitated HepaRG cells (Andersson, Kanebratt, & Kenna, 2012).

In addition to their viability, the dynamics of spheroids formation in acoustic levitation were studied for these various cell types. We evaluated the role played by the acoustic parameters, as well as biological mechanisms through inhibition of actin- or E-cadherin-mediated mechanisms, on the dynamics of spheroids formation. This study paves the way to investigate the potential of acoustic levitation for fundamental and applied research in cell biology.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Cell culture

Cells in 2D or levitation were cultivated in incubators at 37°C and 5% CO₂. All types of cells were amplified in 2D culture before levitation. Cells were passaged using 0,25% trypsin + ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Gibco, UK).

Adipose derived mesenchymal stromal cells (MSCs) were isolated from tissue of the thigh according to the protocol presented in (Jeger-Madiot et al., 2021). MSCs were isolated from the adipose tissue of a male donor, obtained at Necker-Enfants Malades hospital in Paris, France. The adipose tissue was the surgical leftover and was used for research purposes after a signed consent from the donor and his parents as the legal tutors, according to the French bioethical and medical research regulations. Cells were amplified in α -MEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Biowest, Nuaille, France) and 1% antibiotic/antimycotic mix (Anti-Anti 100 \times , Gibco, Thermofisher, Waltham, United States). Cells were passaged at 80% confluency.

HUVEC, human umbilical vein endothelial cells (Lonza), were cultivated using Endothelial Cell Growth Medium 2 (EGM2-mv). Cells were passaged at 80% confluency.

HepaRG cells, provided by Biopredic International (Biopredic, St. Grégoire, France) were cultivated in basal hepatic cell medium (Biopredic) with 10% of HepaRG growth medium supplemented with antibiotics (Biopredic). Medium was renewed every 3 days. Cells were detached and passaged every 14 days.

Monolayers were cultured in 75 cm² culture flasks (Corning, Falcon, NY, USA). Levitated spheroids were formed and cultured in our acoustofluidic chip during several days.

2.2 | Microphysiological system: Acoustofluidic chip

The microphysiological system used consists in a spheroid-on-a-chip device placed in an incubator, with automated medium renewal and timelapse video recording (Fig. 1).

The chips were fabricated in Polydimethylsiloxane (PDMS, RTV 615, Neyco, Vanves), a transparent, gas permeable, biocompatible material that does not strongly reflect acoustic waves. PDMS (1:10 curing agent:base ratio) was poured in a plexiglass mold, heated at 70°C for 24h, then bonded with a plasma cleaner on a microscope glass slide acting as an acoustic reflector.

Waveform generators (Handscope HS5, TiePie Engineering, Sneek, Netherlands) were used to power ultrasonic transducers (8 mm diameter, 2 MHz, SignalProcessing, Savigny, Switzerland) with a sinusoidal waveform of amplitude ranging from $U = 3 V_{pp}$ to $U = 8 V_{pp}$. Amplitudes higher than $8 V_{pp}$ induce a strong increase in temperature in the system that could hamper cell viability. Amplitudes below $3 V_{pp}$ are too low to levitate cells in our system. When using $3 V_{pp}$, the system is sensitive to

disturbances such as sudden moves. Therefore, the smallest amplitude ($3.5 V_{pp}$) was used for most cultures, in order to be as gentle as possible with the cells, according to the As Low As Reasonably Achievable principle (ALARA). The frequency used was $F_{ac} = 2.2$ MHz, a value contained in the levitation range from 1.5 to 2.5 MHz, as shown in (Jeger-Madiot et al., 2022; Dron & Aider, 2013) and maximizing the acoustic energy (matching of the resonance condition). After emission by the transducer, the acoustic wave travels through a thin oil layer, used as an acoustic matching layer, and a PDMS membrane, before reaching the bulk of the cavity filled with cell medium. The height of the cavities was $h = 10$ mm leading to 30 levitation planes, i.e. 25 to 30 spheroids per chip.

The chip was perfused with a constant flow of $10 \mu\text{L}/\text{h}$ with a syringe pump (Pump 11 Elite from Harvard Apparatus, Holliston, United States) in order to renew the medium every three days, to mimic the rate of medium change in 2D cultures.

Timelapses of the spheroids formation inside the chip were obtained using Dino-Lite Pro 630-1165 USB portable Microscopes (Dinolite company, Taipei, Taiwan). One image was recorded every 10 minutes during several days.

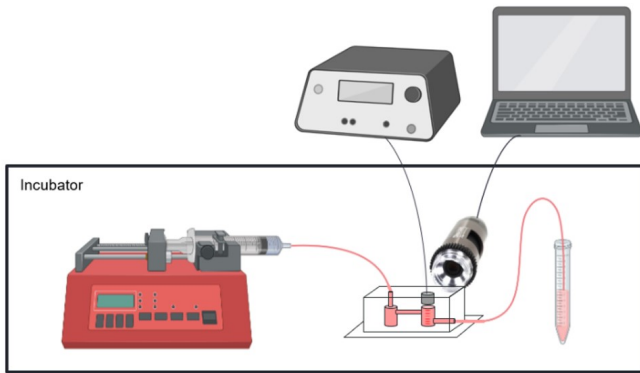


FIGURE 1 Acoustofluidic microphysiological system. The microphysiological system is placed inside an incubator (37°C , $5\% \text{CO}_2$). Culture medium is provided via tubing (flow : $10 \mu\text{L}/\text{h}$). The acoustic parameters are the same and kept constant during the culture (Amp = $3.5 V_{pp}$ / $F_{ac} = 2.2$ MHz). Created with BioRender.com.

2.3 | Viability study

After turning the ultrasound off and removing the spheroids from the chip by aspiration, spheroids were centrifuged at $284 g$ during 5 minutes at 20°C . In order to assess the cell viability after 3 days of levitation, spheroids were stained with calcein and ethidium bromide (LIVE/DEAD mammalian viability kit, Montlucon, France) and observed in an Incucyte S3 imaging system (Sartorius). Culture medium was removed from 2D

cultures and spheroids, followed by dissociation with 0.25% trypsin during 15 minutes. After suspension in PBS (Eurobio, Courtaboeuf, France), viability of individual cells was evaluated via flow cytometry (Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer). Calcein+/Ethidium- cells are considered as "viable", Calcein-/Ethidium+ as "non-viable", double stained cells as "in initiation of cell death", and non-stained as "undetermined".

2.4 | Levitation with EDTA and Y-27632

The calcium and magnesium chelator ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 0.1 mM) was used to modify the access of cells to calcium and disrupt calcium-mediated junctions such as E-cadherins.

To disrupt actin cytoskeleton functionality and remodeling, various concentrations ($40 \mu\text{M}$ and $60 \mu\text{M}$) of rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor Y-27632 were added to the culture medium.

2.5 | Shape and size description

To characterize the time evolution of the shape of the spheroids, we retrieved circularity (σ), aspect ratio (AR), width and height from ImageJ analysis.

The circularity σ of the object seen from the side is defined as:

$$\sigma = 4\pi \frac{A_r}{P_e^2} \quad (1)$$

with A_r the area of the spheroid and P_e its perimeter. By definition, $\sigma = 1$ corresponds to a perfectly circular object, while $\sigma = 0$ for a planar cell sheet.

To simplify the analysis, the aggregates will be considered as ellipsoids of major axis a , minor axis c (also the height of the ellipsoid) and transverse radius b (Fig.2). For a relatively flat ellipsoid, with $a = 10c$, the circularity is $\sigma = 0.2$

The Aspect ratio is then simply defined as :

$$AR = \frac{a}{c} \quad (2)$$

The surface area of the ellipsoid is calculated using the Knud Thomsen's Formula (relative error $< 1.42\%$) and using the hypothesis of a discoid ($b = a$) :

$$SA = 4\pi \left(\frac{a^{2p} + 2a^p c^p}{3} \right)^{1/p} \quad (3)$$

with $p = 1.6075$, a the half width of the spheroid and c the half-height from a side-view.

The corresponding volume was calculated using the formula:

$$V = \frac{4}{3} \pi a^2 c \quad (4)$$

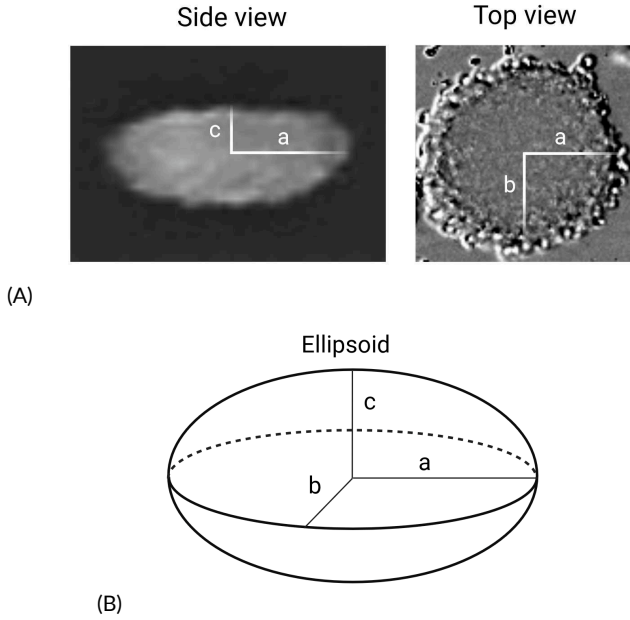


FIGURE 2 A) Side view and top view of a cell aggregate formed in acoustic levitation. B) Sketch of an ellipsoid with the three main radii.

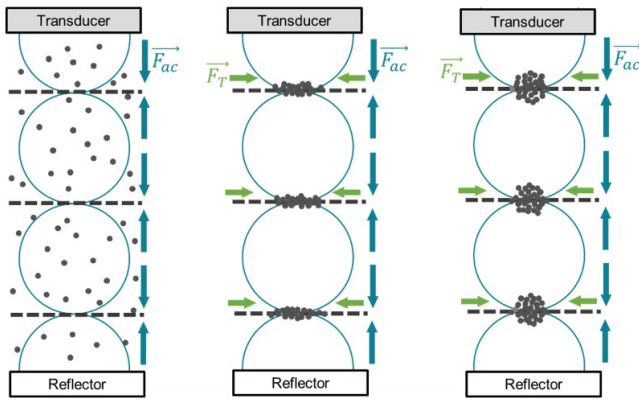


FIGURE 3 Sketches showing the three steps of acoustic manipulation (from left to right) by an ultrasonic standing wave of a few megahertz. First, the axial component (F_{ac}) of the acoustic radiation force (ARF) forces the particles or cells (with positive acoustic contrast factor) to move toward the acoustic pressure nodes. Once the particles or cells have reached the pressure nodes (levitation planes), they form monolayers thanks to the transverse component of the ARF (F_T). While particles form stable planar aggregates, cells spontaneously self-organize into spheroids that can be kept in acoustic levitation.

3 | THEORETICAL ASPECTS : ACOUSTIC RADIATION FORCE

To create an acoustic force field inside a cavity, one has to create an acoustic standing wave. The basic principle consists in emitting an acoustic wave inside the cavity, using an ultrasonic transducer. If a reflector is properly placed, facing the transducer at a distance h matching the resonance condition ($h = n\lambda_{ac}/2$, with λ_{ac} the acoustic wavelength), then an acoustic standing wave is created (Fig. 3). The particles or cells inside the cavity are then first submitted to the axial component of the ARF (F_{ac}) which forces them to move toward the acoustic pressure nodes (levitation planes) which are spaced by half a wavelength. Once the cells or particles have reached the acoustic levitation planes the transverse component of the ARF (F_T) forces them to move radially inside the levitation plane toward the local maximum of acoustic energy (located along the center of the cylindrical cavity) where they form an aggregate. The axial component is roughly 100 times stronger than the transverse component. The cells rapidly form a disk-like aggregate in which they can interact with neighboring cells. The confluency, as defined in a culture flask, is obtained within seconds. Once the discoidal aggregate is formed, it is consolidated by the Bjerknes force (short distance acoustic force between objects), as well as the cellular adhesion forces.

The most important component of the ARF, responsible of the acoustic levitation, is the axial component. It can be written as (Yosioka & Kawasima, 1955):

$$F_{ac} = \frac{\pi}{4} E_0 k d_p^3 F_Y \sin(2kz) e_z \quad (5)$$

where E_0 is the acoustic density energy, k is the acoustic wave number, d_p is the diameter of the particles / cells, F_Y is the acoustic contrast factor and z is the axial coordinate.

This expression is valid for circular, compressible particles, which is a reasonable approximation for cells floating in a medium. The particles are also considered as small compared to the acoustic wavelength (Rayleigh approximation). One can see from Eq. 1, that large particles will undergo a larger ARF than smaller particles. The acoustic contrast factor, which depends on the density and compressibility of the particles or cells, plays also an important role. It is defined as:

$$F_Y = F_K + F_V = \frac{1 + \frac{2}{3}(1 - \frac{\rho_f}{\rho_p})}{2 + \frac{\rho_f}{\rho_p}} - \frac{\rho_f c_f^2}{3 \rho_p c_p^2} \quad (6)$$

where ρ_p and ρ_f are respectively the density of the particles and of the fluid, and c_p and c_f are the celerity of acoustic waves in the particles and the fluid. The larger the differences between the properties of the particles and the fluid are, the larger the ARF is. The acoustic contrast factor of cells is unknown, but it can be measured with a specific protocol based on the measurement of the acoustic focusing velocity of a given cell toward the acoustic pressure node (Bellebon et al., 2022). The averaged value of acoustic contrast factor of adipose tissue-derived MSCs was 0.15 after at least three passages of culture. Unfortunately, this protocol could not be carried out for the cells used in this study. If

the particles are passive (no propulsion, no interactions), with a positive contrast factor, they aggregate into a 2D disk which can be maintained in a steady position in acoustic levitation indefinitely. If the objects are living cells, it has been shown that they spontaneously self-organize into a spheroids, as shown by (Jeger-Madiot et al., 2021) with MSCs.

4 | RESULTS

4.1 | Self-organization: from cell sheets to spheroids

In the acoustofluidics chips, the ARF creates a confluent layer of cells in a few seconds, fostering immediate interactions between cells. Such cell clusters adopted a spontaneous collective behavior leading to self-organization. When maintained in acoustic levitation during several hours, aggregates of cells spontaneously self-organize, turning the originally 2D discs into 3D spheroids.

Self-organization dynamics were shown to strongly depend on cell types (Fig. 4). While cell sheets formed during the first minutes of levitation always turned into spheroids after 60 hours, HepaRG spheroids were flatter than those obtained with MSCs and HUVEC (Fig. 4.A). We then evaluated the evolution of the circularity as a function of time (Fig. 4.B). The dynamics depends strongly on the cell type: MSCs and HUVEC spheroids are formed relatively quickly. The circularity of MSCs reaches its asymptotic value after 40 hours, while the circularity of HUVECs reaches its asymptotic value after only 6 hours in acoustic levitation. Nevertheless, spheroids of MSCs are less "circular" ($\sigma = 0.7$) than spheroids of MSC ($\sigma = 0.9$). Contrarily, HepaRG showed a very slow increase of the circularity, reaching $\sigma = 0.6$ after 60 hours in acoustic levitation.

Interestingly, the coculture of the HepaRG with HUVEC exhibited a different evolution, with a sharp increase of the circularity after 6 hours. Aggregates of cocultures with a 1:1 ratio of HepaRG and HUVEC displayed a behavior similar to HepaRG during the first 6 hours of culture, followed by a sharp increase up to 40 hours of levitation. These results demonstrated the synergy between the two cell types and the importance of the endothelial cells to accelerate the self-organization of hepatocytes.

After the initial increase, the circularities of the spheroids reached a plateau for all cell types. All asymptotic values of circularity were higher than 0.7 at the end of the culture in levitation. Nevertheless, the asymptotic value was again dependent on the cell type, since it was reached after 6 hours for HUVEC, 40 hours for MSCs, 40 hours for cocultures and 120 hours for HepaRG.

We then evaluated the aspect ratio (AR) of the spheroids (Fig. 4.C). For all studied cell types, AR decreased over time. Similarly, a decrease of surface area and volume was observed (Fig. 4.D and Fig. 4.E), indicating a compaction of the aggregates. In all cases the volume decreased but the reduction was particularly important for MSCs and HUVEC.

4.2 | Disruption of the self-organization mechanisms

In order to study more thoroughly the mechanisms responsible for the self-organization, either physical or biological, variations of voltage, and treatment with calcium chelator EDTA or ROCK-inhibitor Y-27632 have been performed.

4.2.1 | Influence of the amplitude of the ARF

It has been shown that ultrasounds, including those of frequency approaching 2 MHz, impacted various mechanosensitive ion channels involved in self-organization of tissues (Chu, Lim, Chien, Chen, & Wang, 2022; S. Kim et al., 2022; Wu, Lewis, & Grandl, 2017). In addition to the acoustic effects, cells also respond to various environmental mechanical stimuli, such as compression, substrate stiffness (Biswas, 2020) or shear-flow (S. Kim, Uroz, Bays, & Chen, 2021). Thus, it is of interest to investigate if variations in the applied ARF may influence the self-organization dynamics is of interest. To this purpose, experiments were performed with increasing voltage amplitude, for a given acoustic frequency. As shown in Eq. 1, the ARF depends linearly on the acoustic energy density E_0 . It has also been shown that the acoustic energy depends on the voltage as $E_0 \propto V_{pp}^2$ ((Dron & Aider, 2012; Barnkob, Iranmanesh, Wiklund, & Bruus, 2012)). It means that the amplitude of the ARF for 8 V_{pp} is more than 7 times higher than the ARF for 3 V_{pp} .

HepaRG cells were levitated during 3 days with a constant voltage, with a steady voltage ranging from 3 V_{pp} to 8 V_{pp} . The evolution of the circularity as a function of time for 4 different voltages is shown in Fig. 4. Differences in circularity between the 4 chips were slight and statistically non-significant. As a consequence, one can conclude that the amplitude of the ARF does not play a significant role in the process leading to spheroids formation.

4.2.1.1 | Importance of the acto-myosin network and cell-cell adhesion in morphogenesis

The cross-talk between intracellular motor proteins myosins II and cytoskeletal actin filaments drives cell contractility, shape and migration. Furthermore, neighbouring cells are able to form strong adhesions by the mean of adherent junctions proteins such as E-cadherins (Bachir, Horwitz, Nelson, & Bianchini, 2017).

Previous studies on hepatic spheroids showed that it is possible to temper with the self-organization dynamics, by acting either on the cytoskeleton or on the E-cadherin cell-cell adhesion (Lin, Chou, Chien, & Chang, 2006; Luebke-Wheeler, Nedredal, Yee, Amiot, & Nyberg, 2009; Khedr et al., 2019). We investigated whether this disruption could be recreated in our acoustofluidics chip. Due to the rapid increase of spheroid circularity for HUVEC cells and MSCs, the plateau was achieved after only a few hours. Therefore, self-organization disruption was studied for shorter times of culture for MSCs and HUVEC (6 hours) than for HepaRG cells (60 hours).

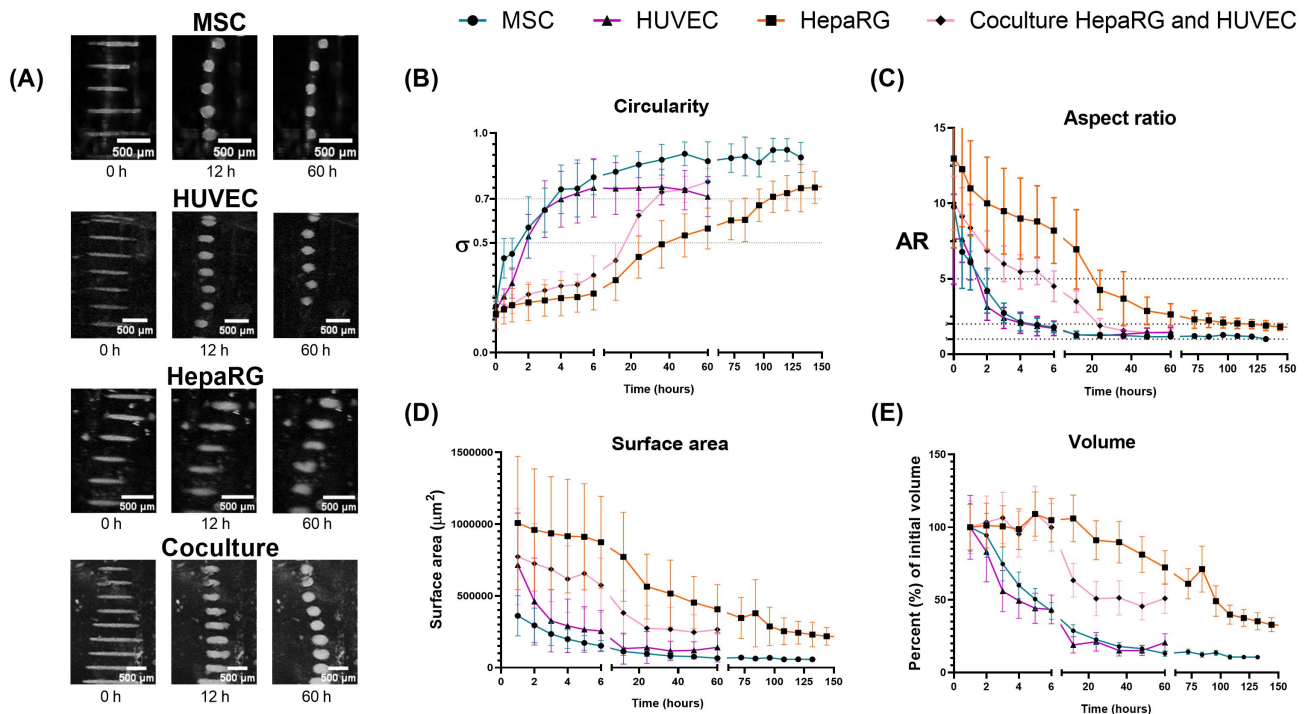


FIGURE 4 Shape and size analysis of spheroids ($n=20$) of different cellular composition: mesenchymal stromal cells (MSCs), human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), HepaRG hepatic cell line, and coculture of 50% HepaRG and 50% HUVEC levitated during up to 6 days. The acoustic parameters are the same and kept constant during the culture ($U = 3.5\text{ V} / F = 2.2\text{ MHz}$). (A) Side-views during 60 hours of levitation. The snapshots at 3 time steps show the evolution from cells sheets to spheroid over time (scale bars: $500\mu\text{m}$) for the three types of cells. (B) Time-evolution of the circularity (σ) of the aggregate (side views) showing the different dynamics of transformation of the cell sheets into spheroids (C) Time evolution of the Aspect Ratio (AR) of the aggregates. (D) Time evolution of the surface area of the aggregates. (E) Time evolution of the volume of the aggregates compared to the initial volume.

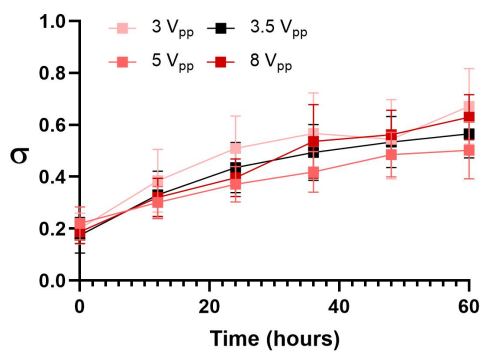


FIGURE 5 Circularity (σ) dynamic of HepaRG spheroids ($n \geq 6$) cultured in acoustic levitation with voltages ranging from 3 to 8 V_{pp} and constant acoustic frequency ($F_{ac} = 2.2\text{ MHz}$). Mean and standard deviation dynamic during 60 hours of levitation are shown.

4.2.1.2 | γ -27632 treatment

Cell contractility is mediated by the rho-associated protein kinase (ROCK), which enables the reorganization on the acto-myosin cytoskeleton. ROCK regulates notably cell contraction, motility, morphology and polarity (Sharanek et al., 2016). This mechanism plays a key role in the formation of spheroids ((Sodek, Ringuette, & Brown, 2009)). To evaluate the influence of contractility, the three cell types were treated with two different concentrations of ROCK-inhibitor Y-27632.

Circularity dynamic was decreased in the groups treated with $40\mu\text{M}$ and $60\mu\text{M}$ of Y-27632 (Fig. 6.A), for all cell types. These results confirm the important role played by the contractility of the cells in the self-organization process.

4.2.1.3 | EDTA treatment

Cell-cell adhesion is involved in spheroid self-organization and compaction. The adhesion is partly mediated by calcium-dependent E-cadherin homophilic binding in the cell types studied. E-cadherin is a calcium-dependent protein which plays a key role in cell-cell adhesion

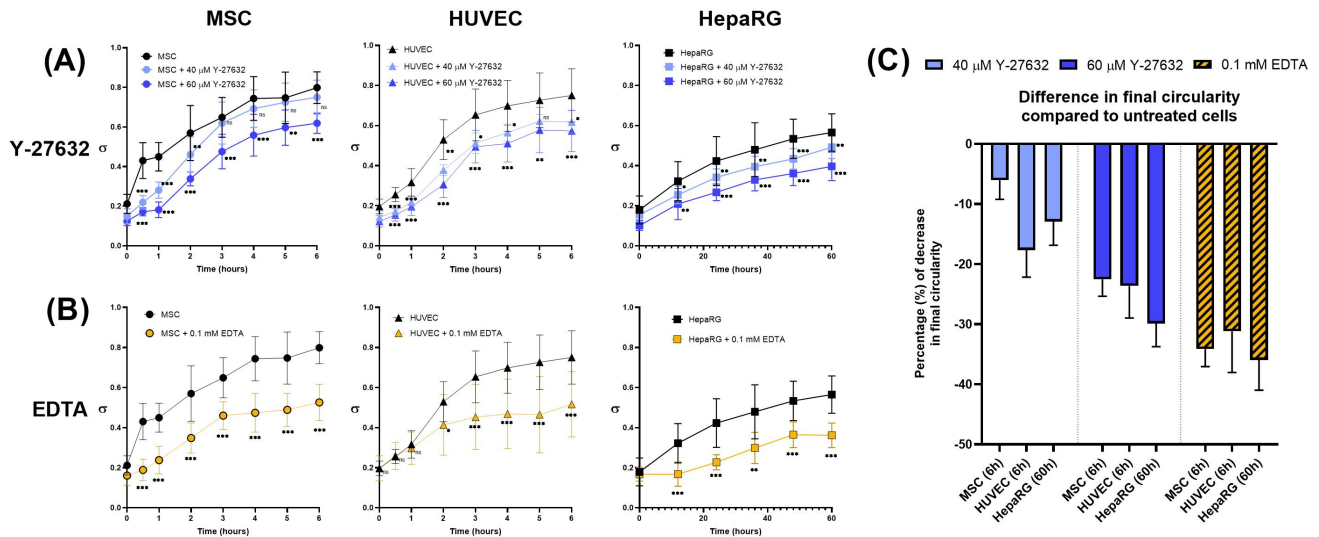


FIGURE 6 Evolution of circularity during treatment with EDTA and Y-27632 $A = 3.5 V_{pp} / F_{ac} = 2.2$ MHz. The time scale was adapted to the dynamics of the spheroid formation. (A) Circularity dynamic of MSCs, HUVECs and HepaRG spheroids ($n \geq 6$) treated with ROCK inhibitor Y-27632. (B) Circularity dynamic of spheroids treated with calcium chelator EDTA. (C) Percentage of difference in circularity compared to untreated cells at the end of the culture (6h for HUVECs and MSCs, 60h for HepaRG spheroids).

and tissue formation (Alberts et al., 2002). In order to affect calcium-dependent self-organization mechanisms, cells were treated with 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

We followed the evolution of circularity for the three cell types, with and without treatment with 0.1 mM EDTA (Fig. 6.B). For the three cell types, the treatment with 0.1 mM EDTA modified the circularity evolution during cell culture. At the end of the experiment, the circularity was decreased by more than 30% for the three cell types, confirming the important role played by E-cadherin in the self-organization process.

4.2.1.4 | Difference in final circularity

The Fig. 6.C shows the influence of the various treatments on the final circularities of the spheroids. It is computed as the difference in percentage compared to the untreated values. In all cases the asymptotic values are reduced and the percentage of reduction in final circularity is dependent on the dose and the treatment. Similar responses have been observed between the cell types. The maximum reduction is obtained with 0.1 mM EDTA for all cell types.

4.3 | Viability

A high cellular viability in the spheroid is essential to maintain a normal cell behavior. We first assessed cell viability of the whole spheroids. LIVE/DEAD confirmed that cell viability was preserved at the surface of the spheroids for the three cell types (MSCs, HUVEC and HepaRG), as shown in Fig. 7.

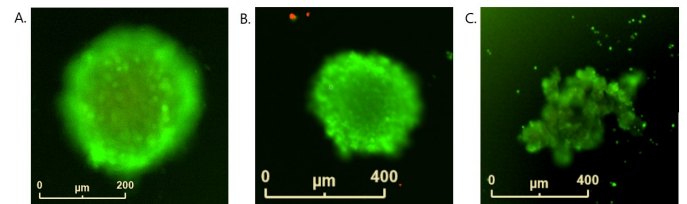


FIGURE 7 Spheroids of MSCs (A), HUVECs (B) and HepaRG hepatic cell line (C) after 3 days of acoustic levitation ($U = 3.5 V_{pp} / F_{ac} = 2.2$ MHz), stained with calcein and ethidium (Live/dead mammalian viability kit).

We then evaluated single cell viability by flow cytometry, after spheroid dissociation, and compared the results to the ones obtained with MSCs, HUVEC, and HepaRG cultured in 2D or low attachment. As shown in Fig. 8, cell viability was not impacted by a culture of 3 days in levitation, since more than 80% of cells were viable.

A similar approach was used to evaluate the impact of Y-27632 and EDTA on cell viability. While no significant decrease of cell viability was observed on MSC and HUVEC spheroids after 6 hours of levitation, the proportion of dead HepaRG cells was significantly increased after 3 days of exposition to Y-27632 and EDTA, showing a death-inducing effect of this long-term treatment (Fig. 9).

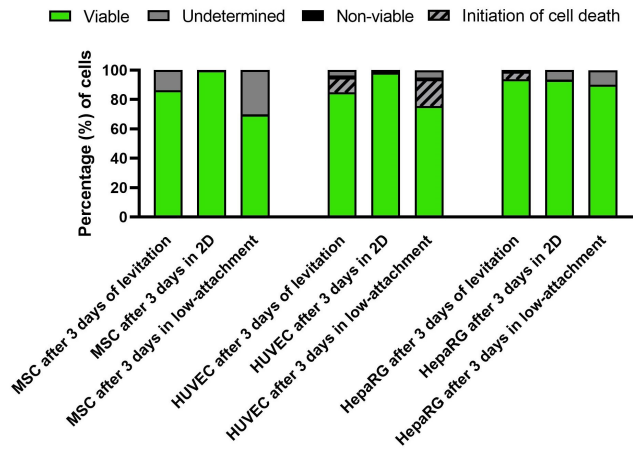


FIGURE 8 Viability of MSCs, HUVECs and HepaRG cells after 3 days in acoustic levitation ($3.5 V_{pp} / F_{ac} = 2.2$ MHz), 2D culture or in low-attachment, followed by spheroid dissociation. Viability was estimated with calcein and ethidium staining (Live/dead mammalian viability kit), and proportions of single stained and double stained cells were estimated by flow cytometry.

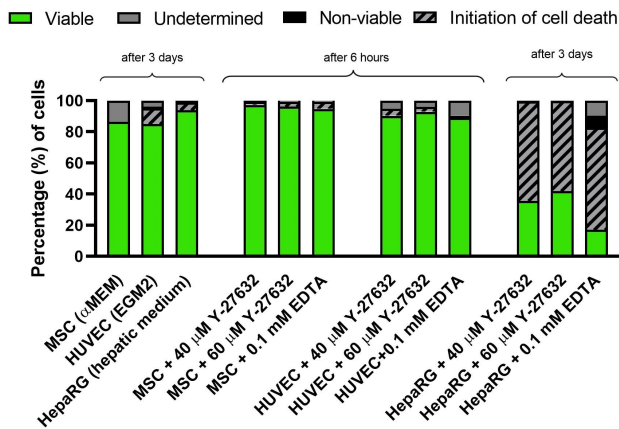


FIGURE 9 Cell viability after levitation, assessed by flow cytometry, in the presence or absence of calcium chelator EDTA and actin inhibitor Y-27632.

5 | DISCUSSION

Reported potentially harmful side effects of ultrasound treatment are numerous: temperature increase, formation of cavitation bubbles, increase in cell membrane permeability or shear stress created by acoustic streaming (Wiklund, 2012; Du et al., 2022). However, these side effects are only observed when high amplitude ultrasounds are used. In our

setup, all experiments are carried out with a very low amplitude ($U < 8V_{pp}$), so that all these potential side effects are negligible. According to the transducer manufacturer instructions, use of the device is safe because the ultrasonic power is of the order of few milliwatts. Exposition to ultrasounds in this frequency range at small amplitudes has been reported in both *in vivo* (Willemetz, 1990; Levenson, Pessana, Garipey, Armentano, & Simon, 2001; Grigioni et al., 2001) and *in vitro* applications (Devendran, Carthew, Frith, & Neild, 2019; Wiklund, 2012; Khedr et al., 2019; Hultström et al., 2007; Vanherberghen et al., 2010). Viability in our system is excellent. Further research, however, is still needed for functional validation.

Size is a limiting factor for spheroids. Hypoxic core has been reported on a number of spheroids with large diameters, the upper limit being generally considered to be $500 \mu\text{m}$ (Glicklis, Merchuk, & Cohen, 2004; Moshksayan et al., 2018). Due to the small size of our spheroids (diameters lower than $300 \mu\text{m}$ at all times) and based on our previous findings on MSC spheroids (Jeger-Madiot et al., 2021), core necrosis is not an issue in our system.

Self-organization is a key characteristic of spheroids and organoids. The recapitulation of self-assembly and polarity is essential for mimicking an organ (Huch et al., 2017).

During the first minutes of cell culture in acoustic levitation, self-assembly is mainly driven by the ARF (externally-driven assembly), leading to the initial cell sheet layer formation. Generator-controlled variations in voltage can increase or decrease the speed of cell sheets formation (modification of the acoustic energy), whereas modulations in frequency affect axial position of spheroids (Jeger-Madiot et al., 2022). It creates cell-cell interactions very quickly, which is one of the major interests of cell culture in acoustic levitation.

It also provides an environment where cells are free to self-organize without contact with cavity walls. Microenvironment stiffness has been proven to have an impact on cell morphology, proliferation, differentiation and functionality, for MSCs (Kozaniti, Deligianni, Georgiou, & Portan, 2021), endothelial (Vania et al., 2020) and hepatic cells (Serna-Márquez et al., 2020). Whereas in many self-organization studies the organoids are grown in contact with plastic surfaces, Matrigel® or hydrogels mimicking the extracellular matrix, in our case the cells self-organize only in contact with the medium or other cells, without mechanical contact with a stiff environment.

Once in the acoustic levitation plane, cells are contained in a so-called "acoustic trap", in an environment in which they can interact only with each other. This autonomy in organization has been advised in order to allow the cells organize as freely as possible (Sthijns, LaPointe, & van Blitterswijk, 2019). Even if the short-term self-assembly of cell sheets is primarily ARF-driven, our findings indicate that the long-term self-organization into spheroids is mainly cell-driven.

Previous studies have found that the initial rapid aggregation was followed by a compaction after a delay period of 2 to 4 hours (Lin et al., 2006). A compaction was also observed in our system, as volume decreases over time for all cell types.

The difference of self-organization between cell types can be explained by distinct biophysical properties. Cell adhesion abilities differ between cell types, leading for instance to different migration capacities (Parsons, Horwitz, & Schwartz, 2010). Contractile forces, generated by the acto-myosin interactions (Discher, Janmey, & Wang, 2005) differ according to the cell type. MSCs and LSECs (liver sinusoidal endothelial cells) are twice as contractile as HepaRG cells (Zhao et al., 2015). Notably, when cocultured, the more contractile cell type is able to drag the other cell type (Sakai et al., 2013; Takebe et al., 2012), which leads to stronger contractions. This explains the intermediary self-organization dynamic we observed when HepaRG and HUVEC were cocultured. Our results pointed out the importance of the cross-talk between the two cell types in our acoustic levitation system.

We showed that changes in the amplitude from $3 V_{pp}$ to $8 V_{pp}$ did not affect the long-term behavior of the HepaRG cells. Higher voltages could be needed to observe an impact of the ARF on the self-organization of HepaRG, but possible heating should be monitored and taken care of.

Self-organization from cell sheets to spheroids in other methods of culture has been reported to rely on cytoskeleton reorganization and cell-cell adhesion (Keller & Shook, 2011).

Even if their localization can be distinct between cell types, actin filaments generally form stress fibers in 2D cultures (Tzanakakis, Hansen, & Hu, 2001), and are located next to the cellular cortex in 3D cultures (Leite et al., 2012). The cortex localization has also been reported in acoustic levitation. For instance, HepG2 cells can form stable cell-cell connections in levitation within 10 minutes, showing membrane spreading and increase in junctional F-actin (Edwards et al., 2007). Distributions of filamentous actin, N-cadherin and neural cell adhesion molecule (NCAM) in neural cells are evolving in the first few minutes of acoustic levitation (Bazou, Foster, Ralphs, & Coakley, 2005 May-Jun), while chondrocytes form functional gap junctions in less than one hour (Bazou et al., 2006), showing the importance of cytoskeleton remodeling in levitated cells.

Self-assembly of fibroblast cell sheets into spheroids was reported to be delayed by a treatment with $10 \mu\text{M}$ of Y-27632, and completely blocked by a treatment with $100 \mu\text{M}$ of this compound (E. J. Y. Kim, Korotkevich, & Hிராசி, 2018). On the contrary, (Kojima, Takeuchi, & Sakai, 2011) showed that treatment with a higher concentration ($200 \mu\text{M}$) do not prevent migration of HepG2 and MS1 cells nor spheroid formation in low-attachment plates. Even if in the scientific literature distinct cell types display different sensitivities to the treatment, in our study, all cell types displayed a significant decrease of circularity for a concentration of $100 \mu\text{M}$ of Y-27632.

Treatment with 0.1 mM EDTA slows down the spheroid formation process in our system. Previous findings have shown that E-cadherin inhibition blocks spheroid formation in classical 3D culture (Luebke-Wheeler et al., 2009)) and in acoustic levitation (Tait et al., 2019; Khedr et al., 2019). Our treatment did not completely inhibit self-organization, probably because the EDTA dose was not sufficient to chelate all calcium ions. We did not use higher concentrations because they resulted

in massive cell death. EDTA chelates several compounds, including Ca_{2+} and Mg_{2+} ions. Other more specific molecules such as egtazic acid (EGTA) or anti-E-cadherin antibodies could be investigated in future studies.

We here showed that self-organization mechanisms are similar in our acoustofluidic chip, because they are impacted by treatment with EDTA and Y-27632. Cell-cell adhesion and cytoskeleton remodeling were shown to be critical for self-organization of the three cell types.

This first long-time study also opens up interesting prospects for cell culture in general. Indeed, cell types performing poorly in 2D, such as primary hepatocytes might thrive in acoustic levitation.

In conclusion, we demonstrated that our microphysiological system of cell culture in acoustic levitation is well-fitted for biotechnological applications and for further fundamental studies. It may then be used for building blocks for tissue engineering, or may serve as an *in vivo*-like model to study self-organization and organogenesis.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.R., L.A., N.J., D.R.G., J.L. and J-L.A. conceived and planned the experiments. L.R., L.A., N.J., and D.R.G. performed the experiments. J-L.A. and J.L. supervised the project. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Biopredic International for having kindly provided the HepaRG cell line; “Plateforme Technologique IRSL, Institut de Recherche Saint Louis, Université Paris Cité” facility and Niclas SETTERBLAD for their material and technical support; and our colleagues at CytoMorphoLab for providing scientific advice and reagent for the EDTA and Y-27632 study. We are grateful to Ecole Doctorale Frontières de l’Innovation en Recherche et Education – Programme Bettencourt, Université Paris-Cité, Région Ile-de-France (DIM ELICIT) and the French National Research Agency (RHU program ANR-16-RHUS-0005) for providing financial support for this research.

FINANCIAL DISCLOSURE

None reported.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no potential conflict of interests.

References

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Cell-Cell Adhesion. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition.
- Andersson, T. B., Kanebratt, K. P., & Kenna, J. G. (2012, July). The HepaRG cell line: A unique in vitro tool for understanding drug metabolism and toxicology in human. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 8(7), 909–920. doi: 10.1517/17425255.2012.685159

- Bachir, A. I., Horwitz, A. R., Nelson, W. J., & Bianchini, J. M. (2017, July). Actin-Based Adhesion Modules Mediate Cell Interactions with the Extracellular Matrix and Neighboring Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(7), a023234. doi: 10.1101/cshperspect.a023234
- Barnkob, R., Iranmanesh, I., Wiklund, M., & Bruus, H. (2012). Measuring acoustic energy density in microchannel acoustophoresis using a simple and rapid light-intensity method. *Lab on a Chip*, 12(13), 2337–2344.
- Bazou, D. (2010, April). Biochemical properties of encapsulated high-density 3-D HepG2 aggregates formed in an ultrasound trap for application in hepatotoxicity studies: Biochemical responses of encapsulated 3-D HepG2 aggregates. *Cell Biology and Toxicology*, 26(2), 127–141. doi: 10.1007/s10565-009-9123-0
- Bazou, D., Coakley, W., Hayes, A., & Jackson, S. (2008, August). Long-term viability and proliferation of alginate-encapsulated 3-D HepG2 aggregates formed in an ultrasound trap. *Toxicology in Vitro*, 22(5), 1321–1331. doi: figure
- Bazou, D., Dowthwaite, G. P., Khan, I. M., Archer, C. W., Ralphy, J. R., & Coakley, W. T. (2006, January). Gap junctional intercellular communication and cytoskeletal organization in chondrocytes in suspension in an ultrasound trap. *Molecular Membrane Biology*, 23(2), 195–205. doi: 10.1080/09687860600555906
- Bazou, D., Foster, G. A., Ralphy, J. R., & Coakley, W. T. (2005 May–Jun). Molecular adhesion development in a neural cell monolayer forming in an ultrasound trap. *Molecular Membrane Biology*, 22(3), 229–240. doi: 10.1080/09687860500093396
- Beckwitt, C. H., Clark, A. M., Wheeler, S., Taylor, D. L., Stolz, D. B., Griffith, L., & Wells, A. (2018, February). Liver 'organ on a chip'. *Experimental Cell Research*, 363(1), 15–25. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.12.023
- Bellebon, L., Sugier, H. R., Larghero, J., Peltzer, J., Martinaud, C., Hoyos, M., & Aider, J.-L. (2022). Characterization of mesenchymal stromal cells physical properties using acoustic radiation force. *Frontiers in Physics*, 10.
- Biswas, K. H. (2020, February). Molecular Mobility-Mediated Regulation of E-Cadherin Adhesion. *Trends in Biochemical Sciences*, 45(2), 163–173. doi: 10.1016/j.tibs.2019.10.012
- Brooks, A., Liang, X., Zhang, Y., Zhao, C.-X., Roberts, M. S., Wang, H., ... Crawford, D. H. G. (2021, July). Liver organoid as a 3D in vitro model for drug validation and toxicity assessment. *Pharmacological Research*, 169, 105608. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105608
- Chen, B., Wu, Y., Ao, Z., Cai, H., Nunez, A., Liu, Y., ... Guo, F. (2019). High-throughput acoustofluidic fabrication of tumor spheroids. *Lab on a Chip*, 19(10), 1755–1763. doi: 10.1039/C9LC00135B
- Chu, Y.-C., Lim, J., Chien, A., Chen, C.-C., & Wang, J.-L. (2022, October). Activation of Mechanosensitive Ion Channels by Ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 48(10), 1981–1994. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2022.06.008
- Clevers, H., Lancaster, M., & Takebe, T. (2017, June). Advances in Organoid Technology. *Cell Stem Cell*, 20(6), 759–762. doi: 10.1016/j.stem.2017.05.014
- Comeau, E. S., Hocking, D. C., & Dalecki, D. (2016, January). Ultrasound patterning technologies for studying vascular morphogenesis in 3D. *Journal of Cell Science*, jcs.188151. doi: 10.1242/jcs.188151
- Devendran, C., Carthew, J., Frith, J. E., & Neild, A. (2019). Cell Adhesion, Morphology, and Metabolism Variation via Acoustic Exposure within Microfluidic Cell Handling Systems. *Advanced Science*, 6(24), 1902326. doi: 10.1002/advs.201902326
- Discher, D. E., Janmey, P., & Wang, Y.-I. (2005, November). Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science*, 310(5751), 1139–1143. doi: 10.1126/science.1116995
- Dron, O., & Aider, J.-L. (2012). Acoustic energy measurement for a standing acoustic wave in a micro-channel. *Europhysics Letters*, 97(4), 44011.
- Dron, O., & Aider, J.-L. (2013). Varying the agglomeration position of particles in a micro-channel using acoustic radiation force beyond the resonance condition. *Ultrasonics*, 53(7), 1280–1287.
- Du, M., Li, Y., Zhang, Q., Zhang, J., Ouyang, S., & Chen, Z. (2022, June). The impact of low intensity ultrasound on cells: Underlying mechanisms and current status. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2022.06.004
- Edwards, G. O., Bazou, D., Kuznetsova, L. A., & Coakley, W. T. (2007). Cell adhesion dynamics and actin cytoskeleton reorganization in HepG2 cell aggregates. *Cell Communication & Adhesion*, 14(1), 9–20. doi: 10.1080/15419060701224849
- Glicklis, R., Merchuk, J. C., & Cohen, S. (2004). Modeling mass transfer in hepatocyte spheroids via cell viability, spheroid size, and hepatocellular functions. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(6), 672–680. doi: 10.1002/bit.20086
- Grigioni, M., Daniele, C., D'Avenio, G., Formigari, R., Bernucci, P., Ballerini, L., & Barbaro, V. (2001, November). Pulsatile Flow and Atherogenesis: Results from in Vivo Studies. *The International Journal of Artificial Organs*, 24(11), 784–792. doi: 10.1177/039139880102401107
- Hafiz, E. O. A., Bulutoglu, B., Mansy, S. S., Chen, Y., Abu-Taleb, H., Soliman, S. A. M., ... Uygun, B. E. (2021, January). Development of liver microtissues with functional biliary ductular network. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(1), 17–29. doi: 10.1002/bit.27546
- Huch, M., Knoblich, J. A., Lutolf, M. P., & Martinez-Arias, A. (2017, March). The hope and the hype of organoid research. *Development*, 144(6), 938–941. doi: 10.1242/dev.150201
- Hultström, J., Manneberg, O., Dopf, K., Hertz, H. M., Brismar, H., & Wiklund, M. (2007, January). Proliferation and viability of adherent cells manipulated by standing-wave ultrasound in a microfluidic chip. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 33(1), 145–151. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2006.07.024
- Im, G.-B., Kim, Y.-J., Lee, T. I., & Bhang, S. H. (2022). Subaqueous free-standing 3D cell culture system for ultrafast cell compaction, mechano-inductive immune control, and improving therapeutic angiogenesis. *Bioengineering & Translational Medicine*, n/a(n/a), e10438. doi: 10.1002/btm2.10438

- Jeger-Madiot, N., Arakelian, L., Setterblad, N., Bruneval, P., Hoyos, M., Larghero, J., & Aider, J.-L. (2021, April). Self-organization and culture of Mesenchymal Stem Cell spheroids in acoustic levitation. *Scientific Reports*, 11(1), 8355. doi: 10.1038/s41598-021-87459-6
- Jeger-Madiot, N., Mousset, X., Dupuis, C., Rabiet, L., Hoyos, M., Peyrin, J.-M., & Aider, J.-L. (2022, June). Controlling the force and the position of acoustic traps with a tunable acoustofluidic chip: Application to spheroid manipulations. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 151(6), 4165. doi: 10.1121/10.0011464
- Keller, R., & Shook, D. (2011, December). The bending of cell sheets—from folding to rolling. *BMC biology*, 9, 90. doi: 10.1186/1741-7007-9-90
- Kelm, J. M., Timmins, N. E., Brown, C. J., Fussenegger, M., & Nielsen, L. K. (2003). Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(2), 173–180. doi: 10.1002/bit.10655
- Khedr, M. M. S., Messaoudi, W., Jonnalagadda, U. S., Abdelmotelb, A. M., Glynne-Jones, P., Hill, M., ... Hilal, M. A. (2019, January). Generation of functional hepatocyte 3D discoids in an acoustofluidic bioreactor. *Biomicrofluidics*, 13(1), 014112. doi: 10.1063/1.5082603
- Kim, E. J. Y., Korotkevich, E., & Hiiragi, T. (2018, July). Coordination of Cell Polarity, Mechanics and Fate in Tissue Self-organization. *Trends in Cell Biology*, 28(7), 541–550. doi: 10.1016/j.tcb.2018.02.008
- Kim, S., Nam, H., Cha, B., Park, J., Sung, H. J., & Jeon, J. S. (2022). Acoustofluidic Stimulation of Functional Immune Cells in a Microreactor. *Advanced Science*, n/a(n/a), 2105809. doi: 10.1002/adv.202105809
- Kim, S., Uroz, M., Bays, J. L., & Chen, C. S. (2021, January). Harnessing Mechanobiology for Tissue Engineering. *Developmental Cell*, 56(2), 180–191. doi: 10.1016/j.devcel.2020.12.017
- Kojima, N., Takeuchi, S., & Sakai, Y. (2011, September). Establishment of self-organization system in rapidly formed multicellular heterospheroids. *Biomaterials*, 32(26), 6059–6067. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.081
- Kozaniti, F. K., Deligianni, D. D., Georgiou, M. D., & Portan, D. V. (2021, December). The Role of Substrate Topography and Stiffness on MSC Cells Functions: Key Material Properties for Biomimetic Bone Tissue Engineering. *Biomimetics (Basel, Switzerland)*, 7(1), 7. doi: 10.3390/biomimetics7010007
- Kuznetsova, L. A., Bazou, D., Edwards, G. O., & Coakley, W. T. (2009, May). Multiple three-dimensional mammalian cell aggregates formed away from solid substrata in ultrasound standing waves. *Biotechnology Progress*, 25(3), 834–841. doi: 10.1002/btpr.164
- Lee, J. H., & Hur, W. (2014). Scaffold-free formation of a millimeter-scale multicellular spheroid with an internal cavity from magnetically levitated 3T3 cells that ingested iron oxide-containing microspheres. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(5), 1038–1047. doi: 10.1002/bit.25156
- Leite, S. B., Wilk-Zasadna, I., Zaldivar, J. M., Airola, E., Reis-Fernandes, M. A., Mennecozzi, M., ... Coecke, S. (2012, November). Three-Dimensional HepaRG Model As An Attractive Tool for Toxicity Testing. *Toxicological Sciences*, 130(1), 106–116. doi: 10.1093/toxsci/kfs232
- Levenson, J., Pessana, F., Garipey, J., Armentano, R., & Simon, A. (2001, November). Gender differences in wall shear-mediated brachial artery vasoconstriction and vasodilation. *Journal of the American College of Cardiology*, 38(6), 1668–1674. doi: 10.1016/s0735-1097(01)01604-7
- Li, Y., Chen, H. S., Shaheen, M., Joo, D. J., Amiot, B. P., Rinaldo, P., & Nyberg, S. L. (2019). Cold storage of porcine hepatocyte spheroids for spheroid bioartificial liver. *Xenotransplantation*, 26(4), e12512. doi: 10.1111/xen.12512
- Lin, R.-Z., Chou, L.-F., Chien, C.-C. M., & Chang, H.-Y. (2006, June). Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: Roles of E-cadherin and B1-integrin. *Cell and Tissue Research*, 324(3), 411–422. doi: 10.1007/s00441-005-0148-2
- Liu, J., Kuznetsova, L. A., Edwards, G. O., Xu, J., Ma, M., Purcell, W. M., ... Coakley, W. T. (2007). Functional three-dimensional HepG2 aggregate cultures generated from an ultrasound trap: Comparison with HepG2 spheroids. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102(5), 1180–1189. doi: 10.1002/jcb.21345
- Luebke-Wheeler, J. L., Nedredal, G., Yee, L., Amiot, B. P., & Nyberg, S. L. (2009). E-cadherin protects primary hepatocyte spheroids from cell death by a caspase-independent mechanism. *Cell Transplantation*, 18(12), 1281–1287. doi: 10.3727/096368909X474258
- Moshksayan, K., Kashaninejad, N., Warkiani, M. E., Lock, J. G., Moghadas, H., Firoozabadi, B., ... Nguyen, N.-T. (2018, June). Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 263, 151–176. doi: 10.1016/j.snb.2018.01.223
- Olofsson, K., Carannante, V., Takai, M., Önfelt, B., & Wiklund, M. (2021, March). Ultrasound-Based Scaffold-Free Core-Shell Multicellular Tumor Spheroid Formation. *Micromachines*, 12, 329. doi: 10.3390/mi12030329
- Parsons, J. T., Horwitz, A. R., & Schwartz, M. A. (2010, September). Cell adhesion: Integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(9), 633–643. doi: 10.1038/nrm2957
- Prior, N., Inacio, P., & Huch, M. (2019, July). Liver organoids: From basic research to therapeutic applications. *Gut*, 68, gutjnl-2019. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319256
- Ramos, P., Carvalho, M. R., Chen, W., Yan, L.-P., Zhang, C.-H., He, Y.-I., ... Oliveira, J. M. (2023, April). Microphysiological systems to study colorectal cancer: State-of-the-art. *Biofabrication*, 15(3), 032001. doi: 10.1088/1758-5090/acc279
- Ryu, N.-E., Lee, S.-H., & Park, H. (2019, December). Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells.

- Cells*, 8(12), 1620. doi: 10.3390/cells8121620
- Sae-be, A., Wiwatpanit, T., Varatthan, T., Namporn, T., Laungkuldej, S., Thiabma, R., ... Ruenraroengsak, P. (2023). Comparative Study between the 3D-Liver Spheroid Models Developed from HepG2 and Immortalized Hepatocyte-Like Cells with Primary Hepatic Stellate Coculture for Drug Metabolism Analysis and Anticancer Drug Screening. *Advanced Therapeutics*, 6(2), 2200169. doi: 10.1002/adtp.202200169
- Sakai, Y., Hattori, K., Yanagawa, F., Sugiura, S., Kanamori, T., & Nakazawa, K. (2014). Detachably assembled microfluidic device for perfusion culture and post-culture analysis of a spheroid array. *Biotechnology Journal*, 9(7), 971–979. doi: 10.1002/biot.201300559
- Sakai, Y., Koike, M., Hasegawa, H., Yamanouchi, K., Soyama, A., Takatsuki, M., ... Eguchi, S. (2013). Rapid Fabricating Technique for Multi-Layered Human Hepatic Cell Sheets by Forceful Contraction of the Fibroblast Monolayer. *PLOS ONE*, 8(7), e70970. doi: 10.1371/journal.pone.0070970
- Serna-Márquez, N., Rodríguez-Hernández, A., Ayala-Reyes, M., Martínez-Hernández, L. O., Peña-Rico, M. Á., Carretero-Ortega, J., ... Vázquez-Victorio, G. (2020, June). Fibrillar Collagen Type I Participates in the Survival and Aggregation of Primary Hepatocytes Cultured on Soft Hydrogels. *Biomimetics*, 5(2), 30. doi: 10.3390/biomimetics5020030
- Sharaneek, A., Burban, A., Burbank, M., Le Guevel, R., Li, R., Guillouzo, A., & Guguen-Guillouzo, C. (2016, May). Rho-kinase/myosin light chain kinase pathway plays a key role in the impairment of bile canaliculi dynamics induced by cholestatic drugs. *Scientific Reports*, 6(1), 24709. doi: 10.1038/srep24709
- Skardal, A., Shupe, T., & Atala, A. (2016, September). Organoid-on-a-chip and body-on-a-chip systems for drug screening and disease modeling. *Drug Discovery Today*, 21(9), 1399–1411. doi: 10.1016/j.drudis.2016.07.003
- Sodek, K. L., Ringuette, M. J., & Brown, T. J. (2009). Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behavior and an invasive phenotype. *International Journal of Cancer*, 124(9), 2060–2070. doi: 10.1002/ijc.24188
- Soto, F., Guimaraes, C. F., Reis, R. L., Franco, W., Rizvi, I., & Demirci, U. (2021, April). Emerging biofabrication approaches for gastrointestinal organoids towards patient specific cancer models. *Cancer Letters*, 504, 116–124. doi: 10.1016/j.canlet.2021.01.023
- Sthijns, M. M. J. P. E., LaPointe, V. L. S., & van Blitterswijk, C. A. (2019, October). Building Complex Life Through Self-Organization. *Tissue Engineering. Part A*, 25(19–20), 1341–1346. doi: 10.1089/ten.TEA.2019.0208
- Tait, A., Glynn-Jones, P., Hill, A. R., Smart, D. E., Blume, C., Hammarstrom, B., ... Davies, D. E. (2019, July). Engineering multi-layered tissue constructs using acoustic levitation. *Scientific Reports*, 9(1), 9789. doi: 10.1038/s41598-019-46201-z
- Takebe, T., Sekine, K., Suzuki, Y., Enomura, M., Tanaka, S., Ueno, Y., ... Taniguchi, H. (2012, May). Self-Organization of Human Hepatic Organoid by Recapitulating Organogenesis In Vitro. *Transplantation Proceedings*, 44(4), 1018–1020. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.02.007
- Takebe, T., & Wells, J. M. (2019, June). Organoids by design. *Science (New York, N.Y.)*, 364(6444), 956–959. doi: 10.1126/science.aaw7567
- Tzanakakis, E. S., Hansen, L. K., & Hu, W.-S. (2001). The role of actin filaments and microtubules in hepatocyte spheroid self-assembly. *Cell Motility*, 48(3), 175–189. doi: 10.1002/1097-0169(200103)48:3<175::AID-CM1007>3.0.CO;2-2
- Vanherberghen, B., Manneberg, O., Christakou, A., Frisk, T., Ohlin, M., M. Hertz, H., ... Wiklund, M. (2010). Ultrasound-controlled cell aggregation in a multi-well chip. *Lab on a Chip*, 10(20), 2727–2732. doi: 10.1039/C004707D
- Vania, V., Wang, L., Tjakra, M., Zhang, T., Qiu, J., Tan, Y., & Wang, G. (2020, May). The interplay of signaling pathway in endothelial cells-matrix stiffness dependency with targeted-therapeutic drugs. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1866(5), 165645. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.165645
- Wiklund, M. (2012). Acoustofluidics 12: Biocompatibility and cell viability in microfluidic acoustic resonators. *Lab on a Chip*, 12(11), 2018–2028. doi: 10.1039/C2LC40201G
- Willemetz, J.-C. (Ed.). (1990). *Etude quantitative de l'hémodynamique de vaisseaux sanguins profonds par échographie Doppler ultrasonore*. Lausanne: EPFL. doi: 10.5075/epfl-thesis-893
- Wu, J., Lewis, A. H., & Grandl, J. (2017, January). Touch, Tension, and Transduction – The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(1), 57–71. doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.004
- Yosioka, K., & Kawasima, Y. (1955, January). Acoustic radiation pressure on a compressible sphere. *Acta Acustica united with Acustica*, 5(3), 167–173.
- Zhao, H., Zhou, L., Zhang, Q., Zhou, X., Zhang, Y., Chen, H., & Du, Y. (2015). Bi-content micro-collagen chip provides contractility-based biomechanical readout for phenotypic drug screening with expanded and profiled targets. *Lab on a Chip*, 15(17), 3481–3494. doi: 10.1039/C5LC00589B
- Zuchowska, A., Kwapiszewska, K., Chudy, M., Dybko, A., & Brzozka, Z. (2017). Studies of anticancer drug cytotoxicity based on long-term HepG2 spheroid culture in a microfluidic system. *ELECTROPHORESIS*, 38(8), 1206–1216. doi: 10.1002/elps.201600417

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

EVALUATION OF HEPATIC SPHEROIDS FORMATION AND CULTURE IN ACOUSTIC LEVITATION :
A COMPARATIVE STUDY

Evaluation of hepatic spheroids formation and culture in acoustic levitation: a comparative study

Lucile Rabiet^{1,2} | Nathan Jeger-Madiot¹ | Duván Rojas García¹ | Lucie Tosca³ | Gérard Tachdjian³ | Sabrina Kellouche⁴ | Rémy Agniel⁴ | Jérôme Larghero² | Jean-Luc Aider¹ | Lousineh Arakelian²

¹Laboratoire Physique et mécanique des milieux Hétérogènes (PMMH), CNRS, ESPCI, Paris, France

²Inserm U976, CIC-BT CBT501, AP-HP, Université Paris Cité, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

³Service Histologie Embryologie Cytogénomique, Hôpital Antoine Bécère, Clamart, France

⁴Laboratoire ERRMECe, Maison Internationale de la Recherche, CY Cergy Paris Université, Neuville-sur-Oise, France

Correspondence

Lucile Rabiet
Email: lucile.rabiet@gmail.com

Present address

Jean-Luc Aider, Laboratoire Physique et mécanique des milieux Hétérogènes (PMMH), 7 Quai Saint-Bernard, 75005 Paris, France.

Abstract

Hepatic spheroids are of high interest for basic research, drug discovery and cell therapy applications. Several methods for spheroid formation have been developed with their advantages and drawbacks. We explored an alternative technology: the hepatic spheroid formation and culture in an acoustofluidic chip, using HepaRG cell line. Spheroid formation and morphology, cell viability, genetic stability, and hepatic functions were analyzed after six and twelve days of culture in acoustic levitation. They were compared to 2D culture and non-levitated 3D cultures. Sizes of the 25 spheroids created in a single acoustofluidic microphysiological system were homogeneous. The acoustic parameters in our system did not induce cell mortality nor DNA damage. Spheroids were cohesive and dense. From a functional point of view, hepatic spheroids obtained by acoustic levitation exhibited polarity markers, secreted albumin and expressed hepatic genes at higher levels compared to 2D and low attachment 3D cultures. In conclusion, this microphysiological system proves not only to be suitable for long-term culture of hepatic spheroids but also to favor differentiation and functionality within 6 days of culture. These results are important for laboratory issues and for the pharmaceutical industry, as it may help to reduce costs and to accelerate and facilitate preclinical research phases with more realistic models.

KEYWORDS

acoustofluidics, acoustic levitation, self-organization, spheroids, microphysiological system, liver-on-chip

1 | INTRODUCTION

Spheroids and organoids are omnipresent in biomedical research and are promising approaches for drug discovery, cell therapy and personalized medicine (Bock et al., 2021). They display three-dimensional (3D) culture characteristics which increase the viability and functionality of numerous cell types. As such, they are part of the current paradigm shift from the traditional two-dimensional (2D) cell culture towards more biomimetic 3D models (Clevers et al., 2017; Rossi et al., 2018; Kapałczyńska et al., 2018).

Among the cell types, hepatic spheroids are of particular interest. Indeed, the liver is a vital organ with major properties, including protein synthesis and secretion, ion storage, and xenobiotics detoxification (Ehrlich et al., 2019; M. Liu et al., 2022). Currently, the use of primary human hepatocytes is highly challenging due to a limited availability and a lack of optimal culture conditions (Guguen-Guillouzo & Guillouzo, 2010). Indeed, after seeding in 2D culture systems, these cells displayed very limited or no proliferation, rapidly lost their polarity and their functionality and finally died (Lauschke et al., 2019; Guguen-Guillouzo & Guillouzo, 2010). In order to facilitate research on hepatic cells, other hepatocyte models were

Abbreviations: 2D, two-dimensional; 3D, three-dimensional; ADMET, absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity; ALARA, as low as reasonably achievable; AR, aspect ratio; ARF, acoustic radiation force; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGM2-mv, endothelial cell growth medium 2; EGTA, egtazic acid; FBS, fetal bovine serum; Hz, hertz; LSEC, liver sinusoidal endothelial cell; MEM, minimum essential medium; MSC, mesenchymal stromal cell; NCAM, neural cell adhesion molecule; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; PBS, phosphate-buffered saline; PDMS, polydimethylsiloxane; ROCK, rho-associated protein kinase.

developed. One of the most representative models is the bipotent HepaRG cell line (Gripon et al., 2002). In standard 2D culture conditions, these cells proliferate efficiently. In conditions of high confluence, two sub-populations of hepatocyte-like and cholangiocyte-like cells can be obtained (Meirinho et al., 2022). When further treated with DMSO, many genes including those of the detoxification enzymes are induced (Mayati et al., 2018; Kanebratt & Andersson, 2008; Le Vee et al., 2006). These properties have made them a useful tool for drug screening and basic research (Kamalian et al., 2018).

In vitro 3D cultures have been shown to be beneficial for primary hepatocytes and hepatic cell lines (Vorrink et al., 2017; Bell et al., 2018; Baze et al., 2018; Jarvinen et al., 2022; Desai et al., 2017; Takahashi et al., 2015)). Several techniques have been developed to create spheroids, such as suspension cultures, hanging drops, low attachment surfaces, scaffolds, microgravity or magnetic levitation (Ramos et al., 2023). Otherwise promising, all these methods still faces some of the following hurdles: heterogeneity in size, labor-intensive procedure, low throughput, poorly defined matrices and hydrogels, low cellular functionality, or a lack of technological maturity (Tevlek et al., 2023; B. Chen et al., 2019; Achilli et al., 2012). These drawbacks have slowed down the use of spheroids in the interested fields, such as cell therapy (Nagamoto et al., 2016; S. Chen et al., 2020; Ten Dam et al., 2023) or the drug development pipeline (Sasikumar et al., 2020; Christoffersson & Mandenius, 2019).

We here investigated the potential of acoustic levitation for integrating the landscape of hepatic spheroid formation and culture methods. Acoustic levitation harnesses forces produced by ultrasounds to handle the position of cells inside a miniature culture system. This technique allows the control of fluid flow and live microscopy as other microfluidic devices (Skardal et al., 2016; Beckwitt et al., 2018).

Acoustic forces can agglomerate a suspension of cells into aggregates, which can be kept in acoustic levitation inside the culture medium without any contact with the walls of a Polydimethylsiloxane (PDMS) chip. The cells inside the system are submitted to the axial (F_{ac}) and the transverse (F_T) components of the ARF. The axial component, roughly 100 times larger than the transverse component ((Woodside et al., 1997; Woodside, 1998)), drags the cells towards the pressure nodes, spaced with half a wavelength. The acoustic levitation is due to the axial component of the ARF, which can be written as (Yosioka & Kawasima, 1955):

$$F_{ac} = \frac{\pi}{4} E_0 k d_p^3 F_Y \sin(2kz) e_z \quad (1)$$

where E_0 is the acoustic density energy, k is the acoustic wave number, d_p the diameter of the particles or cells, F_Y is the acoustic contrast factor and z is the axial location of the particle along the vertical axis of the cylindrical cavity. This expression is valid for spherical, compressible particles, which is a reasonable approximation for cells floating in a medium. The particles are also considered as small compared to the acoustic wavelength (Rayleigh approximation). One can see from Eq. 1, that large particles will undergo a larger ARF than smaller particles. The acoustic contrast factor depends on the difference in density and compressibility between the cells and the medium: the larger the differences, the larger the force.

Once the cells have reached the levitation plane, the transverse component of the ARF forces them to gather toward the local maximum of acoustic energy located along the center of the cylindrical cavity (Whitworth & Coakley, 1992). The cells quickly form a circular aggregate in which they can interact with neighboring cells, in a similar condition to confluency in a culture flask. Once the discoidal aggregate is formed, it is consolidated by the Bjerknes force, which is a short distance attractive acoustic force between objects (Garcia-Sabaté et al., 2014), as well as the cellular adhesion forces.

Up to now, in the field of cell biology, cell culture in acoustic levitation has been achieved for only a few minutes (Bazou, 2010; J. Liu et al., 2007; G. O. Edwards et al., 2007; Kuznetsova et al., 2009), a few hours (Khedr et al., 2019; Tait et al., 2019) or one day (Jeger-Madiot et al., 2021). These previous relatively short-term studies nevertheless showed that acoustic levitation allowed the preservation of cell viability and functionality. It is important to note that ARF leads first to the formation of sheets of particles or cells. Contrarily to passive particles which can form stable planar aggregates, it has been shown that cells interact strongly with each other and cell sheets may self-organize into spheroids inside the device within a few hours (Jeger-Madiot et al., 2021). However, the question of the feasibility of this technique during several days and its effects on cell viability, genetic stability and cellular functions, remained unsolved. These are the objectives of the present study based on the long-term culture of HepaRG hepatic cells in acoustic levitation.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Cell amplification

Cells and spheroids were cultivated in incubators at 37°C and 5% CO₂. For amplification, HepaRG cells (Biopredic, St. Grégoire, France) were cultivated in basal hepatic cell medium (Biopredic) with 10% of HepaRG growth medium supplemented with antibiotics. The initial cell density was 2.7x10⁴ cells/cm². Culture medium was renewed every 3 days. Every 14 days, cells were detached and passaged using 0,25% trypsin + EDTA (Gibco, UK).

2.2 | Acoustofluidic chips

The acoustofluidic chips were fabricated in polydimethylsiloxane (PDMS, 1:10 curing agent:base ratio, RTV 615, Neyco, Vanves), a transparent, gas permeable and biocompatible material that does not strongly reflect acoustic waves. PDMS was poured in a plexiglass mold, heated at 70°C for 24h, then bonded with a plasma cleaner on a microscope glass slide (acoustic reflector).

2.3 | Culture conditions for the comparative study

2.3.1 | Formation and culture of spheroids in acoustic levitation

Ultrasonic standing waves of a few megahertz can produce an Acoustic Radiation Force (ARF) able to manipulate small particles as well as mammalian cells. In our devices (Fig. 1) we use a 2 MHz ultrasound broadband transducer to create a multi-modes acoustic standing wave in a $h = 10$ mm high cavity. The acoustic frequency f_{ac} (and corresponding acoustic wavelength λ_{ac}) is tuned to match the resonance condition ($h = n\lambda_{ac}/2$) leading to 30 levitation planes for an acoustic frequency of 2.2 MHz, resulting in the formation of 25 to 30 spheroids in acoustic levitation. Levitated spheroids were formed and cultured in eight chips in parallel. One million of cells were added in each chip. Ultrasonic transducers (SignalProcessing™) were powered by a waveform generator (Handyscope HS5, TiePie Engineering™) with a sinusoidal waveform of amplitude of $A = 3.5 V_{pp}$, the smallest possible amplitude to maintain the spheroids in levitation. The frequency used was $F_{ac} = 2.2$ MHz, a value contained in the levitation range of 1.5 to 2.5 MHz, as shown in previous studies (Jeger-Madiot et al., 2022; Dron & Aider, 2013). After emission by the transducer, the acoustic wave travels through oil (acoustic matching layer), a PDMS membrane and the bulk of the cavity filled with cell medium, before reaching the glass slide (Fig. 1). The height of the cavities was 10 mm leading to 30 levitation planes, i.e. 25 to 30 spheroids per chip.

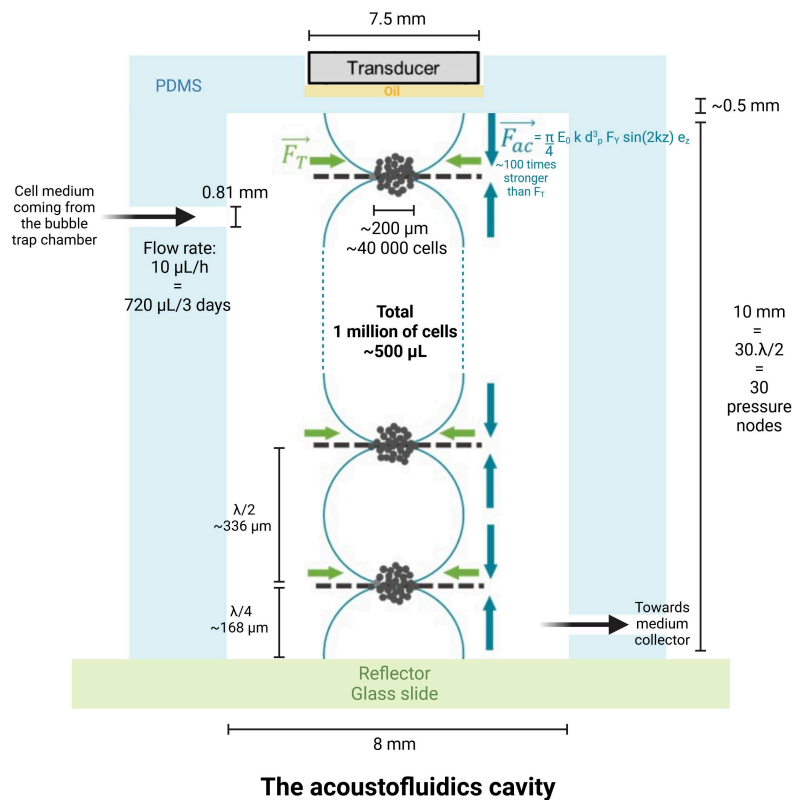


FIGURE 1 Sketch of the acoustofluidic cavity used in the present study to form and culture HepaRG spheroids over 6 to 10 days. The walls of the cavity are made of PDMS. An oil layer is used as a matching layer between the upper wall of the cavity and the transducer. The reflector facing the transducer is a glass slide. A constant flow rate is applied, allowing a total renewal of the medium after 3 days. The typical sizes of spheroids as well as the internode distance obtained with a 2.2 MHz acoustic wave are also displayed on the sketch.

A syringe pump perfused the chip with a constant flow of 10 $\mu\text{L}/\text{h}$ (Pump 11 Elite, Harvard Apparatus™) in order to renew the medium every three days. Timelapses showing the evolution of the spheroids inside of the chip were obtained with Dino-Lite Pro 630-1165 USB Microscopes (Dinolite company™). Snapshots were taken every 10 minutes during 12 days. In order to extrapolate the 3D geometry of the spheroids from the pictures, width and height of the spheroids were computed using the ImageJ software. Depth was considered equal to the width for the sake of simplicity. To characterize the time evolution of the shape of the spheroids during the first three days, we retrieved circularity (σ), aspect ratio (AR) and area from ImageJ analysis. The circularity σ of the object seen from the side is defined as:

$$\sigma = 4\pi \frac{A_r}{P_e^2} \quad (2)$$

with A_r the area of the spheroid and P_e its perimeter. By definition, $\sigma = 1$ corresponds to a perfectly circular object, while $\sigma = 0$ for a planar cell sheet. After 3, 6 or 12 days, the ultrasound were turned off and the spheroids were removed from the chip by aspiration. They were immediately transferred into a 96-well plate and were placed in an Incucyte S3 imaging system (Sartorius™) for immediate imaging of the top view of the spheroids.

2.3.2 | Formation and culture of non-levitated spheroids

Non-levitated spheroids were obtained and cultured either in 24-wells (Corning, Falcon™) or 96-well ultra-low attachment plates (Nuncclon Sphera, Thermo Scientific™) during 3, 6 or 12 days. 24-well plates were used as 3D controls in every experience. 96-well plates were used as additional control for morpho-analysis studies. The ultra-low attachment plates were placed in an Incucyte S3 imaging system at 37°C during 6 days. Images were taken every day. Some spheroids were removed from the plates after 3 days of culture, and injected gently inside an acoustofluidics chip for immediate side view imaging.

2.3.3 | 2D controls

2D controls in monolayers were cultured in 25 mm^2 culture flasks (Corning, Falcon) during 3, 6 or 12 days (2.7×10^4 cells/ cm^2).

2.4 | Viability study

To assess the cell viability, spheroids and monolayers were cultured during 3, 6 or 12 days. After aspiration from the culture devices, spheroids were centrifuged at 284 g for 5 minutes at 20°C. After removal of the supernatant, spheroids were stained a first time during 5 minutes with calcein and ethidium bromide (LIVE/DEAD mammalian viability kit, Montluçon, France) and observed in an Incucyte S3 imaging system. 2D monolayers did not require this preliminary treatment. Monolayers and spheroids were then dissociated with 0.25% trypsin during 15 minutes. After suspension in PBS (Eurobio, Courtaboeuf, France), spheroids were stained a second time during 5 minutes with calcein and ethidium bromide. Viability of individual cells was evaluated by flow cytometry (Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer).

2.5 | Monitoring of spheroids readhesion potential

After 6 days in levitation, spheroids were transferred in 96-well plates (Corning, Falcon, NY, USA) with fresh medium, and placed in an Incucyte S3 imaging system (Sartorius) at 37°C. Images were taken every 10 minutes during 14 days to assess the adhesive potential of levitated spheroids.

2.6 | Scanning electron microscopy

Spheroids were levitated in the acoustofluidic chip or cultured in low attachment plates during 6 days. After removal from the device, spheroids were placed on round cover glasses (12 mm diameter) inside a 24-well plates (Corning, Falcon, NY, USA) during 24 hours. Spheroids formed in ultra-low attachment 24-well plates were more heterogeneous in shape and size. Only the smaller non-levitated spheroids were able to readhere to the cover glasses whereas almost all levitated samples attached. Adherent spheroids were fixed with glutaraldehyde 2.5% and PFA 2%, diluted in cacodylate 0.1 M buffer. After dehydration in several ethanol baths of increasing concentration, supercritical drying with carbon dioxide was performed. Spheroids were coated with platinum 4nm. The sample preparation preserved the 3D structure of the spheroids. Images were taken using an electron microscope.

2.7 | Genetic stability

For conventional cytogenetic analysis and array-CGH, cells originating from the same culture batch were cultivated in acoustic levitation, in 24-well low attachment plates or in 25 mm² flasks during 6 days (three replicates for each), then cultivated in 6-well plates (Corning, Falcon, NY, USA) for amplification during 7 days.

2.7.1 | Karyotype analysis

While plates were still not confluent, 20 μ L of colcemid (20 mg/L; EUROBIO) were added in each 6-well plate well. Plates were incubated at 37°C during 2h. Cells were dissociated with 0.25% trypsin during 5 minutes (37°C); transferred into a 15 mL tube and centrifuged at 284 g for 5 minutes at 20°C. Supernatant was replaced by 8 mL of preheated KCL 0.075 M and incubated during 20 min at 37°C. 2 mL of 4°C Carnoy (3:1 methanol:acetic acid) were added for prefixation of the samples. After further centrifugation, samples were fixed in 8 mL of Carnoy and kept at 4°C. Chromosome analysis was performed using standard procedures (G-band by trypsin using Giemsa (GTG), R-band after heat denaturation and Giemsa (RHG) banding techniques and Giemsa staining).

2.7.2 | Comparative genomic hybridization (CGH) array

Cells were dissociated with 0.25% trypsin during 5 minutes (37°C). DNA was extracted from the samples using Mini-Kit PureLink® Genomic DNA Kits K1820-02, according to the manufacturer instructions, and eluted in 50 μ L of PureLink Genomic Elution Buffer. DNA quantity and purity were evaluated using NanoDropLite (Thermo scientific™). DNA integrity was assessed with a 1% agarose (Agarose DR - DNA grade - D5-D) gel (Tris borate EDTA buffer ETO020-A) electrophoresis (120 V; 30min). 500 ng of DNA was diluted in water with 1 μ L of blue juice gel loading buffer; gene ruler 1kb (Thermo-Fisher Scientific, UK) was used as a ladder. Genomic imbalances were analyzed by array-CGH using 180K oligonucleotide arrays (Agilent Technologies, Massy, France). Each genomic DNAs were compared with native HepaRG cells genomic DNA. Hybridization was performed according to the manufacturer's protocol. Images were processed with Feature Extraction software (10.7.3.1), and data analysis was performed with Genomic Workbench V5.0.14 (Agilent Technologies). The genomic positions were determined using version 19, Build37 of the human Genome Browser (University of California, Santa Cruz, CA; <http://genome.ucsc.edu/>). The Aberration Detection Method 2 algorithm was used for statistical analysis. Copy number alterations were considered important if they were defined by four or more oligonucleotides and spanned at least 39 kb and were not identified in the Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/cgi-bin/variation/gbrowse/hg19>).

2.8 | RT-qPCR

RNA extraction was performed based on trizol/chloroform method. RNA quantity and purity were evaluated using NanoDropLite (Thermo scientific™). Gene expression was then evaluated by Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). RT was performed with 500 ng of RNA and high capacity cDNA reverse transcription kit (Thermofisher™) in 0.5 mL tubes (Easy strip Snap Tubes, Thermofisher™) in a SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems), using the following program: 10 mins at 25°C, 120 mins at 37°C, 5 mins at 85°C, followed by a cooling step at 4°C. The cDNAs were diluted to 1/50 in nuclease free water and were used for qPCR (5 ng of cDNA/well) with RNEasy Plus Mini Kit (Quiagen). TaqMan™ probes were used for the amplification. The reactions were performed in 384 reaction plates (Applied Biosystem™) in a final volume of 20 μ L per well. The reagents were dispatched in the wells using an Epmotion 5073 robot (Eppendorf). We compared the expression of genes related to polarity (apical cell membrane transporters), detoxification (nuclear receptors and cytochromes), albumin production and the urea cycle (Table 1). RPLPO was used as housekeeping gene.

All results were expressed as relative quantification (RQ) compared to one of the samples ("Control") cultivated during 6 days in 2D (initial seeding density of 28 000 cells/cm²). Statistical test: t-test (n=3). Overexpression was considered when RQ was superior to 2 and underexpression when RQ was inferior to 0.5.

TABLE 1 Gene chart used for RT-qPCR analysis.

Gene symbol	Protein full name	Reference
RPLP0	Ribosomal protein lateral stalk subunit P0	Hs99999902
MRP2 / ABCC2	Multi-drug resistance protein 2	Hs00166123
MRP3 / ABCC3	Multi-drug resistance protein 3	Hs00978452
BSEP / ABCB11	Bile salt export pump	Hs00994811
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor	Hs00169233
PXR / NR1I2	Pregnane X receptor	Hs01114267
CAR / NR1I3	Constitutive androstane receptor	Hs00901571
CYP1A1	Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1	Hs01054796
CYP1A2	Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 2	Hs00167927
CYP2C9	Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 9	Hs02383631
CYP2E1	Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1	Hs00559367
CYP3A4	Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4	Hs00604506
ALB	Albumin	Hs00609411
ARG1	Arginase 1	Hs00163660

2.9 | Immunohistochemistry

2.9.1 | Cryosection

After removal from the device, spheroids were fixed in PFA 4% during 30 min, then stored at +4°C in PBS. PBS was replaced by PBS + sucrose 15 % (Sigma-Aldrich) during 1 h, then by PBS + 30 % sucrose during 48 h. Spheroids were withdrawn from the PBS + sucrose, and deposited inside a silicon mold filled with ≈ 1 mL of OCT (Optimal Cutting Temperature, Cryofix Gel, Biognost) cryo-embedding matrix. The samples were immediately placed on dry ice and frozen. Samples were removed from the mold, placed in cold 2 mL ependorf and stored at -80°C. Spheroids were cut (25 μm sections) with a cryostat (-20°C) and deposited on polylysine-coated glass slides. Sections were stored at -80°C until staining.

2.9.2 | Immunostaining

Samples were incubated (200 μL / spheroid) during 15 min in PBS + BSA (3 %) + Triton (0.05 %) for saturation of non-specific sites and permeabilization. Then, samples were incubated in PBS + BSA + glycine (0.3 M) during 30 min. Samples were incubated for 1 h in primary antibodies (dilution 1:200, 200 μL / spheroid) summarized in Table 2. After being washed three times in PBS + BSA + Tween (0.1 %), samples were incubated during 30 min with phalloidin (1:500) or secondary antibodies (1:500), with DAPI (1:2000) being added to each samples 5 mn before the end of the incubation period. Glass slides were washed 3 times, covered with ProLongTM Gold antifade reagent (Life Technologies), and overlaid with a cover glass. The fluorescent antibodies used for immunostaining are shown in Table 3.

TABLE 2 Primary antibodies used for immunostaining.

Protein	Primary antibody	Supplier	Reference
CYP3A4	Rabbit polyclonal	Invitrogen	PA1-343
MRP2	Mouse monoclonal	Santa Cruz	SC-59609

TABLE 3 Fluorescent antibodies used for immunostaining.

Antibody	Wavelength	Supplier	Reference
DAPI	405		
Goat-antirabbit	555	Invitrogen	A21428
Goat-antimouse	488	Invitrogen	A21121
Phalloidin	488		

2.9.3 | Confocal imaging

Images were acquired by confocal microscopy on a LSM 780 system mounted on an Examiner Z1 stand (ZeissTM) with a Apochromat 40X N.A.1.3 oil-immersion objective using the Zen 2011 Black edition software (Zeiss, v.8.1).

2.10 | Albumin dosage

Supernatants of levitated samples were taken at the outlet of the chip during the 6 days of medium renewal. Supernatants of non-levitated samples were taken during whole medium change at day 3 and day 6, then mixed separately for each sample. Albumin dosage in supernatants was performed with Human Serum Albumin DuoSet ELISA (RnD SystemsTM), according to the manufacturer's instructions. The optical density at 450 nm was detected using a microplate reader (VarioskanTMLUX multimode, Thermo ScientificTM, Waltham, MA USA). Supplemented HepaRG cell culture medium served as negative control.

3 | RESULTS

3.1 | Morpho-analysis of levitated and non-levitated spheroids

Spheroids were successfully kept in levitation during up to 12 days. Long-term culture in levitation was performed inside an incubator, with precise control of flow, ARF and constant visual monitoring (Fig. 2.a). Spheroids were imaged from the side and sometimes from the bottom. When HepaRG cells were levitated during several hours, self-organization was observed, according to the principle presented in Fig. 2.b. When observed from the bottom of the cavity, the shape of the spheroid was circular during the entire levitation (Fig. 2.c). When observed from the side of the cavity, the shape of the spheroid evolved from a planar cell sheet to a circular spheroid overtime (Fig. 2.d). After the end of the levitation, the visual analysis was enriched with a instant top view acquisition, after deposition in a 96-well plate (Fig. 2.e), which showed the shape of the spheroid without the influence of the ARF. Spheroids remained cohesive after removal from the acoustofluidics chip, at day 3, 6 and 12.

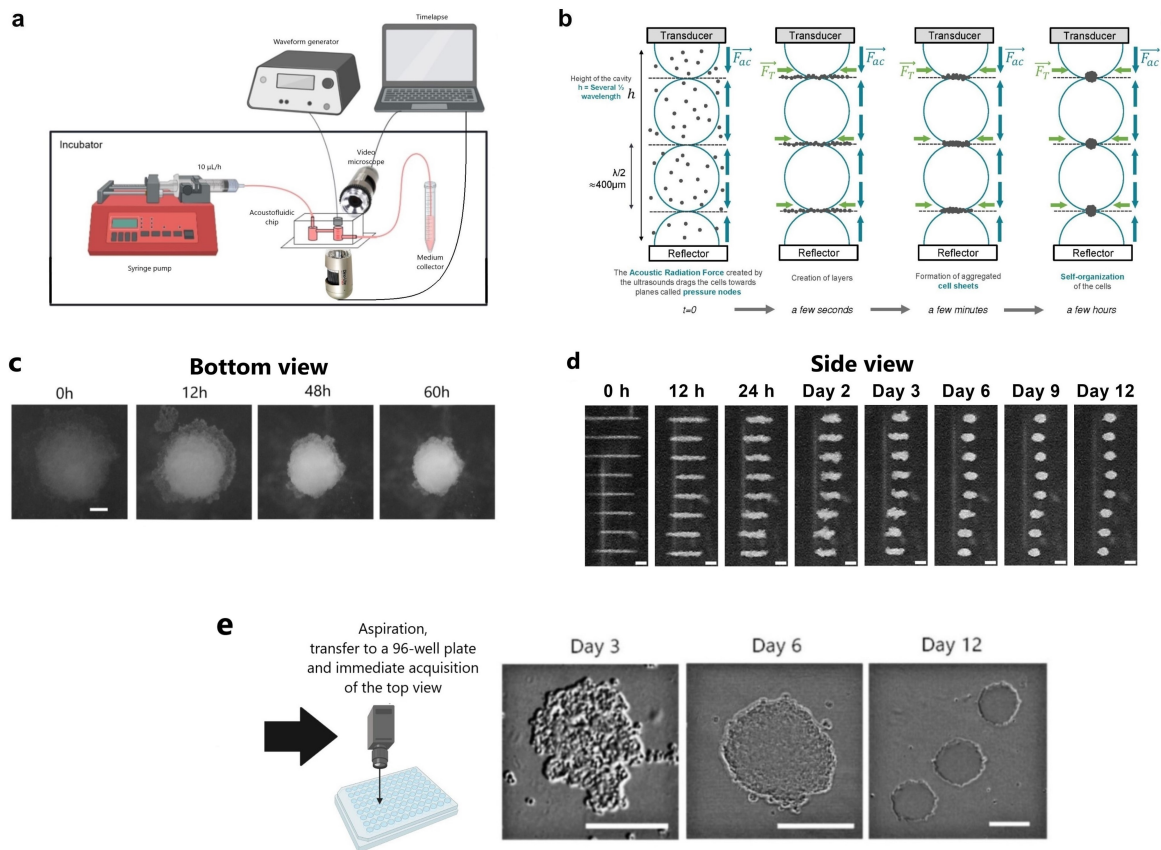


FIGURE 2 a) Acoustofluidic microphysiological system. The microphysiological system is placed inside an incubator (37°C, 5% CO₂). Culture medium is provided via tubing (flow rate: 10 μL/h). The acoustic parameters are the same and kept constant during the culture (Amp = 3.5 V_{pp} / F_{ac} = 2.2 MHz). Created with BioRender.com. b) Sketches showing the four steps of acoustic manipulation (from left to right) by an ultrasonic standing wave of a few megahertz. First, the axial component (F_{ac}) of the acoustic radiation force (ARF) forces the particles or cells (with positive acoustic contrast factor) to move toward the acoustic pressure nodes. Once the particles or cells have reached the pressure nodes (levitation planes), they form monolayers thanks to the transverse component of the ARF (F_T). While particles form stable planar aggregates, after a few hours, cells spontaneously self-organize into spheroids that can be kept in acoustic levitation. c) Timelapse of the bottom view (scale bar: 400 μm) of one spheroid formed in an acoustofluidic cavity of height $h \approx 3 \cdot \lambda/2$. d) Timelapse of the formation of 8 spheroids in a cavity of height $h \approx 30 \cdot \lambda/2$ (scale bar: 200 μm). e) Top view of levitated spheroids after removal from the acoustofluidics chip after 3, 6 or 12 days of levitation (scale bar: 200 μm).

The 96-well low attachment plates were used as control for the comparative study of morphological dynamics (Fig. 3). A similar self-organizational behavior was observed. Cell sheets compacted overtime, and side view observations after 3 days of formation revealed a non-flat 3D shape.

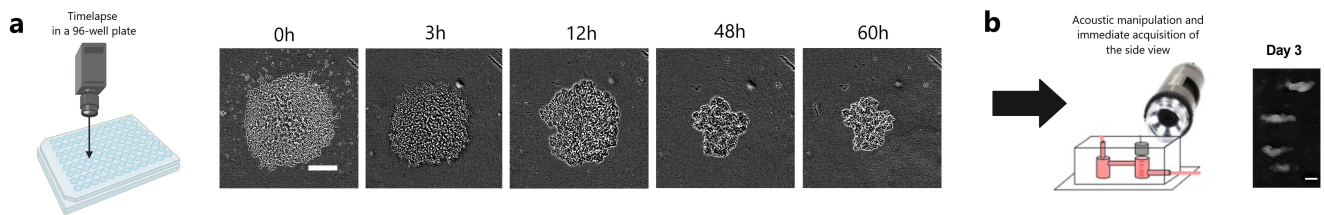


FIGURE 3 a) Bottom view (scale bar: $400\ \mu\text{m}$) and b) side view (scale bar: $200\ \mu\text{m}$) of non-levitated spheroids in 96-well low attachment plates.

3.1.1 | Compaction dynamic and shape

Further comparison was performed regarding the first three days of culture. This period was defined as the temporal unit for the formation of cohesive spheroids. The dynamic and values of compaction of the cell sheets into spheroids are similar in levitation and in low attachment plates (Fig. 4.a). The aspect ratio was close to $AR = 1$ for both types of culture (Fig. 4.b), showing the tendency of wells to aggregate homogeneously towards the center of the cavity or of the well respectively. This has justified considering the spheroids as a disk when observed from the bottom. Circularity of the levitated spheroids (Fig. 4.c), analyzed from the bottom, was significantly higher in acoustic levitation and increased overtime compared to non-levitated spheroids. This was due to the higher smoothness of the levitated spheroids, whereas non-levitated spheroids exhibited a folded surface.

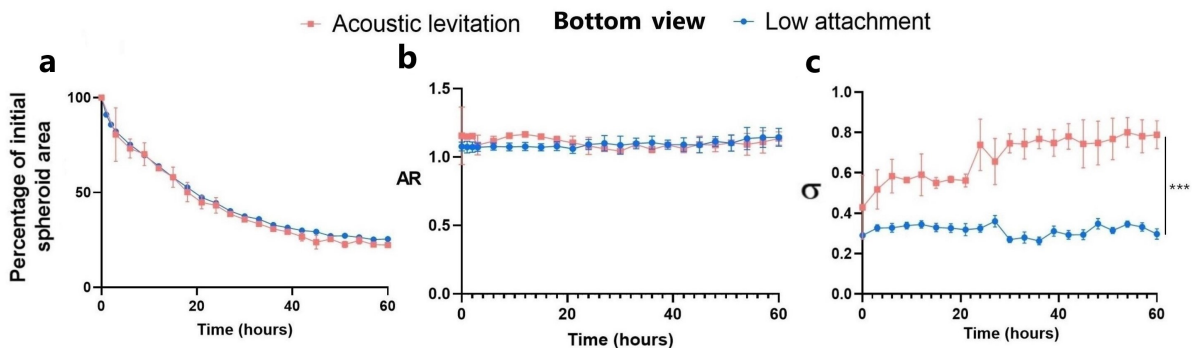


FIGURE 4 Evolution of spheroid shape during 60 hours in acoustic levitation or in 96-well low attachment plates. Morpho-descriptors: a) percentage of initial area, b) aspect ratio (AR) and c) circularity (σ) of spheroids observed from the bottom.

3.1.2 | Homogeneity study

Given the impact of the spheroid size on the formation of hypoxic cores and functionality, control of size is requested (Jain et al., 2005; B. Chen et al., 2019). Homogeneity inside one chip and reproducibility from one chip to another were investigated thanks to width and height measurements. Width was defined as the diameter of the disk observed in a bottom view, whereas height was the length of the minor axis of the ellipse obtained from a side view of the spheroid (Fig. 5.a).

The number of spheroids in one chip depends only on the acoustic wavelength and the height of the cavity. In our configuration (2.2 MHz, 10 mm), ≈ 25 nearly identical spheroids were formed in each chip. The injection of a homogeneous cell suspension inside one chip resulted in homogeneous sizes of spheroids (Figure 5.b and 5.c). Furthermore, the number of cells in one spheroid, impacting its size, was only dependent on the number of cells injected in the chip. This allowed a precise and repeatable control of sizes from chip to chip.

This level of reproducibility was comparable with the homogeneity of spheroids obtained in 96-well low attachment plates. On the contrary, the number of spheroids formed in one well of 24-well ultra-low attachment plate was highly variable from well to well, resulting in heterogeneous sizes both from well to well and inside the same well.

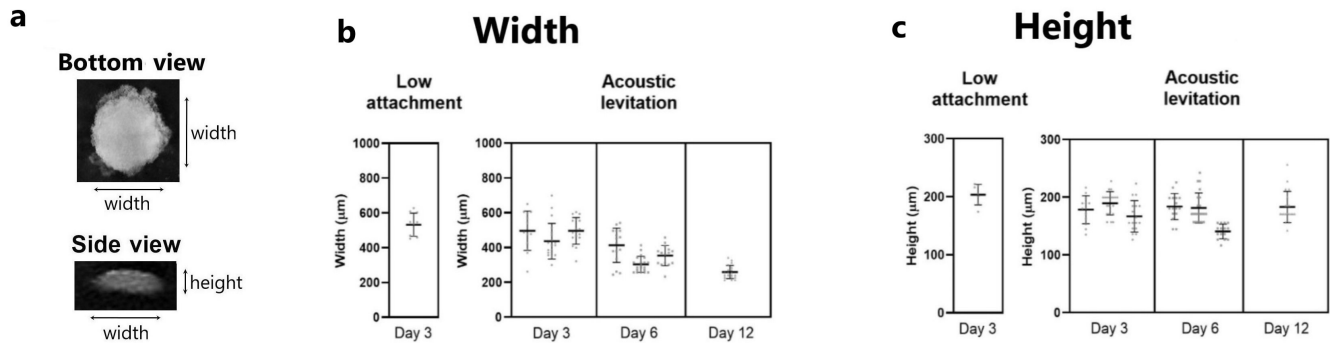


FIGURE 5 Homogeneity study. a) The bottom view allows measuring the width (diameter) of the spheroid, and the side view gives access to both the height and the width. Distribution of width (b) and height (c) of non-levitated and levitated spheroids (3 acoustofluidic chips were analyzed at day 3 and day 6, and one chip at day 12).

3.2 | Viability after 3, 6 and 12 days in culture

3.2.1 | LIVE/DEAD of whole and dissociated spheroids

Acoustic levitation did not affect the viability of the cells situated at the surface of the spheroids (Figure 6.a). The percentage of viable cells inside an acoustofluidic chip, after dissociation of the spheroids using trypsin, was always found larger than 70%, which was comparable to low attachment controls (Figure 6.b).

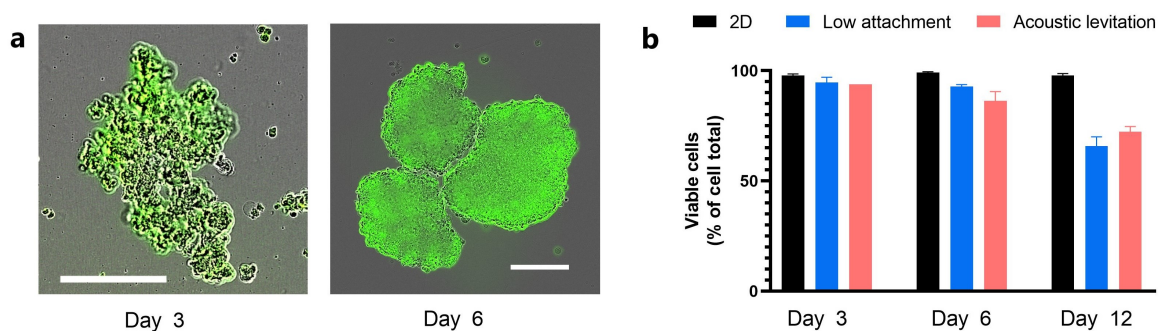


FIGURE 6 a) LIVE/DEAD staining of entire spheroids after 3 days (n=1) or 6 days (n=3) of levitation (scale bars: 200 µm). b) Proportion of viable cells after 3, 6 or 12 days in 2D, low attachment or acoustic levitation.

3.3 | Genetic stability

Karyotype and CGHa (comparative genomic hybridization array) analyses were performed to investigate potential chromosomal rearrangements or DNA damages caused by levitation.

3.3.1 | Karyotype of the HepaRG cell line

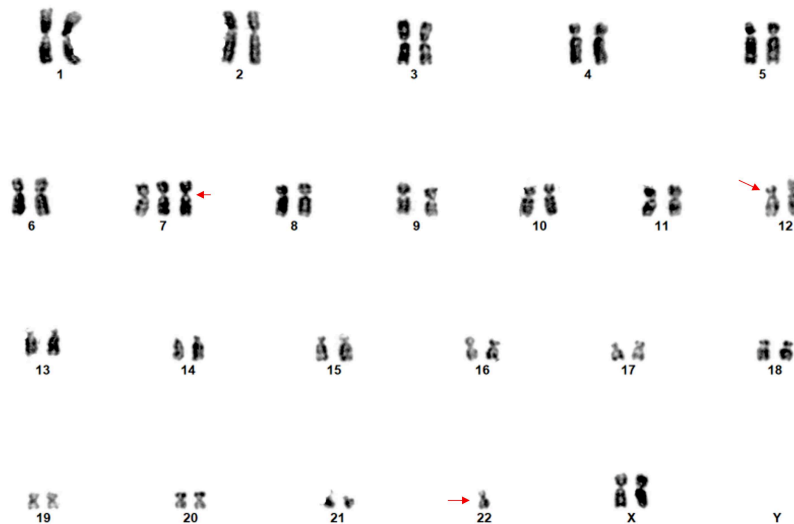


FIGURE 7 HepaRG karyotype. G-banded standard analysis for native HepaRG cell line showed a female karyotype with an additional chromosome 7, a structural abnormality on one chromosome 12, and a missing chromosome 22 (arrows).

A preliminary karyotype analysis was performed on native cryopreserved HepaRG cell line to study its characteristics. Standard analysis showed an abnormal karyotype with a supernumerary chromosome 7 of abnormal structure, and a derivative chromosome of a translocation between chromosome 12 and chromosome 22 resulting in the loss of chromosome 12 short arm (Figure 7). These results are in accordance with the previous description of the cell line: 46,XX,+del(7)(q11;q21)inv(7)(q21q36),-der22t(12;22)(p11;q11) (Gripon et al., 2002).

3.3.2 | CGH array (comparative genomic hybridization array)

Array-CGH was performed on native HepaRG cells to assess the breakpoints and associated losses or gains of these chromosomal abnormalities, but also to identify potentially cryptic imbalances elsewhere in the genome. In agreement with the karyotype and previous description ((Gripon et al., 2002)), array-CGH revealed a complete trisomy 7 (chr7:65,558-159,118,566, hg19) associated with an interstitial deletion 7q11.23q21.11 (chr7:73,265,298-79,725,034, hg19) of 6,45 Mb (Figure 8.a), and a monosomy 12p13.33p11.1 (chr12:194,249-34,360,030, hg19) of 34,16 Mb (Figure 8.b). An additional interstitial duplication 5q31.2q32 (chr5:138,139,653-149,283,415) of 11.14 Mb was observed (Figure 8.c).

3.3.3 | Impact of culture conditions on genomic stability

To evaluate the impact of culture conditions on cell genomic stability, we analyzed the karyotype and array-CGH of HepaRG cells after 6 days in acoustic levitation (n=3), low attachment (n=3) or 2D monolayers (n=3) followed by 7 days of 2D amplification, and compared the profile with native HepaRG cell line (n=1). This comparison revealed no relevant chromosomal abnormality, and no relevant copy number variation (CNV). These results indicated that cells had not undergone additional chromosomal alterations regardless of the culture protocol.

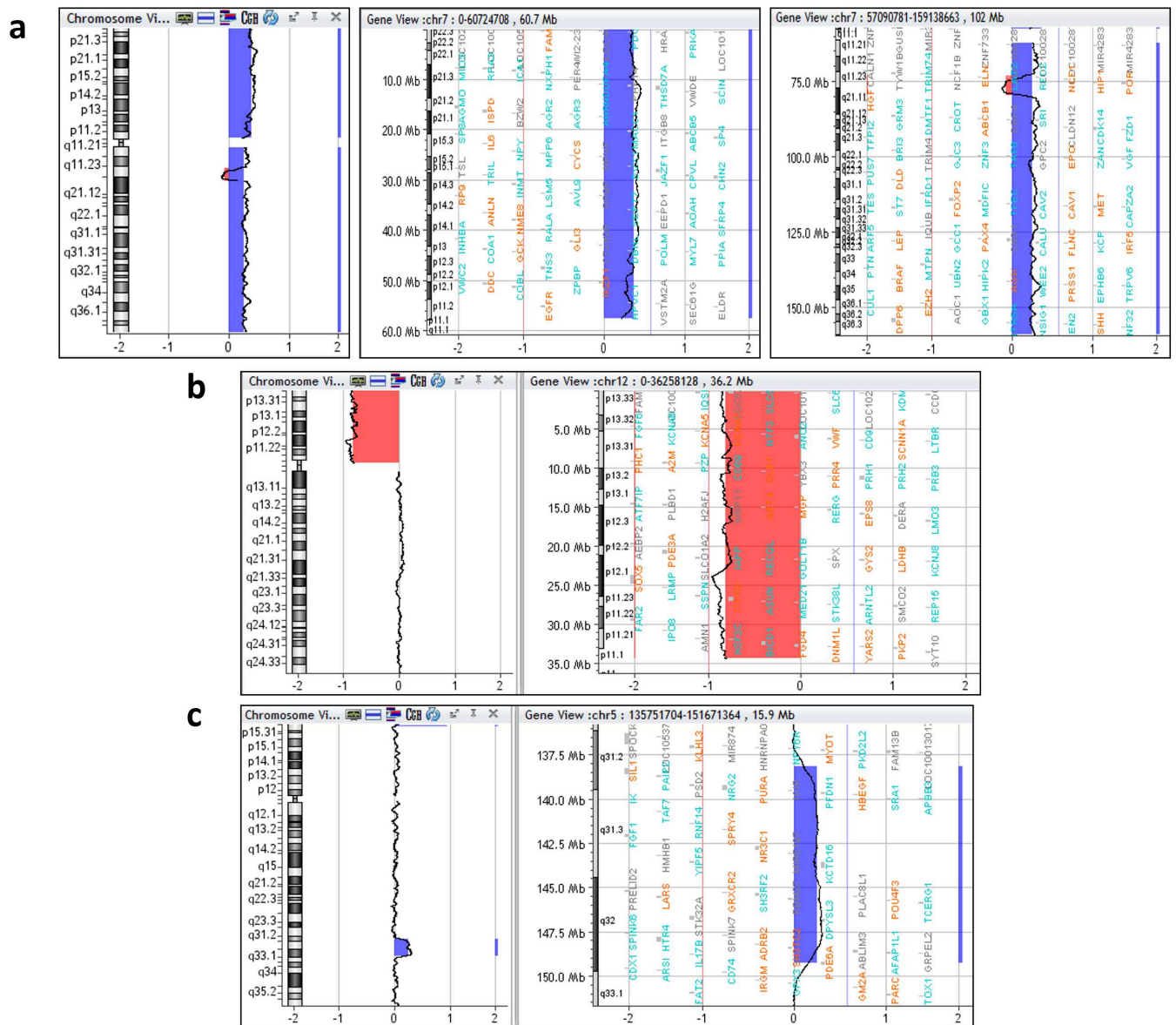


FIGURE 8 Array-CGH results on HepaRG genomic DNA. (a) Chromosome 7 profile with a complete trisomy and an interstitial deletion 7q11.23q21.11 of 6,45 Mb encompassing 49 RefSeq genes. View of whole chromosome 7 (left panel), short arm (middle panel), and long arm (right panel) ratio plots. (b) Chromosome 12 profile with a monosomy 12p of 34,16 Mb encompassing 329 RefSeq genes. View of whole chromosome 12 (left panel) and short arm (right panel) ratio plots. (c) Chromosome 5 profile with an interstitial duplication 5q31.2q32 of 11,14 Mb encompassing 148 RefSeq genes. View of whole chromosome 5 (left panel) and distal 5q region (right panel) ratio plots.

3.4 | Functionality study after 6 days of culture

3.4.1 | Readhesion and conservation of the bipotent potential

Readhesion on plastic and glass was assessed after 6 days of levitation (Fig. 9a). Proliferating cells showed an expected epithelial-like morphology (Fig. 9b), while confluent cells after two weeks of culture following levitation were differentiated into hepatocyte-like and cholangiocyte-like cells (Fig. 9c).

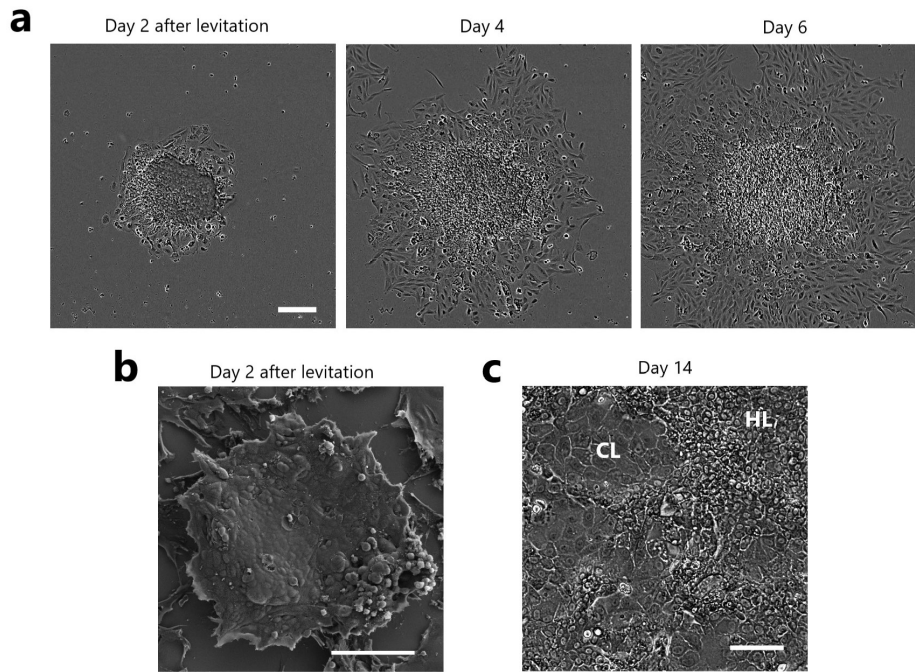


FIGURE 9 Readhesion of spheroids previously levitated during 6 days. a) Timelapse of readhesion in a plastic culture flask in an imaging system. Scale bar: 200 μm . b) Scanning electron microscopy after 2 days of readhesion on glass. Scale bar: 100 μm . c) Bipotent phenotype (CL: Cholangiocyte-like and HL: Hepatocyte-like) observed by optical microscopy 14 days after the end of the levitation (10X). Scale bar: 50 μm .

3.4.2 | External and internal morphology of the spheroids

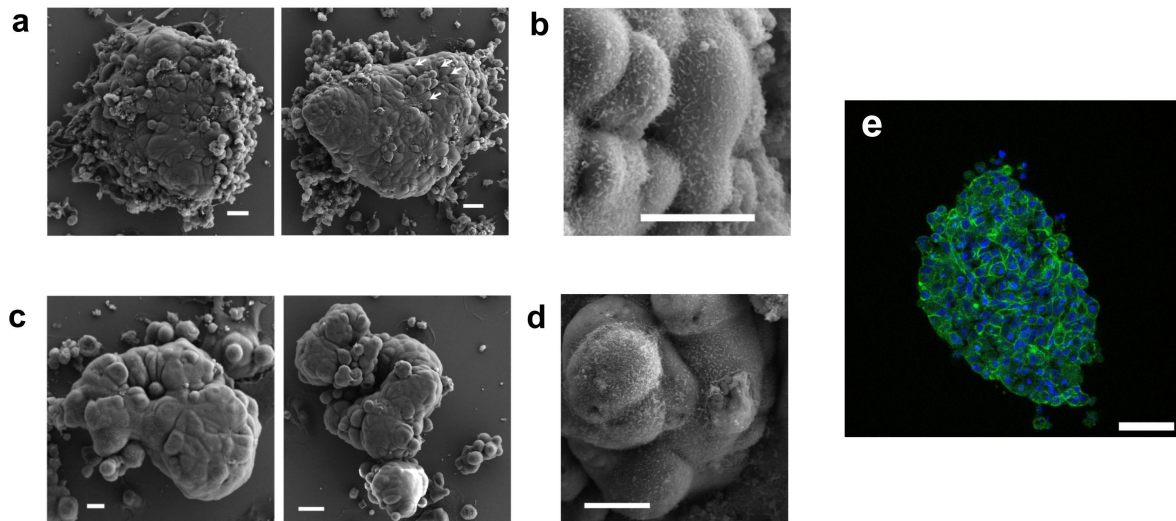


FIGURE 10 (a,b,c,d) Scanning electron microscopy of (a,b) levitated and (c,d) non-levitated spheroids. Scale bars: (a,c) 20 μm and (b,d) 2 μm . (e) Confocal microscopy of immunostaining of HepaRG spheroid sections (25 μm) after 6 days in levitation ; actin (green) and nuclei (blue). Scale bars: 50 μm .

Observation using scanning electron microscopy of the external morphology of spheroids revealed that levitated spheroids were more compact than non-levitated spheroids (Figure 10.a and c). Tight interactions were observed between adjacent cells. Micropores can be spotted (white arrow) at the surface of the levitated spheroid (Figure 10.a), suggesting the presence of apical biliary canaliculi, but not on the non-levitated spheroids (Figure 10.c). Micro-villi structures typical of hepatic cells were observed in both levitated and non-levitated spheroids (Figure 10.b and d).

Immunohistochemistry staining allowed the investigation of the internal organization of spheroids after 6 days of levitation. Levitated spheroids are dense, compact and actin is situated at the cortex of the HepaRG cells, as expected in a 3D configuration (Fig. 10.e).

3.4.3 | Polarity

A functional culture of hepatocytes in a 3D configuration forms bile canaliculi, in which bile is secreted. Bile secretion is dependent on the establishment of cell polarity. After 6 days of culture, apical polarity markers MRP2, MRP3 and BSEP were higher in 3D systems than in 2D monolayers after 6 days (Fig. 11.a). All the polarity markers are more important for levitated spheroids, in particular with a significant difference for MRP2.

MRP2, a transport protein marker of bile canaliculi, was also detected by immunostaining alongside the periphery of the levitated spheroids (Fig. 11.b and c), as well as intermittently inside the spheroids (Fig. 11.c, white arrows). The MRP2 staining revealed a polarized architecture with bile canaliculi-like structures, in particular in the outer layer of the spheroid.

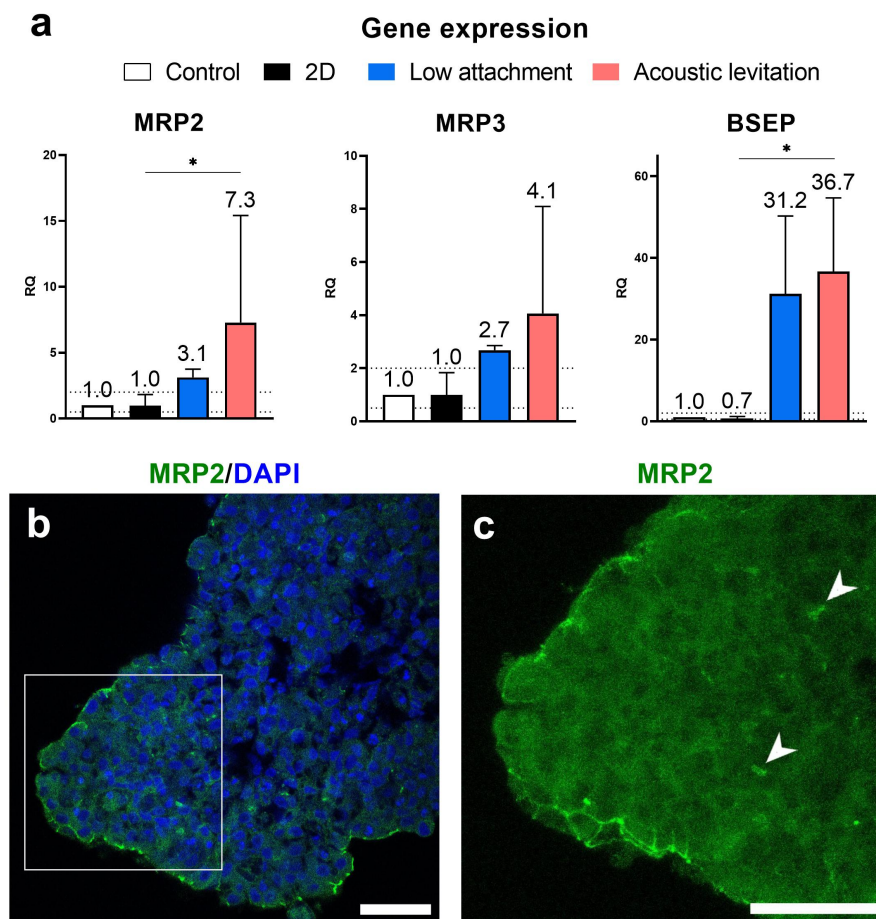


FIGURE 11 (a) Gene expression (RT-qPCR) of bile caniculi apical transporters MRP2, MRP3 and BSEP after 6 days of culture. All results were expressed as relative quantification (RQ) compared to one of the samples ("Control") cultivated during 6 days in 2D. Statistical test: t-test (n=3 for 2D, n=3 for levitation, n=2 for low attachment). (b,c) Immunostaining of HepaRG spheroids sections (25 μ m) after 6 days in levitation. MRP2 are green and nuclei are blue. The arrows indicate intraspheroidal MRP2 clusters. Scale bars: 50 μ m.

3.4.4 | Drug metabolism

The detoxification capacity of hepatocytes is dependent on the production of several nuclear receptors and CYP450 enzymes, which are correlated with their respective RNA synthesis. Regarding nuclear receptors, PXR and AHR expression was similar between all 6 days culture. CAR was significantly overexpressed in acoustic levitation compared to 2D cultures. CYP450 gene expression was globally higher in acoustic levitation compared to 2D and 3D controls during 6 days (Fig. 12.a). One can see that CYP3A4 and CYP1A2 are much higher for levitated spheroids compared to the three other cultures. The enzyme CYP3A4 was detected by immunostaining in some cells (in red in Fig. 12.b), in particular those situated in the center of the spheroids.

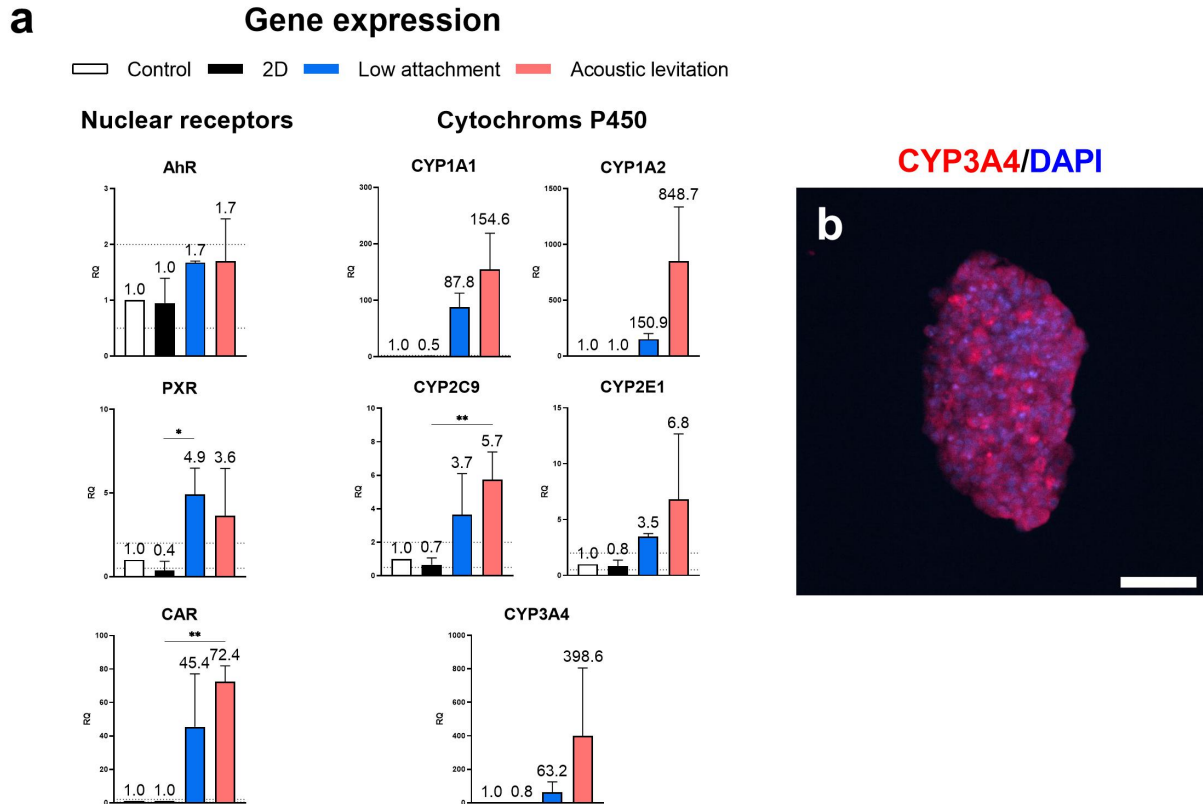


FIGURE 12 (a) Gene expression of nuclear receptors AHR, PXR and CAR, and cytochromes CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 and CYP3A4 after 6 days of culture. (b) Immunostaining of HepaRG spheroids sections (25 μm) after 6 days in levitation. CYP3A4 (red) and nuclei (blue). Scale bars: 50 μm .

3.4.5 | Albumin secretion and urea metabolism

Albumin and urea production are hallmarks of liver functionality. ALB and ARG1 genes (coding for a protein involved in the urea cycle) were very significantly overexpressed in levitated cultures after 6 days compared to control in 2D and also compared to low-attachment 3D cultures. Albumin was measured in supernatants (Fig. 13.b). Albumin was not detected in the supernatants of 2D cultures (initial seeding density: 1 million cells / flask) indicating an undifferentiated phenotype, but was present in 3D cultures supernatants (initial seeding density: 1 million cells / well or chip), suggesting the presence of confluence-induced hepatocyte-like cells. Albumin production was approximately four times higher in acoustic levitation than in low attachment showing that 3D cultures are clearly improved by the acoustic levitation.

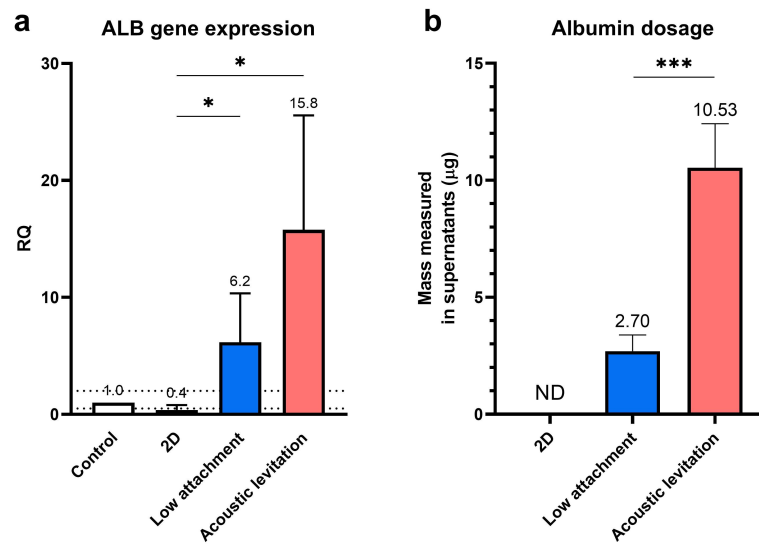


FIGURE 13 (a) Gene expression of nuclear receptors AHR, PXR and CAR, and cytochromes CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 and CYP3A4 after 6 days of culture. (b) Albumin dosage in supernatants after 6 days of culture (n=3 for low attachment and n=6 for acoustic levitation). The initial seeding density was 1 million cells/mL for all culture conditions.

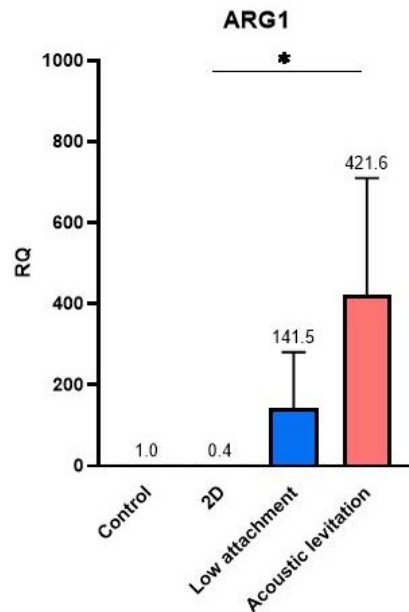


FIGURE 14 Gene expression of ARG1, after 6 days of culture.

4 | DISCUSSION

Our acoustofluidics device was first used as a tool to form rapidly cohesive spheroids, starting from an initial cell suspension. The formation of spheroids in acoustic levitation was comparable to the formation of spheroids in standard low attachment plates. In both methods of formation, cells were gently and rapidly put in close contact, thanks to acoustic manipulation or centrifugation respectively. Since initial conditions were alike and since further self-organization relied strongly on the cell type characteristics, it is coherent that levitated and non-levitated spheroids displayed

similar dynamics of formation. Nevertheless, a higher circularity is obtained in acoustic levitation, which might be explained by the influence of the transverse component of the ARF. The impact of this force has been reported in previous works (Coakley et al., 2004; Dumy et al., 2020).

Regarding reproducibility, our study highlighted a satisfactory homogeneity in shape and size of levitated spheroids. It is comparable to the reproducibility of spheroids formed in low attachment 96-well plates, a technique that is well-known for its reproducibility (Ramaiahgari et al., 2017). This standardization was pursued because it enhances the similarities between spheroids in functionality and responses to chemical or physical stimuli.

Spheroids obtained in acoustic levitation were rapidly cohesive, and remained this way even after interruption of the ultrasonic trapping. Long-term culture in acoustic levitation, up to 12 days, did not affect the cohesiveness of the spheroids, thus assuring biomimetic cell-cell interactions.

After validation of our system for the formation of spheroids, its benefits for long-term culture systems were evaluated. For this purpose, cell aggregates were kept in acoustic levitation during several days. Long-term acoustic levitation of cells had been previously reported for 24 hours maximum (Jeger-Madiot et al., 2021). Prolonged exposition to ultrasounds during 6 days brought specific concerns. Potential harmful side effects of ultrasounds are well known: temperature increase, creation of pores in the plasma membrane, shear stress, cell lysis or DNA damage (Wiklund, 2012; Du et al., 2022; N. N. Liu et al., 2018; Furusawa et al., 2014; Du et al., 2022). These effects are generally witnessed with high intensity ultrasounds. In our system, low intensity ultrasounds were used (voltage < 5 V and power < 0.1 W), that did not cause any cellular damage. Viability of levitated spheroids was excellent and comparable with 2D and 3D controls. Moreover we checked that the DNA was not damaged by the ultrasounds and that no chromosomal rearrangement could be found.

Subsequently, a functional study was performed on these viable and unharmed cells. The time span of 6 days in acoustic levitation was chosen for the functionality tests. While maturation of HepaRG cells in other culture systems often required 1 month of culture, we investigated if acoustic levitation could accelerate the process of HepaRG cell differentiation. We obtained functional and differentiated cells after only 6 days. This result is important for laboratory issues but also for the pharmaceutical industry in order to reduce costs but also to accelerate and facilitate preclinical research phases (Bai & Wang, 2020; Ko et al., 2022).

The readhesion and the differentiation into hepatocyte-like and cholangiocyte-like colonies, a unique feature of the HepaRG cell line (Guillouzo et al., 2007), were also observed after six days of culture in acoustic levitation.

The analysis of the external and internal morphology of the levitated spheroids revealed the expected features of functional hepatic spheroids. The observations in scanning electron microscopy showed some similarities between levitated and non-levitated spheroids, regarding cell compaction and microvilli. However only levitated spheroids exhibited the presence of apical biliary canaliculi. This morphology was analogous with observations of hepatic and HepaRG spheroids reported previously (Teng et al., 2021; Choi et al., 2020; Tzanakakis, Hansen, & Hu, 2001; Baimakhanov et al., 2018). Furthermore, immunostaining of cryosections of spheroids revealed that actin was located at the cortex of the levitated cells, which was akin to the position of actin in other 3D culture systems (Tzanakakis, Hsiao, et al., 2001; Leite et al., 2012), and in other acoustic levitation systems (J. Liu et al., 2007; G. Edwards et al., 2007; Kuznetsova et al., 2009). This rearrangement from stress fibers to actin cortex occurs rapidly when going from a 2D configuration to a 3D culture and is one of the indication of the establishment of cell polarity.

The cell polarity was further assessed by the study of the gene expression of various apical transporters, as well as immunostaining of the MRP2 bile canaliculi protein. The detection of bile canaliculi-like structures revealed the presence of differentiated HepaRG cells with an hepatocyte-like phenotype. It revealed the generation of polarized cells and the recapitulation of an *in vivo*-like tissue organization.

Functional characterization also indicated the establishment of a differentiated phenotype. The high gene expression of nuclear receptors and CYP450, as well as the presence of CYP3A4 indicated that levitated HepaRG spheroids might be more performant in drug metabolism studies than other HepaRG models. In order to confirm this, further investigations would be needed on cytochrome activities, both before and after induction by drugs (Gerets et al., 2012; Desai et al., 2017; Lübberstedt et al., 2011; Ehrlich et al., 2019; Mandon et al., 2019).

Lastly, albumin and urea secretion are key features of hepatocyte proteic production (Ehrlich et al., 2019; Lübberstedt et al., 2011). Albumin was detected in higher quantities in the supernatants of levitated spheroids. Moreover, albumin secretion was not observed at all in the supernatants of 2D monolayers, showing the importance of HepaRG cell confluence for the establishment of a mature hepatocyte-like phenotype. Albumin dosage were slightly lower than previously reported in other studies, which ranged between 5 and 20 $\mu\text{g} / 10^6$ cells / day (Lübberstedt et al., 2011; Ehrlich et al., 2019; Gunness et al., 2013). This may be due to the passive adsorption of albumin on PDMS (Schrott et al., 2009), which may lead to an underestimation of the albumin dosage in levitated samples (1.7 $\mu\text{g} / 10^6$ cells / day were measured). The other hallmark of hepatocyte functionality, urea production, is really low in HepaRG cells (Matsui & Shinozawa, 2021; Lübberstedt et al., 2011), and therefore was not detected in our supernatants. However, an increase in gene expression of ARG1 suggested that the urea cycle may be positively impacted by acoustic levitation.

In conclusion, no cellular or genetic damage was induced by our acoustofluidic method. Cells and spheroids morphologies were normal and very reproducible. A significant increase in hepatic functionality was observed compared to 2D and 3D controls. Therefore, we propose that this technique may be further investigated as a potential microphysiological system candidate for fundamental research, drug testing or cell therapy. Further research will be needed to investigate the response of levitated spheroids to drug treatments, their sensitivity to drug-induced toxicity,

and their CYP450 activity. This study on the tumoral HepaRG cell line paves the way to research on other cell types such as the gold standard primary hepatocytes.

Two main opportunities for hepatic spheroids have been identified (Prior et al., 2019; Au et al., 2014). Firstly, the pharmaceutical industry is in need of functional hepatic 3D models that could be used in preclinical studies. Such systems would be integrated in the drug development pipeline alongside 2D human cultures and animal models. The high sensibility of 3D models could be used in absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) studies to detect drug induced liver injuries (DILI) with accuracy. Their introduction in the pipeline could save several billions of dollar each year and accelerate the phase of preclinical studies (Ewart et al., 2022). Furthermore, hepatic spheroids could be used in cell therapy to remedy the shortage of suitable grafts for hepatic transplantation (Ten Dam et al., 2023). Proof-of-concept animal studies have already been conducted regarding bioartificial bioreactors and cell patches for the treatment of acute liver failure (Nagamoto et al., 2016; S. Chen et al., 2020). To date, the use of spheroids for pharmacotoxicology and cell therapy is still an emerging sector, and downstream users have not yet elected a preferred technique of culture. Levitated spheroids are hydrogel-free, increase the hepatic functionality, can integrate the co-culture of different cell types and are scalable, and would therefore be relevant for these applications.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.R., N.J., D.R.G., L.T., G.T., S.K., R.A., J.L., J-L.A. and L.A. conceived and planned the experiments. L.R., L.A., N.J., D.R.G., L.T., G.T., S.K., and R.A. performed the experiments. J-L.A. and J.L. supervised the project. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Biopredic International for having kindly provided the HepaRG cell line and also Niclas Setterblad and the Technological Core Facility of the Saint-Louis Research Institute, supported by grants from the University de Paris, the Conseil Regional d'Ile-de-France (Canceropôle), the National Cancer Research Institute (InCa), the Ministère de la Recherche, the Association Saint-Louis and the Association Jean Bernard, for their material and technical support. We thank Sabine Gerbal-Chaloin, Martine Daujat and Laurence Françoise for their implications in this study. We are grateful to Ecole Doctorale Frontières de l'Innovation en Recherche et Education (ED FIRE) – Programme Bettencourt, Université Paris-Cité for the funding of the L. Rabiet thesis. We also thank the Région Ile-de-France (DIM ELICIT) and the French National Research Agency (RHU program ANR-16-RHUS-0005) for providing financial support for this research.

FINANCIAL DISCLOSURE

None reported.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no potential conflict of interests.

REFERENCES

- Achilli, T.-M., Meyer, J., & Morgan, J. R. (2012, October). Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert opinion on biological therapy*, 12(10), 1347–1360. doi: 10.1517/14712598.2012.707181
- Au, S. H., Chamberlain, M. D., Mahesh, S., Sefton, M. V., & Wheeler, A. R. (2014, July). Hepatic organoids for microfluidic drug screening. *Lab on a Chip*, 14(17), 3290–3299. doi: 10.1039/C4LC00531G
- Bai, J., & Wang, C. (2020, April). Organoids and Microphysiological Systems: New Tools for Ophthalmic Drug Discovery. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 407. doi: 10.3389/fphar.2020.00407
- Baimakhanov, Z., Sakai, Y., Yamanouchi, K., Hidaka, M., Soyama, A., Takatsuki, M., & Eguchi, S. (2018). Spontaneous hepatocyte migration towards an endothelial cell tube network. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(3), e1767–e1771. doi: 10.1002/term.2577
- Baze, A., Parmentier, C., Hendriks, D. F., Hurrell, T., Heyd, B., Bachellier, P., ... Richert, L. (2018, September). Three-Dimensional Spheroid Primary Human Hepatocytes in Monoculture and Coculture with Nonparenchymal Cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 24(9), 534–545. doi: 10.1089/ten.tec.2018.0134
- Bazou, D. (2010, April). Biochemical properties of encapsulated high-density 3-D HepG2 aggregates formed in an ultrasound trap for application in hepatotoxicity studies: Biochemical responses of encapsulated 3-D HepG2 aggregates. *Cell Biology and Toxicology*, 26(2), 127–141. doi: 10.1007/s10565-009-9123-0
- Beckwitt, C. H., Clark, A. M., Wheeler, S., Taylor, D. L., Stolz, D. B., Griffith, L., & Wells, A. (2018, February). Liver 'organ on a chip'. *Experimental Cell Research*, 363(1), 15–25. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.12.023
- Bell, C. C., Dankers, A. C. A., Lauschke, V. M., Sison-Young, R., Jenkins, R., Rowe, C., ... Ingelman-Sundberg, M. (2018, April). Comparison of Hepatic 2D Sandwich Cultures and 3D Spheroids for Long-term Toxicity Applications: A Multicenter Study. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 162(2), 655–666. doi: 10.1093/toxsci/kfx289

- Bock, C., Boutros, M., Camp, J. G., Clarke, L., Clevers, H., Knoblich, J. A., ... Vries, R. G. J. (2021, January). The Organoid Cell Atlas. *Nature Biotechnology*, 39(1), 13–17. doi: 10.1038/s41587-020-00762-x
- Chen, B., Wu, Y., Ao, Z., Cai, H., Nunez, A., Liu, Y., ... Guo, F. (2019). High-throughput acoustofluidic fabrication of tumor spheroids. *Lab on a Chip*, 19(10), 1755–1763. doi: 10.1039/C9LC00135B
- Chen, S., Wang, J., Ren, H., Liu, Y., Xiang, C., Li, C., ... Shi, X. (2020, January). Hepatic spheroids derived from human induced pluripotent stem cells in bio-artificial liver rescue porcine acute liver failure. *Cell Research*, 30(1), 95–97. doi: 10.1038/s41422-019-0261-5
- Choi, Y. Y., Seok, J.-I., & Kim, D.-S. (2020, January). Flow-Based Three-Dimensional Co-Culture Model for Long-Term Hepatotoxicity Prediction. *Micromachines*, 11(1), 36. doi: 10.3390/mi11010036
- Christofferson, J., & Mandenius, C.-F. (2019). Using a Microfluidic Device for Culture and Drug Toxicity Testing of 3D Cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1994, 235–241. doi: 10.1007/978-1-4939-9477-9_2
- Clevers, H., Lancaster, M., & Takebe, T. (2017, June). Advances in Organoid Technology. *Cell Stem Cell*, 20(6), 759–762. doi: 10.1016/j.stem.2017.05.014
- Coakley, W. T., Bazou, D., Morgan, J., Foster, G. A., Archer, C. W., Powell, K., ... Bishop, J. (2004, April). Cell–cell contact and membrane spreading in an ultrasound trap. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 34(4), 221–230. doi: 10.1016/j.colsurfb.2004.01.002
- Desai, P. K., Tseng, H., & Souza, G. R. (2017, May). Assembly of Hepatocyte Spheroids Using Magnetic 3D Cell Culture for CYP450 Inhibition/Induction. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 1085. doi: 10.3390/ijms18051085
- Dron, O., & Aider, J.-L. (2013, September). Varying the agglomeration position of particles in a micro-channel using Acoustic Radiation Force beyond the resonance condition. *Ultrasonics*, 53(7), 1280–1287. doi: 10.1016/j.ultras.2013.03.012
- Du, M., Li, Y., Zhang, Q., Zhang, J., Ouyang, S., & Chen, Z. (2022, June). The impact of low intensity ultrasound on cells: Underlying mechanisms and current status. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2022.06.004
- Dumy, G., Jeger-Madiot, N., Benoit-Gonin, X., Mallouk, T. E., Hoyos, M., & Aider, J.-L. (2020, December). Acoustic Manipulation of Dense Nanorods in Microgravity. *Microgravity Science and Technology*, 32(6), 1159–1174. doi: 10.1007/s12217-020-09835-7
- Edwards, G., Bazou, D., Kuznetsova, L., & Coakley, W. (2007, March). Stable HepG2 aggregates formed by levitation in an ultrasound standing wave trap: Cell adhesion dynamics and cytoskeletal reorganisation. *Toxicology*, 231(2-3), 101–102. doi: 10.1016/j.tox.2006.11.025
- Edwards, G. O., Bazou, D., Kuznetsova, L. A., & Coakley, W. T. (2007). Cell adhesion dynamics and actin cytoskeleton reorganization in HepG2 cell aggregates. *Cell Communication & Adhesion*, 14(1), 9–20. doi: 10.1080/15419060701224849
- Ehrlich, A., Duche, D., Ouedraogo, G., & Nahmias, Y. (2019, June). Challenges and Opportunities in the Design of Liver-on-Chip Microdevices. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 21, 219–239. doi: 10.1146/annurev-bioeng-060418-052305
- Ewart, L., Apostolou, A., Briggs, S. A., Carman, C. V., Chaff, J. T., Heng, A. R., ... Levner, D. (2022, December). Performance assessment and economic analysis of a human Liver-Chip for predictive toxicology. *Communications Medicine*, 2(1), 1–16. doi: 10.1038/s43856-022-00209-1
- Furusawa, Y., Hassan, M. A., Zhao, Q.-L., Ogawa, R., Tabuchi, Y., & Kondo, T. (2014, November). Effects of therapeutic ultrasound on the nucleus and genomic DNA. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2061–2068. doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.02.028
- Garcia-Sabaté, A., Castro, A., Hoyos, M., & González-Cinca, R. (2014, March). Experimental study on inter-particle acoustic forces. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 135(3), 1056–1063. doi: 10.1121/1.4864483
- Gerets, H. H. J., Tilmant, K., Gerin, B., Chanteux, H., Depelchin, B. O., Dhalluin, S., & Atienzar, F. A. (2012, April). Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biology and Toxicology*, 28(2), 69–87. doi: 10.1007/s10565-011-9208-4
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., ... Guguen-Guillouzo, C. (2002, November). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15655–15660. doi: 10.1073/pnas.232137699
- Guguen-Guillouzo, C., & Guillouzo, A. (2010). General Review on In Vitro Hepatocyte Models and Their Applications. In P. Maurel (Ed.), *Hepatocytes: Methods and Protocols* (pp. 1–40). Totowa, NJ: Humana Press. doi: 10.1007/978-1-60761-688-7_1
- Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., & Guguen-Guillouzo, C. (2007, May). The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions*, 168(1), 66–73. doi: 10.1016/j.cbi.2006.12.003
- Gunness, P., Mueller, D., Shevchenko, V., Heinzle, E., Ingelman-Sundberg, M., & Noor, F. (2013, May). 3D Organotypic Cultures of Human HepaRG Cells: A Tool for In Vitro Toxicity Studies. *Toxicological Sciences*, 133(1), 67–78. doi: 10.1093/toxsci/kft021
- Jain, R. K., Au, P., Tam, J., Duda, D. G., & Fukumura, D. (2005, July). Engineering vascularized tissue. *Nature Biotechnology*, 23(7), 821–823. doi: 10.1038/nbt0705-821
- Jarvinen, E., Hammer, H. S., Potz, O., Ingelman-Sundberg, M., & Stage, T. B. (2022, November). 3D Spheroid Primary Human Hepatocytes for Prediction of Cytochrome P450 and Drug Transporter Induction. bioRxiv. doi: 10.1101/2022.10.30.514199
- Jeger-Madiot, N., Arakelian, L., Setterblad, N., Bruneval, P., Hoyos, M., Larghero, J., & Aider, J.-L. (2021, April). Self-organization and culture of

- Mesenchymal Stem Cell spheroids in acoustic levitation. *Scientific Reports*, 11(1), 8355. doi: 10.1038/s41598-021-87459-6
- Jeger-Madiot, N., Mousset, X., Dupuis, C., Rabiet, L., Hoyos, M., Peyrin, J.-M., & Aider, J.-L. (2022, June). Controlling the force and the position of acoustic traps with a tunable acoustofluidic chip: Application to spheroid manipulations. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 151(6), 4165. doi: 10.1121/10.0011464
- Kamalian, L., Douglas, O., Jolly, C. E., Snoeys, J., Simic, D., Monshouwer, M., ... Chadwick, A. E. (2018, December). The utility of HepaRG cells for bioenergetic investigation and detection of drug-induced mitochondrial toxicity. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 53, 136–147. doi: 10.1016/j.tiv.2018.08.001
- Kanebratt, K. P., & Andersson, T. B. (2008, January). HepaRG cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction in humans. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 36(1), 137–145. doi: 10.1124/dmd.107.017418
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., ... Lamperska, K. (2018, June). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science : AMS*, 14(4), 910–919. doi: 10.5114/aoms.2016.63743
- Khedr, M. M. S., Messaoudi, W., Jonnalagadda, U. S., Abdelmotelb, A. M., Glynn-Jones, P., Hill, M., ... Hilal, M. A. (2019, January). Generation of functional hepatocyte 3D discoids in an acoustofluidic bioreactor. *Biomicrofluidics*, 13(1), 014112. doi: 10.1063/1.5082603
- Ko, J., Park, D., Lee, S., Gumuscu, B., & Jeon, N. L. (2022, August). Engineering Organ-on-a-Chip to Accelerate Translational Research. *Micromachines*, 13(8), 1200. doi: 10.3390/mi13081200
- Kuznetsova, L. A., Bazou, D., Edwards, G. O., & Coakley, W. T. (2009, May). Multiple three-dimensional mammalian cell aggregates formed away from solid substrata in ultrasound standing waves. *Biotechnology Progress*, 25(3), 834–841. doi: 10.1002/btpr.164
- Lauschke, V. M., Shafagh, R. Z., Hendriks, D. F. G., & Ingelman-Sundberg, M. (2019). 3D Primary Hepatocyte Culture Systems for Analyses of Liver Diseases, Drug Metabolism, and Toxicity: Emerging Culture Paradigms and Applications. *Biotechnology Journal*, 14(7), 1800347. doi: 10.1002/biot.201800347
- Leite, S. B., Wilk-Zasadna, I., Zaldivar, J. M., Airola, E., Reis-Fernandes, M. A., Mennecozzi, M., ... Coecke, S. (2012, November). Three-Dimensional HepaRG Model As An Attractive Tool for Toxicity Testing. *Toxicological Sciences*, 130(1), 106–116. doi: 10.1093/toxsci/kfs232
- Le Vee, M., Jigorel, E., Glaise, D., Gripon, P., Guguen-Guillouzo, C., & Fardel, O. (2006, May). Functional expression of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporters in the differentiated human hepatoma HepaRG cell line. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 28(1-2), 109–117. doi: 10.1016/j.ejps.2006.01.004
- Liu, J., Kuznetsova, L. A., Edwards, G. O., Xu, J., Ma, M., Purcell, W. M., ... Coakley, W. T. (2007). Functional three-dimensional HepG2 aggregate cultures generated from an ultrasound trap: Comparison with HepG2 spheroids. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102(5), 1180–1189. doi: 10.1002/jcb.21345
- Liu, M., Xiang, Y., Yang, Y., Long, X., Xiao, Z., Nan, Y., ... Ai, K. (2022, December). State-of-the-art advancements in Liver-on-a-chip (LOC): Integrated biosensors for LOC. *Biosensors and Bioelectronics*, 218, 114758. doi: 10.1016/j.bios.2022.114758
- Liu, N. N., Cui, Y. D., Khoo, B. C., & Zhang, A. M. (2018, November). Damage characteristics of elastic material through a thin membrane using high-intensity focused ultrasound (HIFU). *AIP Advances*, 8(11), 115123. doi: 10.1063/1.5050432
- Lübberstedt, M., Müller-Vieira, U., Mayer, M., Biemel, K. M., Knöspel, F., Knobloch, D., ... Zeilinger, K. (2011, January). HepaRG human hepatic cell line utility as a surrogate for primary human hepatocytes in drug metabolism assessment in vitro. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 63(1), 59–68. doi: 10.1016/j.vascn.2010.04.013
- Mandon, M., Huet, S., Dubreil, E., Fessard, V., & Le Hégarat, L. (2019, July). Three-dimensional HepaRG spheroids as a liver model to study human genotoxicity in vitro with the single cell gel electrophoresis assay. *Scientific Reports*, 9(1), 10548. doi: 10.1038/s41598-019-47114-7
- Matsui, T., & Shinozawa, T. (2021). Human Organoids for Predictive Toxicology Research and Drug Development. *Frontiers in Genetics*, 12, 767621. doi: 10.3389/fgene.2021.767621
- Mayati, A., Moreau, A., Le Vée, M., Bruyère, A., Jouan, E., Denizot, C., ... Fardel, O. (2018, October). Functional polarization of human hepatoma HepaRG cells in response to forskolin. *Scientific Reports*, 8(1), 16115. doi: 10.1038/s41598-018-34421-8
- Meirinho, S., Rodrigues, M., Fortuna, A., Falcão, A., & Alves, G. (2022, August). Study of the metabolic stability profiles of peramppanel, rifinamide and stiripentol and prediction of drug interactions using HepaRG cells as an in vitro human model. *Toxicology in Vitro*, 82, 105389. doi: 10.1016/j.tiv.2022.105389
- Nagamoto, Y., Takayama, K., Ohashi, K., Okamoto, R., Sakurai, F., Tachibana, M., ... Mizuguchi, H. (2016, May). Transplantation of a human iPSC-derived hepatocyte sheet increases survival in mice with acute liver failure. *Journal of Hepatology*, 64(5), 1068–1075. doi: 10.1016/j.jhep.2016.01.004
- Prior, N., Inacio, P., & Huch, M. (2019, July). Liver organoids: From basic research to therapeutic applications. *Gut*, 68, gutjnl-2019. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319256
- Ramaiahgari, S. C., Waidyanatha, S., Dixon, D., DeVito, M. J., Paules, R. S., & Ferguson, S. S. (2017, September). From the Cover: Three-Dimensional (3D) HepaRG Spheroid Model With Physiologically Relevant Xenobiotic Metabolism Competence and Hepatocyte Functionality for Liver Toxicity

- Screening. *Toxicological Sciences*, 159(1), 124–136. doi: 10.1093/toxsci/kfx122
- Ramos, P., Carvalho, M. R., Chen, W., Yan, L.-P., Zhang, C.-H., He, Y.-l., ... Oliveira, J. M. (2023, April). Microphysiological systems to study colorectal cancer: State-of-the-art. *Biofabrication*, 15(3), 032001. doi: 10.1088/1758-5090/acc279
- Rossi, G., Manfrin, A., & Lutolf, M. P. (2018, November). Progress and potential in organoid research. *Nature Reviews Genetics*, 19(11), 671–687. doi: 10.1038/s41576-018-0051-9
- Sasikumar, S., Chameettachal, S., Kingshott, P., Cromer, B., & Pati, F. (2020, July). 3D hepatic mimics – the need for a multicentric approach. *Biomedical Materials*, 15(5), 052002. doi: 10.1088/1748-605X/ab971c
- Schrott, W., Slouka, Z., Červenka, P., Ston, J., Nebyla, M., Přibyl, M., & Šnita, D. (2009, October). Study on surface properties of PDMS microfluidic chips treated with albumin. *Biomicrofluidics*, 3(4), 044101. doi: 10.1063/1.3243913
- Skardal, A., Shupe, T., & Atala, A. (2016, September). Organoid-on-a-chip and body-on-a-chip systems for drug screening and disease modeling. *Drug Discovery Today*, 21(9), 1399–1411. doi: 10.1016/j.drudis.2016.07.003
- Tait, A., Glynn-Jones, P., Hill, A. R., Smart, D. E., Blume, C., Hammarstrom, B., ... Davies, D. E. (2019, July). Engineering multi-layered tissue constructs using acoustic levitation. *Scientific Reports*, 9(1), 9789. doi: 10.1038/s41598-019-46201-z
- Takahashi, Y., Hori, Y., Yamamoto, T., Urashima, T., Ohara, Y., & Tanaka, H. (2015, May). 3D spheroid cultures improve the metabolic gene expression profiles of HepaRG cells. *Bioscience Reports*, 35(3), e00208. doi: 10.1042/BSR20150034
- Ten Dam, M. J. M., Frederix, G. W. J., Ten Ham, R. M. T., van der Laan, L. J. W., & Schneeberger, K. (2023, February). Toward Transplantation of Liver Organoids: From Biology and Ethics to Cost-effective Therapy. *Transplantation*. doi: 10.1097/TP.0000000000004520
- Teng, Y., Zhao, Z., Tasnim, F., Huang, X., & Yu, H. (2021, August). A scalable and sensitive steatosis chip with long-term perfusion of in situ differentiated HepaRG organoids. *Biomaterials*, 275, 120904. doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.120904
- Tevlek, A., Kecili, S., Ozcelik, O. S., Kulah, H., & Tekin, H. C. (2023, January). Spheroid Engineering in Microfluidic Devices. *ACS Omega*. doi: 10.1021/acsomega.2c06052
- Tzanakakis, E. S., Hansen, L. K., & Hu, W.-S. (2001). The role of actin filaments and microtubules in hepatocyte spheroid self-assembly. *Cell Motility*, 48(3), 175–189. doi: 10.1002/1097-0169(200103)48:3<175::AID-CM1007>3.0.CO;2-2
- Tzanakakis, E. S., Hsiao, C.-C., Matsushita, T., Rimmel, R. P., & Hu, W.-S. (2001, April). Probing Enhanced Cytochrome P450 2B1/2 Activity in Rat Hepatocyte Spheroids through Confocal Laser Scanning Microscopy. *Cell Transplantation*, 10(3), 329–342. doi: 10.3727/000000001783986783
- Vorriink, S. U., Ullah, S., Schmidt, S., Nandania, J., Velagapudi, V., Beck, O., ... Lauschke, V. M. (2017, June). Endogenous and xenobiotic metabolic stability of primary human hepatocytes in long-term 3D spheroid cultures revealed by a combination of targeted and untargeted metabolomics. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(6), 2696–2708. doi: 10.1096/fj.201601375R
- Whitworth, G., & Coakley, W. T. (1992, January). Particle column formation in a stationary ultrasonic field. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 91(1), 79–85. doi: 10.1121/1.402622
- Wiklund, M. (2012). Acoustofluidics 12: Biocompatibility and cell viability in microfluidic acoustic resonators. *Lab on a Chip*, 12(11), 2018–2028. doi: 10.1039/C2LC40201G
- Woodside, S. M. (1998). *Spatial distribution of acoustic forces on particles : Implications for particle separation and resonator design* (Doctoral dissertation, University of British Columbia). doi: 10.14288/1.0058627
- Woodside, S. M., Bowen, B. D., & Piret, J. M. (1997). Measurement of ultrasonic forces for particle–liquid separations. *AIChE Journal*, 43(7), 1727–1736. doi: 10.1002/aic.690430710
- Yosioka, K., & Kawasima, Y. (1955, January). Acoustic radiation pressure on a compressible sphere. *Acta Acustica united with Acustica*, 5(3), 167–173. online version of the article at the publisher's website.

ÉTUDES EXPLORATOIRES COMPLÉMENTAIRES

9.1	Lévitiation d'hépatocytes primaires cryopréservés	109
9.1.1	Matériels et méthodes	109
9.1.2	Résultats	109
9.1.3	Discussion	110
9.2	Optimisation et étude de la coculture entre cellules HepaRG et HU- VEC	111
9.2.1	Matériels et méthodes	111
9.2.2	Résultats	111
9.2.3	Discussion	112
9.3	Imagerie confocale en temps réel de l'auto-organisation	113
9.3.1	Matériels et méthodes	113
9.3.2	Résultats	114
9.3.3	Discussion	115
9.4	Conclusion du chapitre	115

En supplément des pistes de recherche abordées dans les deux articles ci-avant, des recherches complémentaires ont été réalisées. Tout d’abord, la faisabilité de la lévitation acoustique a été étudiée pour un nouveau type cellulaire : les hépatocytes primaires, la référence inégalée (*gold standard*) pour la culture d’hépatocytes *in vitro*. Ensuite, la coculture de cellules HepaRG et d’HUVEC a été explorée plus en détail pour comprendre les interactions entre les types cellulaires. Enfin, l’étude de l’auto-organisation en lévitation acoustique a été complétée par de l’imagerie confocale en temps réel.

9.1 Lévitation d’hépatocytes primaires cryopréservés

9.1.1 Matériels et méthodes

Des hépatocytes primaires (issus du lot HUM4125 ou du lot LHuf17905A, Biopredic) ont été décongelés dans 40 mL de milieu de décongélation (OneStep PHep Thawing medium MIL130C, Biopredic). Une partie des cellules a été immédiatement marquée au LIVE/DEAD (LIVE/DEAD mammalian viability kit, Montluçon, France) pour évaluation de la viabilité cellulaire au cytomètre (Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer). La culture en lévitation a été réalisée dans du milieu hépatique (*basal hepatic cell medium*, Biopredic) complétement (1,6 mL de *additives for hepatocyte culture medium* ADD221044 pour 100 mL). Les agrégats en lévitation ont été observés par des Dino-Lite Pro 630-1165 USB portable Microscopes (Dinolite company, Taipei, Taiwan), et leur circularité (σ) a été calculée grâce au logiciel ImageJ. La circularité a été définie de la manière suivante :

$$\sigma = 4\pi \frac{A_r}{P_e^2} \quad (9.1)$$

avec A_r l’aire du sphéroïde et P_e son périmètre. Par définition, $\sigma = 1$ correspond à un objet parfaitement circulaire, alors que $\sigma = 0$ est un feuillet cellulaire plan.

Après lévitation, les hépatocytes primaires formaient des discoïdes cohésifs, ce qui suggère. Ces derniers ont été déposés dans des plaques de culture 12 puits avec un revêtement (*coating*) de collagène (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et observés dans un système d’imagerie Incucyte S3 (Sartorius).

9.1.2 Résultats

Les hépatocytes primaires ont pu être mis en lévitation pendant plusieurs jours (Fig. 9.1.a). Au cours des six jours de culture, leur circularité était inférieure à celle des cellules HepaRG (Fig. 9.1.b). Cette lente dynamique d’auto-organisation peut être expliquée par leur faible contractilité (TASCHER *et al.*, 2019 ; ROCKEY, HOUSSET et FRIEDMAN, 1993). À la fin des six jours de culture, la viabilité des hépatocytes primaires était assez faible (moyenne proche de 50%) et très variable d’une répétition à une autre (Fig. 9.1.c). Une forte mortalité peut par-

fois s'expliquer par des disparités initiales entre lots de cellules (EHRlich *et al.*, 2019), mais la viabilité évaluée immédiatement après décongélation était ici supérieure à 90% lors des trois répétitions. La viabilité finale ne peut donc être attribuée qu'à la réponse des cellules à la lévitation acoustique. Il est à noter que la réadhésion de sphéroïdes sur une plaque avec un revêtement de collagène a été observée (Fig. 9.1.d). Les hépatocytes primaires ne perdent donc pas leur capacité d'adhésion après six jours de lévitation acoustique.

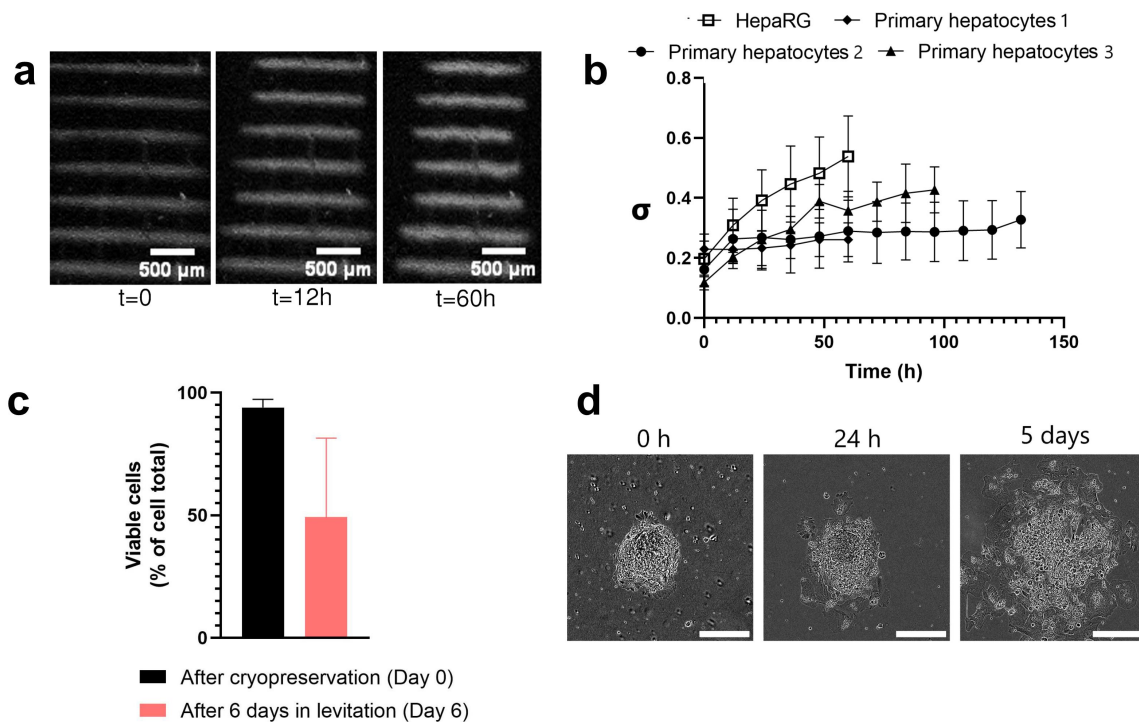


FIGURE 9.1 – a) Vue de côté des 60 premières heures de lévitation acoustique d'agrégats de cellules d'hépatocytes primaires humains cryopréservés; barres d'échelle : 500 μm , b) Évolution de la circularité (σ) au cours de la culture dans trois puces contenant des hépatocytes primaires et dans une puce avec des cellules HepaRG; lévitations n° 1 et 2 : lot HUM4125; lévitation n°3 : lot LHuf17905A, c) Viabilité cellulaire des cellules issues de ces trois lévitations après dissociation puis marquage LIVE/DEAD, d) Réadhésion d'un sphéroïde d'hépatocytes primaires HUM4125 sur une plaque de culture recouverte de collagène, après six jours de lévitation; barre d'échelle : 200 μm .

9.1.3 Discussion

La viabilité cellulaire et la dynamique d'auto-organisation des hépatocytes lévités variaient extrêmement d'une réplique biologique à une autre. Ces deux valeurs n'étaient cependant pas corrélées, ce qui ne permet pas d'établir une causalité entre l'une et l'autre. Nous préconisons dans un premier temps de répliquer ces expériences pour caractériser et comprendre ces disparités, puis d'effectuer des adaptations de protocole pour préserver la

viabilité cellulaire.

9.2 Optimisation et étude de la coculture entre cellules HepaRG et HUVEC

9.2.1 Matériels et méthodes

Le protocole de culture des cocultures de cellules HepaRG et HUVEC a été décrit dans l'article *Acoustic levitation as a tool for cell-driven self-organization of human cell spheroids during long-term 3D culture*.

Les marquages du cytoplasme cellulaire des cellules en culture 2D ont été réalisés avec Incucyte® Cytolight Rapid Green (0,3 μM) (Sartorius) pour le marquage vert, et avec Incucyte® Cytolight Rapid Red (300 μM) (Sartorius) pour le marquage rouge. La concentration de marqueurs a préalablement été optimisée pour ne pas affecter la viabilité cellulaire. Avec les concentrations utilisées, le marquage vert n'est plus détectable après quelques heures, il ne sert qu'à vérifier initialement la présence des deux types cellulaires et l'absence de cellules non marquées. Le marqueur rouge, au contraire, reste visible pendant les six jours de culture.

Après lévitation, les sphéroïdes ont été dissociés par un traitement avec 0,25% trypsine + acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) (Gibco, UK) pendant 15 min. Ils ont ensuite été étudiés en cytométrie en flux pour détecter la présence du marqueur de cellules endothéliales CD105 ou endogline, une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans l'angiogénèse. Le marquage a été réalisé avec un anticorps anti-CD105-PE (numéro cat : 560839, BD) (2%) pendant 30 min à 4°C. Après rinçage au PBS, les cellules ont été analysées au cytomètre Attune NxT Invitrogen.

9.2.2 Résultats

Peu d'informations sont données dans les sections "matériels et méthodes" des publications scientifiques sur les cocultures de cellules HepaRG et HUVEC. À notre connaissance, il n'existe pas de protocole standard pour ce type de coculture. Des tests d'optimisation ont donc dû être réalisés pour trouver la composition optimale du milieu de coculture (Fig. 9.2). Le milieu donnant le meilleur résultat dans notre étude est un mélange de 80% de milieu EGM2 et 20% de milieu HepaRG supplémenté.

À la suite de cette première exploration, une étude de la composition de la coculture a été menée. Une culture en 2D a été réalisée avec un ensemencement de 50% de chaque type cellulaire. Le suivi par marquage fluorescent des mouvements et du positionnement des types cellulaires en culture monocouche a révélé une organisation non aléatoire (Fig. 9.3.a).

Les cellules HUVEC se regroupent en amas resserrés au cours du temps. Après six jours de culture 2D, les deux types cellulaires sont viables (Fig. 9.3.b). Une suspension cellulaire composée à 50% des deux types cellulaires a pu être maintenue en lévitation pendant six jours (Fig. 9.3.c). La proportion de cellules HUVEC au sein de la coculture a été évaluée grâce au marqueur endothélial CD105 (Fig. 9.3.d). La proportion de cellules CD105+ au sein de la coculture avait baissé de 47.1% à 15.1% entre le début et la fin de la lévitation, ce qui met en évidence un changement de répartition des types cellulaires.

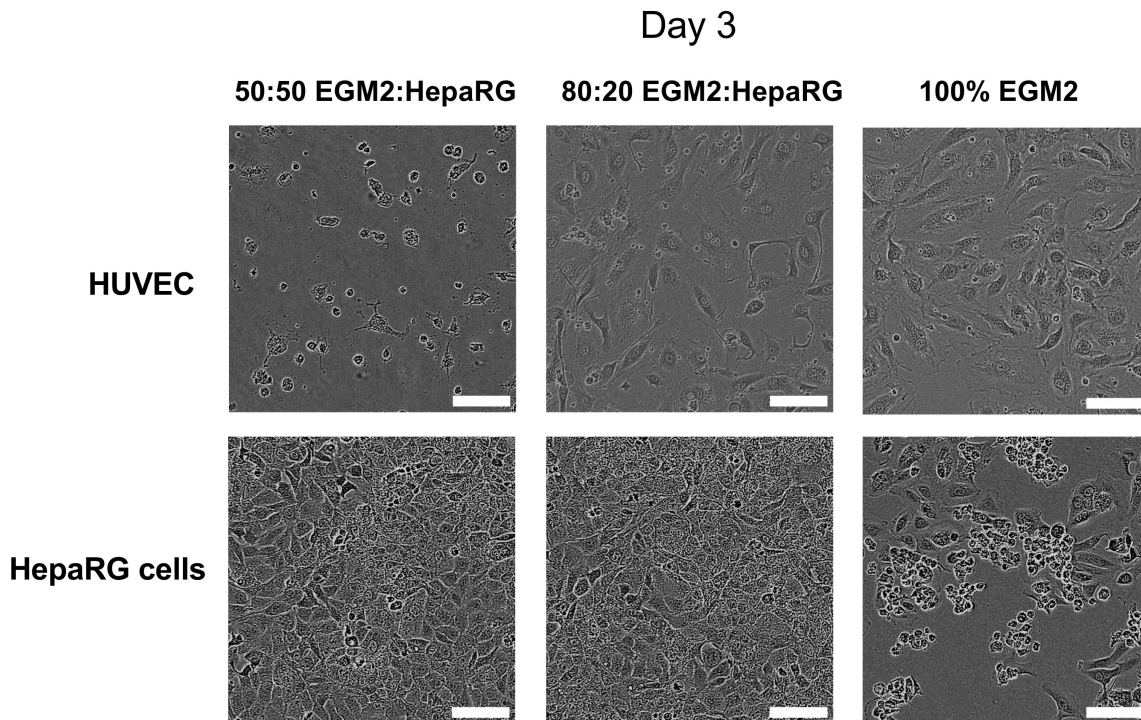


FIGURE 9.2 – Test d’optimisation du milieu de culture avec différentes proportions de milieu endothélial EGM2 et de milieu hépatique HepaRG; seule la condition 80% de milieu EGM2 et 20% de milieu HepaRG permet la survie et la prolifération pendant trois jours des deux types cellulaires cultivés individuellement. Barre d’échelle : 200 μ m.

9.2.3 Discussion

La coculture de deux types cellulaires doit être optimisée de manière précise. Les conditions de culture (milieu, ensemencement, micro-environnement) doivent permettre la viabilité et la bonne fonctionnalité (pas de manifestation de stress cellulaire, bonne prolifération) de chacun des types cellulaires. Les paramètres de coculture définis dans notre étude préservent la viabilité cellulaire de monocultures de cellules HepaRG et HUVEC. Lorsqu’elles sont mises en coculture en lévitation (ensemencement à 50% d’HUVEC et 80% d’EGM2 dans le milieu de coculture), on observe néanmoins que la proportion d’HUVEC diminue

au cours de la lévitation acoustique. De même, en 2D, les cellules HUVEC occupent une surface moindre que les cellules HepaRG à la fin de la culture, ce qui pourrait indiquer une diminution similaire. Cela pourrait être dû à une prolifération moindre de ce type cellulaire ou à une mortalité passée inaperçue lors des tests LIVE/DEAD observés au vidéomicroscope Incucyte. Des tests systématiques au cytomètre de viabilité et des comptages précis de chaque type cellulaire en 2D et 3D devront être réalisés afin de poursuivre l'étude de cette coculture.

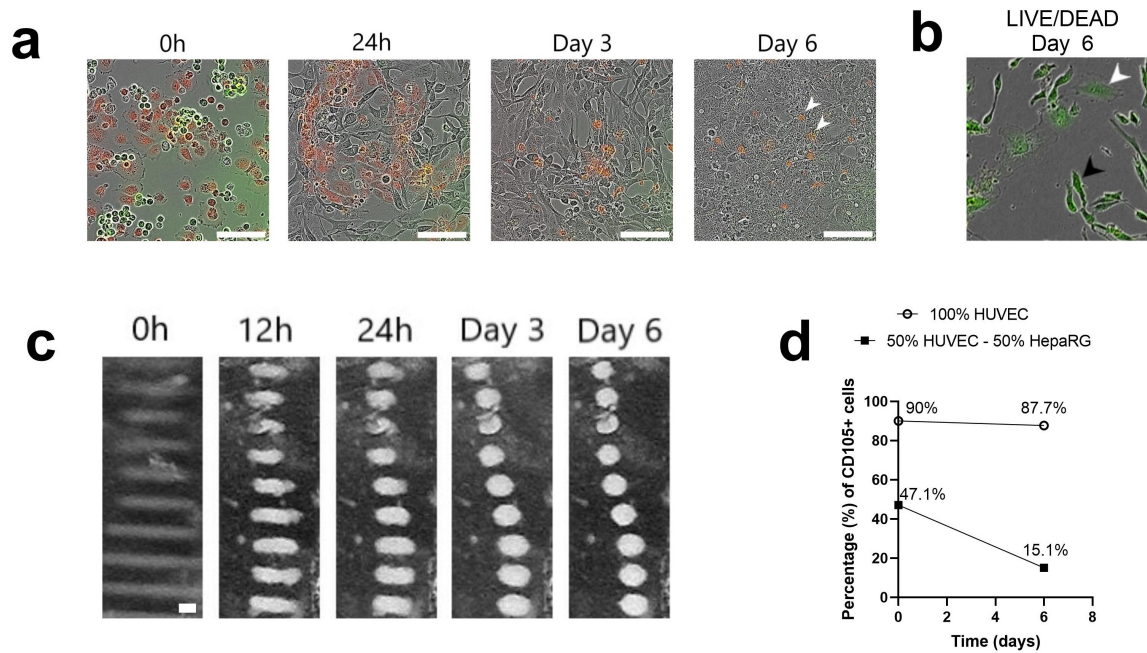


FIGURE 9.3 – a) Coculture en 2D de cellules HepaRG (vertes puis non marquées) et d’HUVEC (rouges); les flèches blanches indiquent des amas resserrés d’HUVEC; barres d’échelle : 100 μm , b) Marquage LIVE/DEAD de cellules HepaRG (flèche noire) et HUVEC (flèche blanche) à la fin de six jours de culture, c) Lévitation d’une coculture pendant six jours; barre d’échelle 200 μm , d) Proportion de cellules marquées par l’anticorps anti-CD105 (marqueur endothélial) avant et après lévitation d’HUVEC seules ou d’une cocultureensemencée à 50% de chaque type cellulaire.

9.3 Imagerie confocale en temps réel de l’auto-organisation

9.3.1 Matériels et méthodes

Afin d’observer l’auto-organisation cellulaire au microscope confocal (*time-lapse* avec une acquisition toutes les 5 min), un marquage nucléaire Incucyte® Nuflight Rapid Red Dye (Sartorius) a été utilisé sur des cellules stromales mésenchymateuses (dilution 1 : 250) avant leur mise en lévitation. La lévitation ($\text{Amp} = 3.5 V_{pp} / F_{ac} = 2.2 \text{ MHz}$) a été réalisée en configuration inversée pour l’adapter au microscope droit : le réflecteur (lamelle de verre)

était vers le haut et le transducteur vers le bas.

Les observations de microscopie en temps réel ont été effectuées au microscope confocal LSM 780 system (microscope droit) - Examiner Z1 stand (Zeiss, Oberkochen, Germany), placé dans une chambre d'incubation (37°C). L'objectif choisi était un LD-Plan Neofluar 20X (longue distance) (Zeiss) avec une distance de travail de 8 mm. La longueur d'onde d'excitation était de 633 nm et la puissance du laser était de 11%. Le logiciel Zen 2011 Black edition (Zeiss, v.8.1) a été utilisé.

9.3.2 Résultats

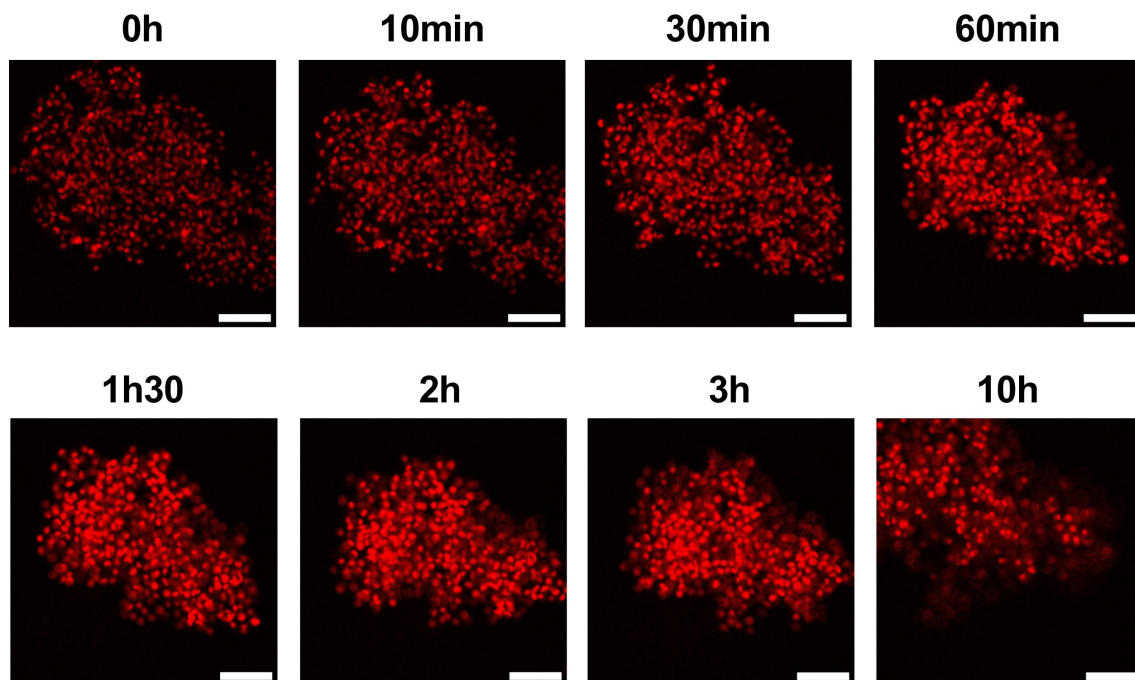


FIGURE 9.4 – Imagerie en temps réel pendant 10 heures d'un sphéroïde de cellules MSC (vu du haut) au microscope confocal; barre d'échelle : 200 μm .

Les observations en microscopie confocale en temps réel ont permis d'observer les mouvements des noyaux cellulaires au cours des trois premières heures de lévitation de MSCs. Cependant, l'agrégat cellulaire a cessé de se condenser lors des heures suivantes de cette expérience. Les cellules étaient non viables à la fin de la lévitation, probablement à cause de la photo-toxicité induite par le fort rayonnement du laser.

9.3.3 Discussion

L'imagerie confocale en temps réel, bien que réussie sur une courte durée, n'a pas pu être réalisée avec succès sur une plus longue période. Des tests supplémentaires (non détaillés ici) ont été effectués avec différentes concentrations du marqueur Nuclight et d'autres marqueurs tels Incucyte® Cytolight Rapid Green ou Red (Sartorius), mais n'ont pas réussi à observer l'auto-organisation pendant plus de trois heures. Les cellules étaient victimes de photo-toxicité, de photo-blanchiment ou de toxicité due au marqueur. Des étapes supplémentaires d'optimisation seront nécessaires pour surmonter ces obstacles. À terme, cette piste de recherche pourrait lever le voile sur l'auto-structuration d'une coculture de plusieurs types cellulaires, à la manière de l'étude en 2D présentée en section 9.2.

9.4 Conclusion du chapitre

Bien que non probantes à cause de l'observation de phénomènes encore inexpliqués ou du constat d'une mauvaise viabilité cellulaire, ces études préliminaires soulèvent des questionnements intéressants pour la poursuite de l'étude de la lévitation acoustique des cellules hépatiques. Même si de nouvelles mises au point de protocoles devront être réalisées, ces pistes mériteront d'être explorées dans le futur.

Discussion générale

Conclusion

Cette étude a montré le potentiel de la lévitation acoustique pour la culture cellulaire à long terme de cellules hépatiques. Notre dispositif forme des sphéroïdes de taille homogène et contrôlable. La viabilité cellulaire est conservée pendant plusieurs jours de lévitation continue de MSCs, HUVEC (au moins 3 jours) et de cellules HepaRG (au moins 12 jours), soumises à une force de radiation acoustique d'amplitude modérée ($Amp = 3.5 V_{pp} / F_{ac} = 2.2 \text{ MHz}$).

L'auto-organisation cellulaire d'un feuillet à un sphéroïde avait déjà été rapportée sur les MSCs par une précédente étude de l'équipe (JEGER-MADIOT *et al.*, 2021). Elle a ici été observée sur deux nouveaux types cellulaires, les cellules HepaRG et les HUVEC, et les mécanismes impliqués ont été caractérisés. Alors que la force de radiation acoustique est responsable de l'agrégation initiale de la suspension cellulaire en feuillets, ce sont ensuite les cellules qui dirigent l'auto-organisation à long terme, grâce aux interactions cellule-cellule et au cytosquelette. Les caractéristiques intrinsèques des types cellulaires, telle la contractilité, gouvernent la dynamique de cette auto-organisation, qui s'étend de quelques heures à quelques jours selon les types cellulaires.

Nous avons de plus montré qu'après 6 jours de culture dans notre dispositif acoustofluidique, les sphéroïdes de cellules HepaRG étaient viables et ne présentaient pas d'altération de l'ADN. Les sphéroïdes ainsi formés et cultivés répondaient aux critères de validation d'un modèle hépatique *in vitro* : morphologie hépatocytaire, présence de marqueurs de polarité, expression génique des cytochromes, expression de marqueurs du cycle de l'urée, et production d'albumine. Cette étude apaise donc les préoccupations sur le caractère potentiellement nuisible des ultrasons utilisés dans nos dispositifs acoustofluidiques, tout en démontrant le potentiel des sphéroïdes ainsi obtenus en tant que modèles hépatiques alternatifs aux méthodes de culture standards.

Limites et perspectives de cette étude

Les travaux présentés ci-avant possèdent cependant des limites certaines, liées à nos choix de tests, de cellules et de dispositifs.

Tout d'abord, l'étude fonctionnelle après 6 jours de lévitation acoustique de cellules HepaRG n'a pas pu s'attarder sur tous les critères de fonctionnalité hépatique. Des études supplémentaires pourront alors être menées sur la différenciation de ces cellules bipotentes, leur production d'urée et leur métabolisme des médicaments, afin d'enrichir la recherche présentée ici.

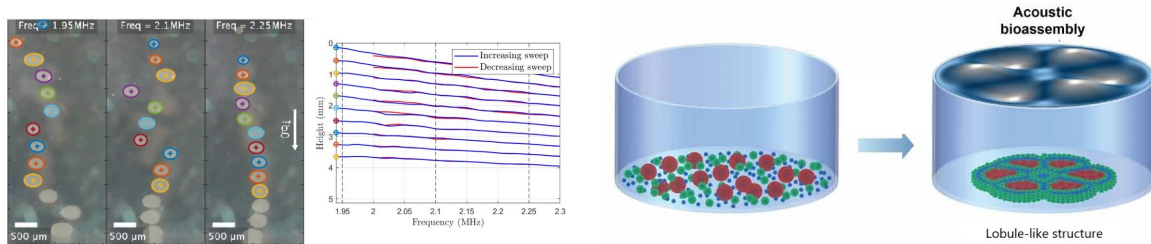
De plus, si notre étude n'a relevé aucun effet néfaste sur la viabilité et a signalé un bénéfice pour la fonctionnalité des cellules HepaRG, ces avancées ne peuvent pas être généralisées à tous les types cellulaires. Une étude similaire devra être menée de nouveau pour chaque autre type cellulaire cultivé en lévitation acoustique. Des recherches sur la lévitation de cellules neuronales murines, de cellules tumorales humaines et de cyanobactéries sont en cours dans notre équipe et permettront d'étendre l'exploration de l'innocuité et des apports fonctionnels.

Ces problématiques circonscrites rencontrées dans nos recherches se combinent à celles plus larges auxquelles est confronté le domaine de l'acoustofluidique. Celui-ci se heurte à un frein principal qui empêche la démocratisation de la lévitation acoustique. En effet, l'acoustofluidique requiert de l'équipement spécialisé et des conditions de culture particulières qui ne sont pas disponibles dans la plupart des laboratoires de biologie (LIN et CHANG, 2008). En outre, les dispositifs acoustofluidiques sont souvent complexes et peu propices au changement d'expérimentateur. Si la lévitation acoustique souhaite trouver une place dans le domaine biomédical, il s'agira en premier lieu de simplifier les puces et les montages utilisés pour permettre leur emploi par des manipulateurs non spécialistes (CONNACHER *et al.*, 2018). Cette utilisation qualifiée de *plug-and-play* devra être directement intégrable dans les protocoles standards des laboratoires de biologie (dimensions standardisées, etc.) (LLABJANI *et al.*, 2022). Pour plus d'accessibilité, elle pourrait être combinée avec l'approche 'innovation frugale en santé', qui prône une diminution des coûts des dispositifs et une généralisation des approches *do it yourself*, tel le dispositif TinyLev (4 kHz) qui permet de présenter la lévitation acoustique à des novices ne possédant pas de matériel scientifique sophistiqué (MARZO, BARNES et DRINKWATER, 2017).

Pour que l'acoustofluidique conserve son caractère avant-gardiste dans un paysage biotechnologique très compétitif, elle doit également rester à la pointe de la microfluidique et rivaliser de promesses avec les technologies macrofluidiques (SACKMANN, FULTON et BEEBE, 2014). Une évolution permanente est donc nécessaire (CONNACHER *et al.*, 2018), un défi qui a été relevé avec succès ces dernières années. Ainsi, des progrès exponentiels en ce qui concerne la mise à l'échelle (*scale-up*) permettent aujourd'hui l'agrégation rapide de milliers de sphéroïdes (CHEN *et al.*, 2019 ; LUO *et al.*, 2022 ; MIAO *et al.*, 2023). De plus, l'on assiste à l'émergence de l'intelligence acoustofluidique : automatisation, intégration de nombreux capteurs et contrôleurs (CAI *et al.*, 2020). Ces réussites de parallélisation et d'automatisation, étapes souvent critiques lors du développement d'une nouvelle technologie, augurent désormais un déploiement rapide en cas d'application industrielle. En comparaison, le dispositif détaillé ici et utilisé pendant les trois ans de cette thèse est déjà quasiment obsolète. Néanmoins, même si l'étude présentée dans ce manuscrit est menée à une échelle de parallélisation modeste, il faut garder à l'esprit que nos résultats biologiques peuvent être généralisés à des sphéroïdes hépatiques formés à plus grande échelle.

Pour rester pertinente, l'acoustofluidique s'inspire également de la voie vers laquelle se sont engagés les systèmes microphysiologiques : la complexification des modèles biolo-

giques, afin de recréer les interactions intercellulaires ou même inter-organes. Notre équipe est ainsi en train de développer la prochaine génération de puces acoustofluidiques pour faciliter la coculture. De plus, elle s'est aventurée sur la voie de la formation de motifs (*patterns*) grâce à la manipulation acoustique de sphéroïdes entiers. Les positions axiales de sphéroïdes en lévitation acoustique peuvent être contrôlées par des modifications de fréquences (DRON et AIDER, 2012; DRON et AIDER, 2013) permettant d'éloigner ou de rapprocher des sphéroïdes jusqu'à leur fusionnement, comme illustré sur la Figure 9.5a (JEGER-MADIOT *et al.*, 2022).



(a) Visualisation des déplacements axiaux de sphéroïdes en lévitation acoustique, à la suite de changements de fréquence de l'onde ultrasonore (gauche). On peut voir à droite l'évolution des positions axiales de chaque sphéroïde en fonction de la fréquence (JEGER-MADIOT *et al.*, 2022)

(b) Formation par assemblage acoustique d'une structure semblable à un lobule hépatique, à partir d'une suspension cellulaire hétérogène en taille et en densité (GFP-HUVEC et hépatoblastes dérivés d'iPS). Imagerie par immunofluorescence au jour 0 et au jour 7. D'après Gu *et al.*, 2022

FIGURE 9.5 – Manipulation acoustique pour la formation de motifs

Nos travaux rejoindront ainsi prochainement le domaine de la création de motifs structuraux et d'hologrammes acoustiques d'une résolution de l'ordre du millimètre (SOTO *et al.*, 2021; MA *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2022; HOU *et al.*, 2022; CHEN *et al.*, 2015). Ces motifs peuvent être obtenus grâce aux interférences entre les ondes émises depuis plusieurs transducteurs ou à une surface de réflexion gravée en 3D. Il est alors possible de mimer l'organisation de certains tissus (ARMSTRONG *et al.*, 2022; BOUYER *et al.*, 2016) tel le lobule hépatique (Figures 9.5b). Dans cet objectif, le dispositif acoustofluidique présenté au chapitre 4 pourrait être adapté afin d'assembler les sphéroïdes à la manière de blocs de construction (*building blocks*) pour élaborer une structure biomimétique ressemblant au lobule hépatique. Le système de perfusion pourrait même être adapté pour créer un gradient en oxygène et nutriments et mimer la zonation hépatique (LAUSCHKE *et al.*, 2019).

Aujourd'hui, apparaissent également les corps sur puce, qui présentent plusieurs compartiments modélisant chacun un organe particulier. Ils recréent les interactions organe-organe, impliquées par exemple dans la circulation biliaire (BLUTT *et al.*, 2021) ou la détoxification des xénobiotiques. Ces corps sur puce pourraient constituer une perspective supplémentaire pour les dispositifs acoustofluidiques.

Toutes les évolutions proposées dans ces derniers paragraphes ont le potentiel d'améliorer le biomimétisme de la culture cellulaire en lévitation acoustique. Les modèles obtenus auraient alors des débouchés en recherche fondamentale et en recherche appliquée. Les

perspectives fondamentales sont l'étude de l'auto-organisation et de l'organogenèse, alors que les principaux débouchés appliqués sont les études de pharmaco-toxicologie et la médecine régénérative. Ces deux domaines se heurtent respectivement au peu d'exactitude des tests actuels et au manque de donneurs, des impasses qui ne peuvent être surmontées que par le développement de nouvelles technologies. Ainsi, les approches autologues et allogéniques pourraient toutes deux exploiter les systèmes microphysiologiques hépatiques (Figure 9.6).

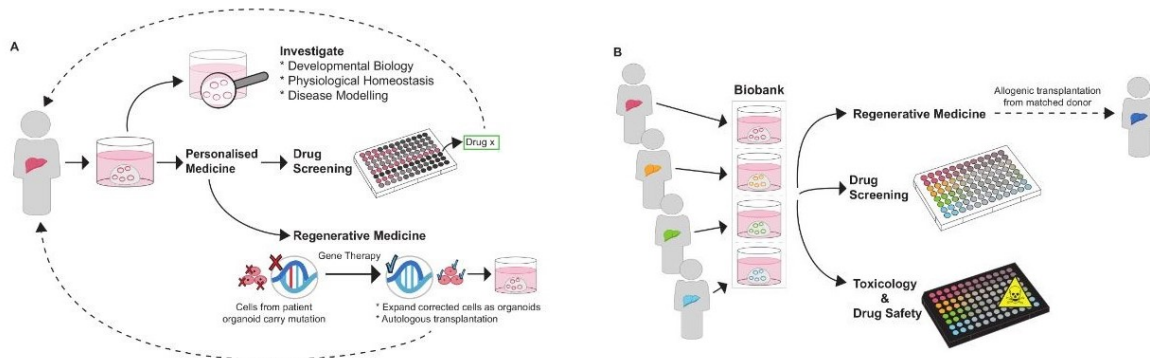


FIGURE 9.6 – Les systèmes microphysiologiques pour le développement de médicaments et la médecine régénérative; A) Approche autologue B) Approche allogénique. D'après PRIOR, INACIO et HUCH, 2019

En ce qui concerne la pharmaco-toxicologie, des tests de systèmes microphysiologiques sont déjà à l'étude. L'entreprise Emulate Inc., Boston, prédit une économie annuelle de 3 milliards de dollars si l'industrie pharmaceutique incorpore des foies sur puce dans ses phases précliniques de recherche et développement (EWART *et al.*, 2022) et promet une détection plus précoce des toxicités. Cette démarche s'inscrit dans le paradigme du développement des médicaments, qui est : "l'échec rapide est un échec à moindre coût" (*fail early, fail cheaply*, AU *et al.*, 2014). Avant l'intégration généralisée de systèmes microphysiologiques dans les études de pharmaco-toxicologie, il est néanmoins nécessaire d'améliorer leur reproductibilité et leur efficacité. La lévitation acoustique, du fait du contrôle de la taille des sphéroïdes, de l'administration aisée de médicaments et de l'augmentation de fonctionnalité rapportée ici, pourrait se révéler une bonne alternative aux méthodes standards.

Quant aux thérapies cellulaires, qui sont le deuxième débouché appliqué identifié, l'intégration des cultures *in vitro* se situe à un stade moins avancé. Des thérapies exploitant des sphéroïdes sont en cours d'étude, mais aucune n'a atteint l'étape des essais cliniques. La mise à l'échelle, la non-nocivité et l'efficacité de ces traitements restent largement inconnues. De plus, les produits à destination de la thérapie cellulaire impliquent des procédures de culture plus complexes et coûteuses afin de respecter les bonnes pratiques de culture (GMP) (BERTHIAUME, MAGUIRE et YARMUSH, 2011), ce qui complique leur mise en œuvre. Les enjeux économiques et éthiques des alternatives à la greffe de foie à partir de donneurs sains sont donc à étudier de près avant de développer l'une ou l'autre approche présentées en Figure 9.7 (réparation *ex vivo* de foie endommagé, injection de sphéroïdes chez le patient,

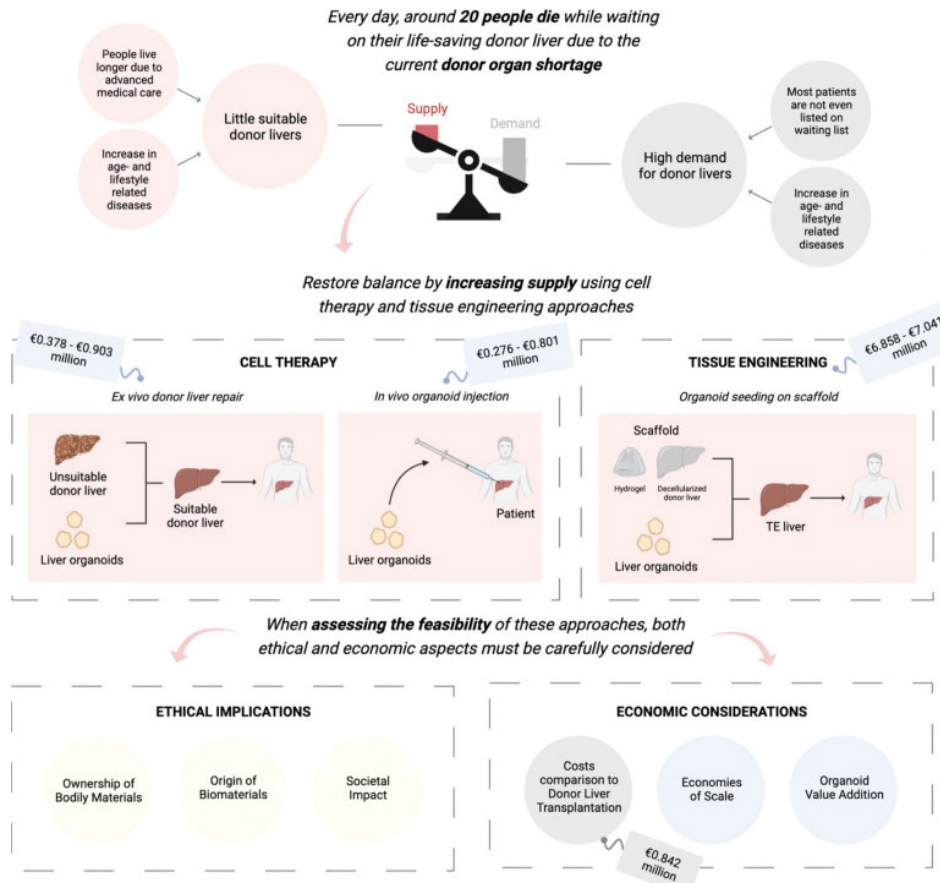


FIGURE 9.7 – Enjeux présents et futurs de la greffe de foie, comparaison de différentes approches : thérapie cellulaire de foies endommagés, injection d’organoïdes, ingénierie tissulaire. D’après TEN DAM *et al.*, 2023

réensemencement d’un échafaudage décellularisé...).

Du fait de l’extrême immaturité de ce domaine, l’acoustofluidique pourrait s’y créer une place grâce à sa non-utilisation d’hydrogels mal caractérisés, son potentiel de coculture et la possibilité de greffer des sphéroïdes préalablement maturés en lévitation acoustique. Une étude plus complète des effets des ultrasons serait absolument nécessaire avant de s’engager dans cette voie.

En définitive, les travaux présentés ici incitent à poursuivre l’étude du potentiel de la lévitation acoustique pour la culture cellulaire de foie. La technique n’en est qu’à ses balbutiements, mais est prometteuse pour de nombreux domaines fondamentaux ou appliqués.

BIBLIOGRAPHIE

- ABATE, Adam R. et WEITZ, David A. (2011). "Syringe-Vacuum Microfluidics: A Portable Technique to Create Monodisperse Emulsions". In : *Biomicrofluidics* 5.1, p. 014107. DOI : [10.1063/1.3567093](https://doi.org/10.1063/1.3567093).
- ACHILLI, Toni-Marie, MEYER, Julia et MORGAN, Jeffrey R (2012). "Advances in the Formation, Use and Understanding of Multi-Cellular Spheroids". In : *Expert opinion on biological therapy* 12.10, p. 1347-1360. ISSN : 1471-2598. DOI : [10.1517/14712598.2012.707181](https://doi.org/10.1517/14712598.2012.707181).
- ALBERTS, Bruce *et al.* (2002). "Cell-Cell Adhesion". In : *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*.
- ANINAT, Caroline *et al.* (2006). "Expression of Cytochromes P450, Conjugating Enzymes and Nuclear Receptors in Human Hepatoma HepaRG Cells". In : *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 34.1, p. 75-83. ISSN : 0090-9556. DOI : [10.1124/dmd.105.006759](https://doi.org/10.1124/dmd.105.006759).
- ARMSTRONG, James P. K. *et al.* (2022). "Tissue Engineering Cartilage with Deep Zone Cytoarchitecture by High-Resolution Acoustic Cell Patterning". In : *Advanced Healthcare Materials*, e2200481. ISSN : 2192-2659. DOI : [10.1002/adhm.202200481](https://doi.org/10.1002/adhm.202200481).
- ARMSTRONG, Peter B. (1989). "Cell Sorting Out: The Self-Assembly of Tissues In Vitro". In : *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 24.2, p. 119-149. ISSN : 1040-9238. DOI : [10.3109/10409238909086396](https://doi.org/10.3109/10409238909086396).
- ASPLUND, Annika *et al.* (2016). "One Standardized Differentiation Procedure Robustly Generates Homogenous Hepatocyte Cultures Displaying Metabolic Diversity from a Large Panel of Human Pluripotent Stem Cells". In : *Stem Cell Reviews and Reports* 12.1, p. 90-104. ISSN : 1558-6804. DOI : [10.1007/s12015-015-9621-9](https://doi.org/10.1007/s12015-015-9621-9).
- ATHANASIOU, Kyriacos A. *et al.* (2013). "Self-Organization and the Self-Assembling Process in Tissue Engineering". In : *Annual Review of Biomedical Engineering* 15.1, p. 115-136. ISSN : 1523-9829, 1545-4274. DOI : [10.1146/annurev-bioeng-071812-152423](https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071812-152423).
- AU, Sam H. *et al.* (2014). "Hepatic Organoids for Microfluidic Drug Screening". In : *Lab on a Chip* 14.17, p. 3290-3299. ISSN : 1473-0189. DOI : [10.1039/C4LC00531G](https://doi.org/10.1039/C4LC00531G).
- BAASCH, Thierry et DUAL, Jürg (2018). "Acoustofluidic Particle Dynamics: Beyond the Rayleigh Limit". In : *The Journal of the Acoustical Society of America* 143.1, p. 509-519. ISSN : 0001-4966. DOI : [10.1121/1.5021339](https://doi.org/10.1121/1.5021339).
- BACHIR, Alexia I. *et al.* (2017). "Actin-Based Adhesion Modules Mediate Cell Interactions with the Extracellular Matrix and Neighboring Cells". In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9.7, a023234. ISSN : 1943-0264. DOI : [10.1101/cshperspect.a023234](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023234).
- BAIMAKHANOV, Zhassulan *et al.* (2018). "Spontaneous Hepatocyte Migration towards an Endothelial Cell Tube Network". In : *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 12.3, e1767-e1771. ISSN : 1932-7005. DOI : [10.1002/term.2577](https://doi.org/10.1002/term.2577).

-
- BAKSH, D., SONG, L. et TUAN, R. S. (2004). "Adult Mesenchymal Stem Cells: Characterization, Differentiation, and Application in Cell and Gene Therapy". In : *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8.3, p. 301-316. ISSN : 1582-1838. DOI : [10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x).
- BALE, Shyam Sundhar *et al.* (2015). "Long-Term Coculture Strategies for Primary Hepatocytes and Liver Sinusoidal Endothelial Cells". In : *Tissue Engineering Part C: Methods* 21.4, p. 413-422. ISSN : 1937-3384, 1937-3392. DOI : [10.1089/ten.tec.2014.0152](https://doi.org/10.1089/ten.tec.2014.0152).
- BAUDOIN, Régis *et al.* (2007). "Trends in the Development of Microfluidic Cell Biochips for in Vitro Hepatotoxicity". In : *Toxicology in Vitro* 21.4, p. 535-544. ISSN : 0887-2333. DOI : [10.1016/j.tiv.2006.11.004](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.11.004).
- BAYIR, Ece, SENDEMIR, Aylin et MISSIRLIS, Yannis F. (2019). "Mechanobiology of Cells and Cell Systems, Such as Organoids". In : *Biophysical Reviews* 11.5, p. 721-728. ISSN : 1867-2469. DOI : [10.1007/s12551-019-00590-7](https://doi.org/10.1007/s12551-019-00590-7).
- BAZE, Audrey *et al.* (2018). "Three-Dimensional Spheroid Primary Human Hepatocytes in Monoculture and Coculture with Nonparenchymal Cells". In : *Tissue Engineering Part C: Methods* 24.9, p. 534-545. ISSN : 1937-3384. DOI : [10.1089/ten.tec.2018.0134](https://doi.org/10.1089/ten.tec.2018.0134).
- BAZOU, Despina (2010). "Biochemical Properties of Encapsulated High-Density 3-D HepG2 Aggregates Formed in an Ultrasound Trap for Application in Hepatotoxicity Studies: Biochemical Responses of Encapsulated 3-D HepG2 Aggregates". In : *Cell Biology and Toxicology* 26.2, p. 127-141. ISSN : 0742-2091, 1573-6822. DOI : [10.1007/s10565-009-9123-0](https://doi.org/10.1007/s10565-009-9123-0).
- BAZOU, Despina *et al.* (2005). "Molecular Adhesion Development in a Neural Cell Monolayer Forming in an Ultrasound Trap". In : *Molecular Membrane Biology* 22.3, p. 229-240. ISSN : 0968-7688. DOI : [10.1080/09687860500093396](https://doi.org/10.1080/09687860500093396).
- BAZOU, Despina *et al.* (2006). "Gap Junctional Intercellular Communication and Cytoskeletal Organization in Chondrocytes in Suspension in an Ultrasound Trap". In : *Molecular Membrane Biology* 23.2, p. 195-205. ISSN : 0968-7688. DOI : [10.1080/09687860600555906](https://doi.org/10.1080/09687860600555906).
- BAZOU, Despina *et al.* (2008). "Long-Term Viability and Proliferation of Alginate-Encapsulated 3-D HepG2 Aggregates Formed in an Ultrasound Trap". In : *Toxicology in Vitro* 22.5, p. 1321-1331. ISSN : 08872333. DOI : [10.1016/j.tiv.2008.03.014](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.03.014).
- BECKWITT, Colin H. *et al.* (2018). "Liver 'Organ on a Chip'". In : *Experimental Cell Research* 363.1, p. 15-25. ISSN : 0014-4827. DOI : [10.1016/j.yexcr.2017.12.023](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.12.023).
- BÉLANGER, Marie-Claire et MAROIS, Yves (2001). "Hemocompatibility, Biocompatibility, Inflammatory and in Vivo Studies of Primary Reference Materials Low-Density Polyethylene and Polydimethylsiloxane: A Review". In : *Journal of Biomedical Materials Research* 58.5, p. 467-477. ISSN : 1097-4636. DOI : [10.1002/jbm.1043](https://doi.org/10.1002/jbm.1043).
- BELL, Catherine C. *et al.* (2016). "Characterization of Primary Human Hepatocyte Spheroids as a Model System for Drug-Induced Liver Injury, Liver Function and Disease". In : *Scientific Reports* 6.1, p. 25187. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/srep25187](https://doi.org/10.1038/srep25187).

- BELL, Catherine C. *et al.* (2018). "Comparison of Hepatic 2D Sandwich Cultures and 3D Spheroids for Long-term Toxicity Applications: A Multicenter Study". In : *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 162.2, p. 655-666. ISSN : 1096-0929. DOI : [10.1093/toxsci/kfx289](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx289).
- BELLEBON, Ludovic *et al.* (2022). "Characterization of Mesenchymal Stromal Cells Physical Properties Using Acoustic Radiation Force". In : *Frontiers in Physics* 10. ISSN : 2296-424X.
- BERTHIAUME, François, MAGUIRE, Timothy J. et YARMUSH, Martin L. (2011). "Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges". In : *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* 2.1, p. 403-430. DOI : [10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257](https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257).
- BHANDARI, Rena. N. B. *et al.* (2001). "Liver Tissue Engineering: A Role for Co-Culture Systems in Modifying Hepatocyte Function and Viability". In : *Tissue Engineering* 7.3, p. 345-357. ISSN : 1076-3279. DOI : [10.1089/10763270152044206](https://doi.org/10.1089/10763270152044206).
- BISSOYI, Akalabya *et al.* (2016). "Enhanced Cryopreservation of MSCs in Microfluidic Bioreactor by Regulated Shear Flow". In : *Scientific Reports* 6, p. 35416. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/srep35416](https://doi.org/10.1038/srep35416).
- BISWAS, Kabir H. (2020). "Molecular Mobility-Mediated Regulation of E-Cadherin Adhesion". In : *Trends in Biochemical Sciences* 45.2, p. 163-173. ISSN : 0968-0004. DOI : [10.1016/j.tibs.2019.10.012](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.10.012).
- BLACKFORD, Samuel J.I. *et al.* (2019). "Validation of Current Good Manufacturing Practice Compliant Human Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocytes for Cell-Based Therapy: Validation of cGMP hPSCs for Liver Therapy". In : *STEM CELLS Translational Medicine* 8.2, p. 124-137. ISSN : 21576564. DOI : [10.1002/sctm.18-0084](https://doi.org/10.1002/sctm.18-0084).
- BLUTT, Sarah E. *et al.* (2021). "Use of Human Tissue Stem Cell-Derived Organoid Cultures to Model Enterohepatic Circulation". In : *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 321.3, G270-G279. ISSN : 0193-1857. DOI : [10.1152/ajpgi.00177.2021](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00177.2021).
- BOCK, Christoph *et al.* (2021). "The Organoid Cell Atlas". In : *Nature Biotechnology* 39.1, p. 13-17. ISSN : 1546-1696. DOI : [10.1038/s41587-020-00762-x](https://doi.org/10.1038/s41587-020-00762-x).
- BOUYER, Charène *et al.* (2016). "Bio-Acoustic Levitational Assembly of Heterocellular 3D Constructs: 3D Model Establishment for Cells Radiation Effect Studies in 3D Microenvironment". In : *Physica Medica* 32, p. 214. ISSN : 11201797. DOI : [10.1016/j.ejmp.2016.07.722](https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2016.07.722).
- BRAGA, Vania M. (2002). "Cell-Cell Adhesion and Signalling". In : *Current Opinion in Cell Biology* 14.5, p. 546-556. ISSN : 0955-0674. DOI : [10.1016/S0955-0674\(02\)00373-3](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00373-3).
- BRASSARD, Jonathan A. et LUTOLF, Matthias P. (2019). "Engineering Stem Cell Self-organization to Build Better Organoids". In : *Cell Stem Cell* 24.6, p. 860-876. ISSN : 19345909. DOI : [10.1016/j.stem.2019.05.005](https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.05.005).

-
- BRÜNINGK, Sarah C. *et al.* (2020). “3D Tumour Spheroids for the Prediction of the Effects of Radiation and Hyperthermia Treatments”. In : *Scientific Reports* 10.1, p. 1653. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/s41598-020-58569-4](https://doi.org/10.1038/s41598-020-58569-4).
- BRUUS, Henrik (2011). “Acoustofluidics 1: Governing Equations in Microfluidics”. In : *Lab on a Chip* 11.22, p. 3742-3751. ISSN : 1473-0189. DOI : [10.1039/C1LC20658C](https://doi.org/10.1039/C1LC20658C).
- (2012). “Acoustofluidics 7: The Acoustic Radiation Force on Small Particles”. In : *Lab on a Chip* 12.6, p. 1014. ISSN : 1473-0197, 1473-0189. DOI : [10.1039/c2lc21068a](https://doi.org/10.1039/c2lc21068a).
- CAI, Hongwei *et al.* (2020). “Acoustofluidic Assembly of 3D Neurospheroids to Model Alzheimer’s Disease”. In : *The Analyst* 145.19, p. 6243-6253. ISSN : 1364-5528. DOI : [10.1039/d0an01373k](https://doi.org/10.1039/d0an01373k).
- CALIARI, Steven R. *et BURDICK, Jason A.* (2016). “A Practical Guide to Hydrogels for Cell Culture”. In : *Nature Methods* 13.5, p. 405-414. ISSN : 1548-7105. DOI : [10.1038/nmeth.3839](https://doi.org/10.1038/nmeth.3839).
- CAPLAN, Arnold I. (2017). “Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!” In : *Stem Cells Translational Medicine* 6.6, p. 1445-1451. ISSN : 2157-6564. DOI : [10.1002/sctm.17-0051](https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051).
- CARPENTIER, Arnaud *et al.* (2016). “Hepatic Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells in Miniaturized Format Suitable for High-Throughput Screen”. In : *Stem Cell Research* 16.3, p. 640-650. ISSN : 18735061. DOI : [10.1016/j.scr.2016.03.009](https://doi.org/10.1016/j.scr.2016.03.009).
- CEREC, Virginie *et al.* (2007). “Transdifferentiation of Hepatocyte-like Cells from the Human Hepatoma HepaRG Cell Line through Bipotent Progenitor”. In : *Hepatology* 45.4, p. 957-967. ISSN : 1527-3350. DOI : [10.1002/hep.21536](https://doi.org/10.1002/hep.21536).
- CHEN, Bin *et al.* (2019). “High-Throughput Acoustofluidic Fabrication of Tumor Spheroids”. In : *Lab on a Chip* 19.10, p. 1755-1763. ISSN : 1473-0197, 1473-0189. DOI : [10.1039/C9LC00135B](https://doi.org/10.1039/C9LC00135B).
- CHEN, Chen *et al.* (2018). “Biotechnology Challenges to In Vitro Maturation of Hepatic Stem Cells”. In : *Gastroenterology* 154.5, p. 1258-1272. ISSN : 0016-5085, 1528-0012. DOI : [10.1053/j.gastro.2018.01.066](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.01.066).
- CHEN, Kejie *et al.* (2016). “Rapid Formation of Size-Controllable Multicellular Spheroids via 3D Acoustic Tweezers”. In : *Lab on a Chip* 16.14, p. 2636-2643. ISSN : 1473-0197, 1473-0189. DOI : [10.1039/C6LC00444J](https://doi.org/10.1039/C6LC00444J).
- CHEN, Pu *et al.* (2015). “Biotunable Acoustic Node Assembly of Organoids”. In : *Advanced Healthcare Materials* 4.13, p. 1937-1943. ISSN : 2192-2659. DOI : [10.1002/adhm.201500279](https://doi.org/10.1002/adhm.201500279).
- CHEN, Sitong *et al.* (2020). “Hepatic Spheroids Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells in Bio-Artificial Liver Rescue Porcine Acute Liver Failure”. In : *Cell Research* 30.1, p. 95-97. ISSN : 1748-7838. DOI : [10.1038/s41422-019-0261-5](https://doi.org/10.1038/s41422-019-0261-5).
- CHIEW, Geraldine Giap Ying *et al.* (2015). “Physical Supports from Liver Cancer Cells Are Essential for Differentiation and Remodeling of Endothelial Cells in a HepG2-HUVEC Co-Culture Model”. In : *Scientific Reports* 5.1, p. 10801. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/srep10801](https://doi.org/10.1038/srep10801).

- CHOI, Yoon Young, SEOK, Jin-I. et KIM, Dong-Sik (2020). "Flow-Based Three-Dimensional Co-Culture Model for Long-Term Hepatotoxicity Prediction". In : *Micromachines* 11.1, p. 36. ISSN : 2072-666X. DOI : [10.3390/mi11010036](https://doi.org/10.3390/mi11010036).
- CHONG, Zhuang Zhi *et al.* (2015). "Acoustofluidic Control of Bubble Size in Microfluidic Flow-Focusing Configuration". In : *Lab on a Chip* 15.4, p. 996-999. ISSN : 1473-0189. DOI : [10.1039/C4LC01139B](https://doi.org/10.1039/C4LC01139B).
- CHOUDHURY, Deepak *et al.* (2011). "Exploitation of Physical and Chemical Constraints for Three-Dimensional Microtissue Construction in Microfluidics". In : *Biomicrofluidics* 5.2, p. 022203. ISSN : 1932-1058. DOI : [10.1063/1.3593407](https://doi.org/10.1063/1.3593407).
- CHRISTOFFERSSON, Jonas et MANDENIUS, Carl-Fredrik (2019). "Using a Microfluidic Device for Culture and Drug Toxicity Testing of 3D Cells". In : *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1994, p. 235-241. ISSN : 1940-6029. DOI : [10.1007/978-1-4939-9477-9_22](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9477-9_22).
- CHUNG, François (2011). "Regional Appearance Modeling for Deformable Model-Based Image Segmentation". Thèse de doct.
- COAKLEY, William. T. *et al.* (2004). "Cell-Cell Contact and Membrane Spreading in an Ultrasound Trap". In : *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 34.4, p. 221-230. ISSN : 0927-7765. DOI : [10.1016/j.colsurfb.2004.01.002](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.01.002).
- COMEAU, Eric S., HOCKING, Denise C. et DALECKI, Diane (2016). "Ultrasound Patterning Technologies for Studying Vascular Morphogenesis in 3D". In : *Journal of Cell Science*, jcs.188151. ISSN : 1477-9137, 0021-9533. DOI : [10.1242/jcs.188151](https://doi.org/10.1242/jcs.188151).
- CONNACHER, William *et al.* (2018). "Micro/Nano Acoustofluidics: Materials, Phenomena, Design, Devices, and Applications". In : *Lab on a Chip* 18.14, p. 1952-1996. ISSN : 1473-0197, 1473-0189. DOI : [10.1039/C8LC00112J](https://doi.org/10.1039/C8LC00112J).
- COTOVIO, João P. et FERNANDES, Tiago G. (2020). "Production of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatic Cell Lineages and Liver Organoids: Current Status and Potential Applications". In : *Bioengineering* 7.2, p. 36. ISSN : 2306-5354. DOI : [10.3390/bioengineering7020036](https://doi.org/10.3390/bioengineering7020036).
- CUVELLIER, Marie *et al.* (2021). "3D Culture of HepaRG Cells in GelMa and Its Application to Bioprinting of a Multicellular Hepatic Model". In : *Biomaterials* 269, p. 120611. ISSN : 01429612. DOI : [10.1016/j.biomaterials.2020.120611](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120611).
- DAHL-JENSEN, Svend et GRAPIN-BOTTON, Anne (2017). "The Physics of Organoids: A Biophysical Approach to Understanding Organogenesis". In : *Development* 144.6, p. 946-951. ISSN : 1477-9129, 0950-1991. DOI : [10.1242/dev.143693](https://doi.org/10.1242/dev.143693).
- DE SOUZA, Natalie (2018). "Organoids". In : *Nature Methods* 15.1, p. 23-23. ISSN : 1548-7091, 1548-7105. DOI : [10.1038/nmeth.4576](https://doi.org/10.1038/nmeth.4576).
- DESAI, Pujan K., TSENG, Hubert et SOUZA, Glauco R. (2017). "Assembly of Hepatocyte Spheroids Using Magnetic 3D Cell Culture for CYP450 Inhibition/Induction". In : *International Journal of Molecular Sciences* 18.5, p. 1085. ISSN : 1422-0067. DOI : [10.3390/ijms18051085](https://doi.org/10.3390/ijms18051085).

-
- DISCHER, Dennis E., JANMEY, Paul et WANG, Yu-Li (2005). “Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate”. In : *Science (New York, N.Y.)* 310.5751, p. 1139-1143. ISSN : 1095-9203. DOI : [10.1126/science.1116995](https://doi.org/10.1126/science.1116995).
- DOINIKOV, Alexander A. (1994). “Acoustic Radiation Pressure on a Compressible Sphere in a Viscous Fluid”. In : *Journal of Fluid Mechanics* 267, p. 1-22. ISSN : 1469-7645, 0022-1120. DOI : [10.1017/S0022112094001096](https://doi.org/10.1017/S0022112094001096).
- DOUEZAN, Stéphane *et al.* (2011). “Spreading Dynamics and Wetting Transition of Cellular Aggregates”. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.18, p. 7315-7320. DOI : [10.1073/pnas.1018057108](https://doi.org/10.1073/pnas.1018057108).
- DRON, Olivier (2011). “Micro-Manipulation Acoustique de Particules : Application Aux Mesures Par Micro-PIV”. These de Doctorat. Paris 7.
- DRON, Olivier et AIDER, Jean-Luc (2012). “Acoustic Energy Measurement for a Standing Acoustic Wave in a Micro-Channel”. In : *Europhysics Letters* 97.4, p. 44011. ISSN : 0295-5075. DOI : [10.1209/0295-5075/97/44011](https://doi.org/10.1209/0295-5075/97/44011).
- (2013). “Varying the Agglomeration Position of Particles in a Micro-Channel Using Acoustic Radiation Force beyond the Resonance Condition”. In : *Ultrasonics* 53.7, p. 1280-1287. ISSN : 1874-9968. DOI : [10.1016/j.ultras.2013.03.012](https://doi.org/10.1016/j.ultras.2013.03.012).
- DU, Meng *et al.* (2022). “The Impact of Low Intensity Ultrasound on Cells: Underlying Mechanisms and Current Status”. In : *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. ISSN : 0079-6107. DOI : [10.1016/j.pbiomolbio.2022.06.004](https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2022.06.004).
- DUBOIS-POT-SCHNEIDER, Hélène *et al.* (2022). “Transcriptional and Epigenetic Consequences of DMSO Treatment on HepaRG Cells”. In : *Cells* 11.15, p. 2298. ISSN : 2073-4409. DOI : [10.3390/cells11152298](https://doi.org/10.3390/cells11152298).
- DUPUIS, Chloé *et al.* (2021). “Study of the Rayleigh Limit by Acoustic Force in Microgravity”. In : *Acoustofluidics 2021*.
- DUVAL, Kayla *et al.* (2017). “Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture”. In : *Physiology* 32.4, p. 266-277. ISSN : 1548-9213, 1548-9221. DOI : [10.1152/physiol.00036.2016](https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016).
- EDDINGS, Mark A. et GALE, Bruce K. (2006). “A PDMS-based Gas Permeation Pump for on-Chip Fluid Handling in Microfluidic Devices”. In : *Journal of Micromechanics and Microengineering* 16.11, p. 2396. ISSN : 0960-1317. DOI : [10.1088/0960-1317/16/11/021](https://doi.org/10.1088/0960-1317/16/11/021).
- EDWARDS, Gareth O. *et al.* (2007a). “Cell Adhesion Dynamics and Actin Cytoskeleton Reorganization in HepG2 Cell Aggregates”. In : *Cell Communication & Adhesion* 14.1, p. 9-20. ISSN : 1541-9061. DOI : [10.1080/15419060701224849](https://doi.org/10.1080/15419060701224849).
- EDWARDS, Gareth O. *et al.* (2007b). “Stable HepG2 Aggregates Formed by Levitation in an Ultrasound Standing Wave Trap: Cell Adhesion Dynamics and Cytoskeletal Reorganization”. In : *Toxicology* 231.2-3, p. 101-102. ISSN : 0300483X. DOI : [10.1016/j.tox.2006.11.025](https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.11.025).
- EFREMOV, Yuri M. *et al.* (2021). “Mechanical Properties of Cell Sheets and Spheroids: The Link between Single Cells and Complex Tissues”. In : *Biophysical Reviews* 13.4, p. 541-561. ISSN : 1867-2450, 1867-2469. DOI : [10.1007/s12551-021-00821-w](https://doi.org/10.1007/s12551-021-00821-w).

- EHRlich, Avner *et al.* (2019). “Challenges and Opportunities in the Design of Liver-on-Chip Microdevices”. In : *Annual Review of Biomedical Engineering* 21, p. 219-239. ISSN : 1545-4274. DOI : [10.1146/annurev-bioeng-060418-052305](https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-060418-052305).
- ESTEVEs, Francisco, RUEFF, José et KRANENDONK, Michel (2021). “The Central Role of Cytochrome P450 in Xenobiotic Metabolism—A Brief Review on a Fascinating Enzyme Family”. In : *Journal of Xenobiotics* 11.3, p. 94-114. ISSN : 2039-4713. DOI : [10.3390/jox11030007](https://doi.org/10.3390/jox11030007).
- EWART, Lorna *et al.* (2022). “Performance Assessment and Economic Analysis of a Human Liver-Chip for Predictive Toxicology”. In : *Communications Medicine* 2.1, p. 1-16. ISSN : 2730-664X. DOI : [10.1038/s43856-022-00209-1](https://doi.org/10.1038/s43856-022-00209-1).
- FARZANEH, Zahra *et al.* (2018). “Developing a Cost-Effective and Scalable Production of Human Hepatic Competent Endoderm from Size-Controlled Pluripotent Stem Cell Aggregates”. In : *Stem Cells and Development* 27.4, p. 262-274. ISSN : 1547-3287. DOI : [10.1089/scd.2017.0074](https://doi.org/10.1089/scd.2017.0074).
- FELDMANN, Gérard (1992). “Cystosquelette de l’hépatocyte et pathologie hépatique”. In : *Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS*.
- FREYER, Nora *et al.* (2017). “Effects of Co-Culture Media on Hepatic Differentiation of hiPSC with or without HUVEC Co-Culture”. In : *International Journal of Molecular Sciences* 18.8, p. 1724. ISSN : 1422-0067. DOI : [10.3390/ijms18081724](https://doi.org/10.3390/ijms18081724).
- FU, Qibin *et al.* (2021). “Measurement of Cell Compressibility Changes during Epithelial–Mesenchymal Transition Based on Acoustofluidic Microdevice”. In : *Biomicrofluidics* 15.6, p. 064101. DOI : [10.1063/5.0072126](https://doi.org/10.1063/5.0072126).
- FURUSAWA, Yukihiro *et al.* (2014). “Effects of Therapeutic Ultrasound on the Nucleus and Genomic DNA”. In : *Ultrasonics Sonochemistry*. AOSS 2013 21.6, p. 2061-2068. ISSN : 1350-4177. DOI : [10.1016/j.ultsonch.2014.02.028](https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.02.028).
- GALVAO, Joana *et al.* (2014). “Unexpected Low-dose Toxicity of the Universal Solvent DM-SO”. In : *The FASEB Journal* 28.3, p. 1317-1330. ISSN : 0892-6638, 1530-6860. DOI : [10.1096/fj.13-235440](https://doi.org/10.1096/fj.13-235440).
- GAO, Yuan *et al.* (2020). “Trapping and Control of Bubbles in Various Microfluidic Applications”. In : *Lab on a Chip* 20.24, p. 4512-4527. ISSN : 1473-0197, 1473-0189. DOI : [10.1039/D0LC00906G](https://doi.org/10.1039/D0LC00906G).
- GARCIA-SABATÉ, Anna *et al.* (2014). “Experimental Study on Inter-Particle Acoustic Forces”. In : *The Journal of the Acoustical Society of America* 135.3, p. 1056-1063. ISSN : 1520-8524. DOI : [10.1121/1.4864483](https://doi.org/10.1121/1.4864483).
- GERETS, Helga H. J. *et al.* (2012). “Characterization of Primary Human Hepatocytes, HepG2 Cells, and HepaRG Cells at the mRNA Level and CYP Activity in Response to Inducers and Their Predictivity for the Detection of Human Hepatotoxins”. In : *Cell Biology and Toxicology* 28.2, p. 69-87. ISSN : 1573-6822. DOI : [10.1007/s10565-011-9208-4](https://doi.org/10.1007/s10565-011-9208-4).
- GISSEN, Paul et ARIAS, Irwin M. (2015). “Structural and Functional Hepatocyte Polarity and Liver Disease”. In : *Journal of Hepatology* 63.4, p. 1023-1037. ISSN : 1600-0641. DOI : [10.1016/j.jhep.2015.06.015](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.015).

-
- GOMES, Kátia M. S. *et al.* (2017). “Induced Pluripotent Stem Cells Reprogramming: Epigenetics and Applications in the Regenerative Medicine”. In : *Revista Da Associacao Medica Brasileira (1992)* 63.2, p. 180-189. ISSN : 1806-9282. DOI : [10 . 1590 / 1806 - 9282 . 63 . 02 . 180](https://doi.org/10.1590/1806-9282.63.02.180).
- GONZALEZ-RODRIGUEZ, David *et al.* (2012). “Soft Matter Models of Developing Tissues and Tumors”. In : *Science* 338.6109, p. 910-917. DOI : [10 . 1126 / science . 1226418](https://doi.org/10.1126/science.1226418).
- GOR’KOV, Lev (1962). “On the Forces Acting on a Small Particle in an Acoustical Field in an Ideal Fluid”. In : *Sov. Phys.* 6, p. 773-775.
- GOUGH, Albert *et al.* (2021). “Human Biomimetic Liver Microphysiology Systems in Drug Development and Precision Medicine”. In : *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 18.4, p. 252-268. ISSN : 1759-5053. DOI : [10 . 1038 / s41575 - 020 - 00386 - 1](https://doi.org/10.1038/s41575-020-00386-1).
- GRABINGER, Thomas *et al.* (2014). “Ex Vivo Culture of Intestinal Crypt Organoids as a Model System for Assessing Cell Death Induction in Intestinal Epithelial Cells and Enteropathy”. In : *Cell Death & Disease* 5.5, e1228. ISSN : 2041-4889. DOI : [10 . 1038 / cddis . 2014 . 183](https://doi.org/10.1038/cddis.2014.183).
- GRIPON, Philippe *et al.* (2002). “Infection of a Human Hepatoma Cell Line by Hepatitis B Virus”. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.24, p. 15655-15660. DOI : [10 . 1073 / pnas . 232137699](https://doi.org/10.1073/pnas.232137699).
- GU, Longjun *et al.* (2022). “Size- and Density-Dependent Acoustic Differential Bioassembly of Spatially-Defined Heterocellular Architecture”. In : *Biofabrication* 15.1, p. 015019. ISSN : 1758-5090. DOI : [10 . 1088 / 1758 - 5090 / aca79c](https://doi.org/10.1088/1758-5090/aca79c).
- GUGUEN-GUILLOUZO, Christiane et GUILLOUZO, Andre (2010). “General Review on In Vitro Hepatocyte Models and Their Applications”. In : *Hepatocytes: Methods and Protocols*. Sous la dir. de Patrick MAUREL. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ : Humana Press, p. 1-40. ISBN : 978-1-60761-688-7. DOI : [10 . 1007 / 978 - 1 - 60761 - 688 - 7 _ 1](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-688-7_1).
- GUILLOUZO, André *et al.* (2007). “The Human Hepatoma HepaRG Cells: A Highly Differentiated Model for Studies of Liver Metabolism and Toxicity of Xenobiotics”. In : *Chemico-Biological Interactions* 168.1, p. 66-73. ISSN : 0009-2797. DOI : [10 . 1016 / j . cbi . 2006 . 12 . 003](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.003).
- GUNNESS, Patrina *et al.* (2013). “3D Organotypic Cultures of Human HepaRG Cells: A Tool for In Vitro Toxicity Studies”. In : *Toxicological Sciences* 133.1, p. 67-78. ISSN : 1096-6080. DOI : [10 . 1093 / toxsci / kft021](https://doi.org/10.1093/toxsci/kft021).
- HAFEY, Michael J. *et al.* (2020). “A Two-Tiered In Vitro Approach to De-Risk Drug Candidates for Potential Bile Salt Export Pump Inhibition Liabilities in Drug Discovery”. In : *Drug Metabolism and Disposition* 48.11, p. 1147-1160. ISSN : 0090-9556, 1521-009X. DOI : [10 . 1124 / dmd . 120 . 000086](https://doi.org/10.1124/dmd.120.000086).
- HANNAN, Nicholas R. F. *et al.* (2013). “Production of Hepatocyte-like Cells from Human Pluripotent Stem Cells”. In : *Nature Protocols* 8.2, p. 430-437. ISSN : 1750-2799. DOI : [10 . 1038 / nprot . 2012 . 153](https://doi.org/10.1038/nprot.2012.153).

- HARRIS, Edward (2011). *Liver sinusoid of a Brown Rat with fenestrated endothelial cells. Sinusoidal width is about 5 microns. Original magnification is 10,000x . Note the microvilli of hepatocytes in the space of Disse external to the endothelium.*
- HARRISON, Sean Philip *et al.* (2021). “Liver Organoids: Recent Developments, Limitations and Potential”. In : *Frontiers in Medicine* 8, p. 574047. ISSN : 2296-858X. DOI : [10 . 3389/fmed.2021.574047](https://doi.org/10.3389/fmed.2021.574047).
- HARVARD NATURAL SCIENCES LECTURE DEMONSTRATIONS (2017). *Acoustic Standing Waves and the Levitation of Small Objects.*
- HE, Juan *et al.* (2022). “Functional Hepatobiliary Organoids Recapitulate Liver Development and Reveal Essential Drivers of Hepatobiliary Cell Fate Determination”. In : *Life Medicine* 1.3, p. 345-358. ISSN : 2755-1733. DOI : [10.1093/lifemedi/lnac055](https://doi.org/10.1093/lifemedi/lnac055).
- HE, Yu-Ting *et al.* (2020). “Creating Rat Hepatocyte Organoid as an in Vitro Model for Drug Testing”. In : *World Journal of Stem Cells* 12.10, p. 1184-1195. ISSN : 1948-0210. DOI : [10.4252/wjsc.v12.i10.1184](https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i10.1184).
- HEGDE, Manjunath *et al.* (2014). “Dynamic Interplay of Flow and Collagen Stabilizes Primary Hepatocytes Culture in a Microfluidic Platform”. In : *Lab Chip* 14.12, p. 2033-2039. ISSN : 1473-0197, 1473-0189. DOI : [10.1039/C4LC00071D](https://doi.org/10.1039/C4LC00071D).
- HIEMSTRA, Steven *et al.* (2019). “High-Throughput Confocal Imaging of Differentiated 3D Liver-like Spheroid Cellular Stress Response Reporters for Identification of Drug-Induced Liver Injury Liability”. In : *Archives of Toxicology* 93.10, p. 2895-2911. ISSN : 1432-0738. DOI : [10.1007/s00204-019-02552-0](https://doi.org/10.1007/s00204-019-02552-0).
- HOF, Lotta *et al.* (2021). “Long-Term Live Imaging and Multiscale Analysis Identify Heterogeneity and Core Principles of Epithelial Organoid Morphogenesis”. In : *BMC Biology* 19.1, p. 37. ISSN : 1741-7007. DOI : [10.1186/s12915-021-00958-w](https://doi.org/10.1186/s12915-021-00958-w).
- HONG, Gyusik *et al.* (2021). “Production of Multiple Cell-Laden Microtissue Spheroids with a Biomimetic Hepatic-Lobule-Like Structure”. In : *Advanced Materials* 33.36, p. 2102624. ISSN : 0935-9648, 1521-4095. DOI : [10.1002/adma.202102624](https://doi.org/10.1002/adma.202102624).
- HORN, Gabriele *et al.* (2023). “Human HepaRG Liver Spheroids: Cold Storage Protocol and Study on Pyridinium Oxime-Induced Hepatotoxicity in Vitro”. In : *Chemico-Biological Interactions* 369, p. 110285. ISSN : 0009-2797. DOI : [10.1016/j.cbi.2022.110285](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110285).
- HOU, Zewei *et al.* (2022). “Programmable Particles Patterning by Multifrequency Excitation Radiation Force of Acoustic Resonance Modes”. In : *International Journal of Mechanical Sciences*, p. 107232. ISSN : 0020-7403. DOI : [10.1016/j.ijmecsci.2022.107232](https://doi.org/10.1016/j.ijmecsci.2022.107232).
- HUCH, Meritxell *et al.* (2017). “The Hope and the Hype of Organoid Research”. In : *Development* 144.6, p. 938-941. ISSN : 0950-1991. DOI : [10.1242/dev.150201](https://doi.org/10.1242/dev.150201).
- HUVENEERS, Stephan et DE ROOIJ, Johan (2013). “Mechanosensitive Systems at the Cadherin-F-actin Interface”. In : *Journal of Cell Science* 126.2, p. 403-413. ISSN : 0021-9533. DOI : [10.1242/jcs.109447](https://doi.org/10.1242/jcs.109447).
- IANSANTE, Valeria *et al.* (2018). “A New High Throughput Screening Platform for Cell Encapsulation in Alginate Hydrogel Shows Improved Hepatocyte Functions by Mesen-

-
- chymal Stromal Cells Co-encapsulation”. In : *Frontiers in Medicine* 5. ISSN : 2296-858X. DOI : [10.3389/fmed.2018.00216](https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00216).
- IM, Gwang-Bum *et al.* (2022). “Subaqueous Free-Standing 3D Cell Culture System for Ultrafast Cell Compaction, Mechano-Inductive Immune Control, and Improving Therapeutic Angiogenesis”. In : *Bioengineering & Translational Medicine* n/a.n/a, e10438. ISSN : 2380-6761. DOI : [10.1002/btm2.10438](https://doi.org/10.1002/btm2.10438).
- ISHIKAWA, Jun *et al.* (2021). “Mechanical Homeostasis of Liver Sinusoid Is Involved in the Initiation and Termination of Liver Regeneration”. In : *Communications Biology* 4.1, p. 409. ISSN : 2399-3642. DOI : [10.1038/s42003-021-01936-2](https://doi.org/10.1038/s42003-021-01936-2).
- JAIN, Rakesh K. *et al.* (2005). “Engineering Vascularized Tissue”. In : *Nature Biotechnology* 23.7, p. 821-823. ISSN : 1087-0156. DOI : [10.1038/nbt0705-821](https://doi.org/10.1038/nbt0705-821).
- JARVINEN, Erkka *et al.* (2022). *3D Spheroid Primary Human Hepatocytes for Prediction of Cytochrome P450 and Drug Transporter Induction*. DOI : [10.1101/2022.10.30.514199](https://doi.org/10.1101/2022.10.30.514199).
- JEGER-MADIOT, Nathan *et al.* (2021). “Self-Organization and Culture of Mesenchymal Stem Cell Spheroids in Acoustic Levitation”. In : *Scientific Reports* 11.1, p. 8355. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/s41598-021-87459-6](https://doi.org/10.1038/s41598-021-87459-6).
- JEGER-MADIOT, Nathan *et al.* (2022). “Controlling the Force and the Position of Acoustic Traps with a Tunable Acoustofluidic Chip: Application to Spheroid Manipulations”. In : *The Journal of the Acoustical Society of America* 151.6, p. 4165. ISSN : 1520-8524. DOI : [10.1121/10.0011464](https://doi.org/10.1121/10.0011464).
- JIANG, Hu-Lin *et al.* (2010). “Roles of Spheroid Formation of Hepatocytes in Liver Tissue Engineering”. In : *International Journal of Stem Cells* 3.2, p. 69-73. ISSN : 2005-3606.
- JOHNSON, Michael *et al.* (2009). “Bubble Inclusion and Removal Using PDMS Membrane-Based Gas Permeation for Applications in Pumping, Valving and Mixing in Microfluidic Devices”. In : *Journal of Micromechanics and Microengineering* 19.9, p. 095011. ISSN : 0960-1317. DOI : [10.1088/0960-1317/19/9/095011](https://doi.org/10.1088/0960-1317/19/9/095011).
- KAMALIAN, Laleh *et al.* (2018). “The Utility of HepaRG Cells for Bioenergetic Investigation and Detection of Drug-Induced Mitochondrial Toxicity”. In : *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 53, p. 136-147. ISSN : 1879-3177. DOI : [10.1016/j.tiv.2018.08.001](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.08.001).
- KANABEKOVA, Perizat, KADYROVA, Adina et KULSHAROVA, Gulsim (2022). “Microfluidic Organ-on-a-Chip Devices for Liver Disease Modeling In Vitro”. In : *Micromachines* 13.3, p. 428. ISSN : 2072-666X. DOI : [10.3390/mi13030428](https://doi.org/10.3390/mi13030428).
- KANEBRATT, Kajsa P. et ANDERSSON, Tommy B. (2008a). “Evaluation of HepaRG Cells as an in Vitro Model for Human Drug Metabolism Studies”. In : *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 36.7, p. 1444-1452. ISSN : 1521-009X. DOI : [10.1124/dmd.107.020016](https://doi.org/10.1124/dmd.107.020016).
- (2008b). “HepaRG Cells as an in Vitro Model for Evaluation of Cytochrome P450 Induction in Humans”. In : *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 36.1, p. 137-145. ISSN : 1521-009X. DOI : [10.1124/dmd.107.017418](https://doi.org/10.1124/dmd.107.017418).

- KHEDR, Mogibelrahman M. S. *et al.* (2019). "Generation of Functional Hepatocyte 3D Discoids in an Acoustofluidic Bioreactor". In : *Biomicrofluidics* 13.1, p. 014112. ISSN : 1932-1058. DOI : [10.1063/1.5082603](https://doi.org/10.1063/1.5082603).
- KHETANI, Salman R. et BHATIA, Sangeeta N. (2008). "Microscale Culture of Human Liver Cells for Drug Development". In : *Nature Biotechnology* 26.1, p. 120-126. ISSN : 1546-1696. DOI : [10.1038/nbt1361](https://doi.org/10.1038/nbt1361).
- KHOLODENKO, Irina V. et YARYGIN, Konstantin N. (2017). "Cellular Mechanisms of Liver Regeneration and Cell-Based Therapies of Liver Diseases". In : *BioMed Research International* 2017. ISSN : 2314-6133. DOI : [10.1155/2017/8910821](https://doi.org/10.1155/2017/8910821).
- KIM, Esther J. Y., KOROTKEVICH, Ekaterina et HIRAGI, Takashi (2018). "Coordination of Cell Polarity, Mechanics and Fate in Tissue Self-organization". In : *Trends in Cell Biology* 28.7, p. 541-550. ISSN : 0962-8924. DOI : [10.1016/j.tcb.2018.02.008](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.008).
- KIM, Hyo Jin *et al.* (2023a). "In Vitro Generation of Luminal Vasculature in Liver Organoids: From Basic Vascular Biology to Vascularized Hepatic Organoids". In : *International Journal of Stem Cells* 16.1, p. 1-15. ISSN : 2005-3606. DOI : [10.15283/ijsc22154](https://doi.org/10.15283/ijsc22154).
- KIM, Lily *et al.* (2007). "A Practical Guide to Microfluidic Perfusion Culture of Adherent Mammalian Cells". In : *Lab on a Chip* 7.6, p. 681. ISSN : 1473-0197, 1473-0189. DOI : [10.1039/b704602b](https://doi.org/10.1039/b704602b).
- KIM, Mijin *et al.* (2018). "Three-Dimensional Spheroid Culture Increases Exosome Secretion from Mesenchymal Stem Cells". In : *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 15.4, p. 427-436. ISSN : 2212-5469. DOI : [10.1007/s13770-018-0139-5](https://doi.org/10.1007/s13770-018-0139-5).
- KIM, Seunggyu *et al.* (2022). "Acoustofluidic Stimulation of Functional Immune Cells in a Microreactor". In : *Advanced Science* n/a.n/a, p. 2105809. ISSN : 2198-3844. DOI : [10.1002/advs.202105809](https://doi.org/10.1002/advs.202105809).
- KIM, Sudong *et al.* (2021). "Harnessing Mechanobiology for Tissue Engineering". In : *Developmental Cell* 56.2, p. 180-191. ISSN : 1878-1551. DOI : [10.1016/j.devcel.2020.12.017](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.12.017).
- KIM, Yeo Cheon *et al.* (2023b). "Ultrasonic Traveling Waves for Near-Wall Positioning of Single Microbubbles in a Flowing Channel". In : *Ultrasound in Medicine & Biology*. ISSN : 0301-5629. DOI : [10.1016/j.ultrasmedbio.2022.11.018](https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2022.11.018).
- KING, Louis Vessot (1934). "On the Acoustic Radiation Pressure on Spheres". In : *Proceedings of the Royal Society of London. Series A - Mathematical and Physical Sciences* 147.861, p. 212-240. DOI : [10.1098/rspa.1934.0215](https://doi.org/10.1098/rspa.1934.0215).
- KOIDE, Nqri, SAKAGUCHI, Khosaku Z. et KOIDE, Yayoi (1989). "Multicellular Spheroids on Corn Dishes with Positively Charged Surfaces Der Other Nonadherent Environme". In : p. 9.
- KOJIMA, Nobuhiko, TAKEUCHI, Shoji et SAKAI, Yasuyuki (2011). "Establishment of Self-Organization System in Rapidly Formed Multicellular Heterospheroids". In : *Biomaterials* 32.26, p. 6059-6067. ISSN : 01429612. DOI : [10.1016/j.biomaterials.2011.04.081](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.081).
- KRATOCHWIL, Nicole A. *et al.* (2017). "Metabolic Profiling of Human Long-Term Liver Models and Hepatic Clearance Predictions from In Vitro Data Using Nonlinear Mixed-

-
- Effects Modeling”. In : *The AAPS Journal* 19.2, p. 534-550. ISSN : 1550-7416. DOI : [10.1208/s12248-016-0019-7](https://doi.org/10.1208/s12248-016-0019-7).
- KUMAR, Ashok, TRIPATHI, Anuj et JAIN, Shivali (2011). “Extracorporeal Bioartificial Liver for Treating Acute Liver Diseases”. In : *The Journal of Extra-corporeal Technology* 43.4, p. 195-206. ISSN : 0022-1058.
- KUMAR, Sanjay *et al.* (2006). “Viscoelastic Retraction of Single Living Stress Fibers and Its Impact on Cell Shape, Cytoskeletal Organization, and Extracellular Matrix Mechanics”. In : *Biophysical Journal* 90.10, p. 3762-3773. ISSN : 0006-3495. DOI : [10.1529/biophysj.105.071506](https://doi.org/10.1529/biophysj.105.071506).
- KUZNETSOVA, Larisa A. *et al.* (2009). “Multiple Three-Dimensional Mammalian Cell Aggregates Formed Away from Solid Substrata in Ultrasound Standing Waves”. In : *Biotechnology Progress* 25.3, p. 834-841. ISSN : 87567938, 15206033. DOI : [10.1002/btpr.164](https://doi.org/10.1002/btpr.164).
- KWAPISZEWSKA, Karina *et al.* (2012). *Integrated Passive Bubble Trap for Long-Term Cell Culture Microfluidic Systems*. DOI : [10.13140/2.1.4296.7045](https://doi.org/10.13140/2.1.4296.7045).
- LAACKMANN, Julian *et al.* (2011). “Experimental Investigation and Numerical Simulation of Spray Processes”. In : *Macromolecular Symposia* 302.1, p. 235-244. ISSN : 1521-3900. DOI : [10.1002/masy.201000091](https://doi.org/10.1002/masy.201000091).
- LANCASTER, Madeline A. et KNOBLICH, Juergen A. (2014). “Organogenesis in a Dish: Modeling Development and Disease Using Organoid Technologies”. In : *Science* 345.6194, p. 1247125. DOI : [10.1126/science.1247125](https://doi.org/10.1126/science.1247125).
- LAU, Skadi *et al.* (2022). “Differential Sensitivity of Assays for Determining Vein Endothelial Cell Senescence”. In : *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 81.3, p. 191-203. ISSN : 1386-0291. DOI : [10.3233/CH-211294](https://doi.org/10.3233/CH-211294).
- LAUSCHKE, Volker M. *et al.* (2019). “3D Primary Hepatocyte Culture Systems for Analyses of Liver Diseases, Drug Metabolism, and Toxicity: Emerging Culture Paradigms and Applications”. In : *Biotechnology Journal* 14.7, p. 1800347. ISSN : 1860-7314. DOI : [10.1002/biot.201800347](https://doi.org/10.1002/biot.201800347).
- LE VEE, Marc *et al.* (2006). “Functional Expression of Sinusoidal and Canalicular Hepatic Drug Transporters in the Differentiated Human Hepatoma HepaRG Cell Line”. In : *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 28.1-2, p. 109-117. ISSN : 0928-0987. DOI : [10.1016/j.ejps.2006.01.004](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.01.004).
- LECLERC, Eric, SAKAI, Yasuyuki et FUJII, Teruo (2003). “Cell Culture in 3-Dimensional Microfluidic Structure of PDMS (Polydimethylsiloxane)”. In : *Biomedical Microdevices* 5.2, p. 109-114. ISSN : 1572-8781. DOI : [10.1023/A:1024583026925](https://doi.org/10.1023/A:1024583026925).
- LECUIT, Thomas et YAP, Alpha S. (2015). “E-Cadherin Junctions as Active Mechanical Integrators in Tissue Dynamics”. In : *Nature Cell Biology* 17.5, p. 533-539. ISSN : 1476-4679. DOI : [10.1038/ncb3136](https://doi.org/10.1038/ncb3136).
- LEI, Junjun *et al.* (2018). “Effects of Micron Scale Surface Profiles on Acoustic Streaming”. In : *Microfluidics and Nanofluidics* 22.12, p. 1-14. ISSN : 1613-4990. DOI : [10.1007/s10404-018-2161-2](https://doi.org/10.1007/s10404-018-2161-2).

- LEITE, Sofia B. *et al.* (2012). “Three-Dimensional HepaRG Model As An Attractive Tool for Toxicity Testing”. In : *Toxicological Sciences* 130.1, p. 106-116. ISSN : 1096-6080. DOI : [10.1093/toxsci/kfs232](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs232).
- LENSHOF, Andreas *et al.* (2012). “Acoustofluidics 5: Building Microfluidic Acoustic Resonators”. In : *Lab on a Chip* 12.4, p. 684. ISSN : 1473-0197, 1473-0189. DOI : [10.1039/c1lc20996e](https://doi.org/10.1039/c1lc20996e).
- LEVAYER, Romain et LECUIT, Thomas (2012). “Biomechanical Regulation of Contractility: Spatial Control and Dynamics”. In : *Trends in Cell Biology* 22.2, p. 61-81. ISSN : 0962-8924. DOI : [10.1016/j.tcb.2011.10.001](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.10.001).
- LIM, Ryan *et al.* (2022). “Mechanotransduction through Adhesion Molecules: Emerging Roles in Regulating the Stem Cell Niche”. In : *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10, p. 966662. ISSN : 2296-634X. DOI : [10.3389/fcell.2022.966662](https://doi.org/10.3389/fcell.2022.966662).
- LIN, Ruei-Zeng *et al.* (2006). “Dynamic Analysis of Hepatoma Spheroid Formation: Roles of E-cadherin and B1-Integrin”. In : *Cell and Tissue Research* 324.3, p. 411-422. ISSN : 1432-0878. DOI : [10.1007/s00441-005-0148-2](https://doi.org/10.1007/s00441-005-0148-2).
- LIN, Ruei-Zhen et CHANG, Hwan-You (2008). “Recent Advances in Three-Dimensional Multicellular Spheroid Culture for Biomedical Research”. In : *Biotechnology Journal* 3.9-10, p. 1172-1184. ISSN : 1860-7314. DOI : [10.1002/biot.200700228](https://doi.org/10.1002/biot.200700228).
- LIU, Dan, CHEN, Sixun et WIN NAING, May (2021). “A Review of Manufacturing Capabilities of Cell Spheroid Generation Technologies and Future Development”. In : *Biotechnology and Bioengineering* 118.2, p. 542-554. ISSN : 1097-0290. DOI : [10.1002/bit.27620](https://doi.org/10.1002/bit.27620).
- LIU, Jian *et al.* (2007). “Functional Three-Dimensional HepG2 Aggregate Cultures Generated from an Ultrasound Trap: Comparison with HepG2 Spheroids”. In : *Journal of Cellular Biochemistry* 102.5, p. 1180-1189. ISSN : 1097-4644. DOI : [10.1002/jcb.21345](https://doi.org/10.1002/jcb.21345).
- LIU, Min *et al.* (2022). “State-of-the-Art Advancements in Liver-on-a-chip (LOC): Integrated Biosensors for LOC”. In : *Biosensors and Bioelectronics* 218, p. 114758. ISSN : 0956-5663. DOI : [10.1016/j.bios.2022.114758](https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114758).
- LIU, Niannian *et al.* (2018). “Damage Characteristics of Elastic Material through a Thin Membrane Using High-Intensity Focused Ultrasound (HIFU)”. In : *AIP Advances* 8.11, p. 115123. ISSN : 2158-3226. DOI : [10.1063/1.5050432](https://doi.org/10.1063/1.5050432).
- LLABJANI, Valon *et al.* (2022). “Introducing CELLBLOKS®: A Novel Organ-on-a-Chip Platform Allowing a Plug-and-Play Approach towards Building Organotypic Models”. In : *In vitro models* 1.6, p. 423-435. ISSN : 2731-3441. DOI : [10.1007/s44164-022-00027-8](https://doi.org/10.1007/s44164-022-00027-8).
- LOCHOVSKY, Conrad, YASOTHARAN, Sanjesh et GÜNTHER, Axel (2012). “Bubbles No More: In-Plane Trapping and Removal of Bubbles in Microfluidic Devices”. In : *Lab Chip* 12.3, p. 595-601. ISSN : 1473-0197, 1473-0189. DOI : [10.1039/C1LC20817A](https://doi.org/10.1039/C1LC20817A).
- LU, Tingli, LI, Yuhui et CHEN, Tao (2013). “Techniques for Fabrication and Construction of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering”. In : *International Journal of Nanomedicine* 8.1, p. 337-350. DOI : [10.2147/IJN.S38635](https://doi.org/10.2147/IJN.S38635).
- LÜBBERSTEDT, Marc *et al.* (2011). “HepaRG Human Hepatic Cell Line Utility as a Surrogate for Primary Human Hepatocytes in Drug Metabolism Assessment in Vitro”. In : *Journal*

-
- of *Pharmacological and Toxicological Methods* 63.1, p. 59-68. ISSN : 1056-8719. DOI : [10.1016/j.vascn.2010.04.013](https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.04.013).
- LUCE, Eléonor *et al.* (2021). “[Hepatic organoids: What are the challenges?”] In : *Medicine Sciences: M/S* 37.10, p. 902-909. ISSN : 1958-5381. DOI : [10.1051/medsci/2021119](https://doi.org/10.1051/medsci/2021119).
- LUEBKE-WHEELER, Jennifer L. *et al.* (2009). “E-Cadherin Protects Primary Hepatocyte Spheroids from Cell Death by a Caspase-Independent Mechanism”. In : *Cell Transplantation* 18.12, p. 1281-1287. ISSN : 1555-3892. DOI : [10.3727/096368909X474258](https://doi.org/10.3727/096368909X474258).
- LUO, Yong *et al.* (2022). “Integrated Acoustic Chip for Culturing 3D Cell Arrays”. In : *ACS Sensors*. DOI : [10.1021/acssensors.2c01103](https://doi.org/10.1021/acssensors.2c01103).
- MA, Zhichao *et al.* (2020). “Acoustic Holographic Cell Patterning in a Biocompatible Hydrogel”. In : *Advanced Materials* 32.4, p. 1904181. ISSN : 1521-4095. DOI : [10.1002/adma.201904181](https://doi.org/10.1002/adma.201904181).
- MANDON, Marion *et al.* (2019). “Three-Dimensional HepaRG Spheroids as a Liver Model to Study Human Genotoxicity in Vitro with the Single Cell Gel Electrophoresis Assay”. In : *Scientific Reports* 9.1, p. 10548. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/s41598-019-47114-7](https://doi.org/10.1038/s41598-019-47114-7).
- MANUAL, MSD (2022). “View of the Liver and Gallbladder - Liver and Gallbladder Disorders”. In : *MSD Manual*.
- MARSHALL, Jeffrey S. *et al.* (2015). “Acoustic Streaming, Fluid Mixing, and Particle Transport by a Gaussian Ultrasound Beam in a Cylindrical Container”. In : *Physics of Fluids* 27.10, p. 103601. ISSN : 1070-6631. DOI : [10.1063/1.4932232](https://doi.org/10.1063/1.4932232).
- MARZO, Asier, BARNES, Adrian *et al.* (2017). “TinyLev: A Multi-Emitter Single-Axis Acoustic Levitator”. In : *Review of Scientific Instruments* 88.8, p. 085105. ISSN : 0034-6748. DOI : [10.1063/1.4989995](https://doi.org/10.1063/1.4989995).
- MATA, Alvaro, FLEISCHMAN, Aaron J. *et al.* (2005). “Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems”. In : *Biomedical Microdevices* 7.4, p. 281-293. ISSN : 1572-8781. DOI : [10.1007/s10544-005-6070-2](https://doi.org/10.1007/s10544-005-6070-2).
- MATSUI, Toshikatsu *et al.* (2021). “Human Organoids for Predictive Toxicology Research and Drug Development”. In : *Frontiers in Genetics* 12, p. 767621. ISSN : 1664-8021. DOI : [10.3389/fgene.2021.767621](https://doi.org/10.3389/fgene.2021.767621).
- MATSUMOTO, Kunio *et al.* (2001). “Liver Organogenesis Promoted by Endothelial Cells Prior to Vascular Function”. In : *Science (New York, N.Y.)* 294.5542, p. 559-563. ISSN : 0036-8075. DOI : [10.1126/science.1063889](https://doi.org/10.1126/science.1063889).
- MAYATI, Abdullah *et al.* (2018). “Functional Polarization of Human Hepatoma HepaRG Cells in Response to Forskolin”. In : *Scientific Reports* 8.1, p. 16115. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/s41598-018-34421-8](https://doi.org/10.1038/s41598-018-34421-8).
- MEIRINHO, Sara *et al.* (2022). “Study of the Metabolic Stability Profiles of Perampanel, Rufinamide and Stiripentol and Prediction of Drug Interactions Using HepaRG Cells as an in Vitro Human Model”. In : *Toxicology in Vitro* 82, p. 105389. ISSN : 0887-2333. DOI : [10.1016/j.tiv.2022.105389](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105389).

- MENG, Dennis D., KIM, Joonwon et KIM, Chang-Jin (2006). "A Degassing Plate with Hydrophobic Bubble Capture and Distributed Venting for Microfluidic Devices". In : *Journal of Micromechanics and Microengineering* 16.2, p. 419-424. ISSN : 0960-1317. DOI : [10.1088/0960-1317/16/2/028](https://doi.org/10.1088/0960-1317/16/2/028).
- MENG, Long *et al.* (2011). "Transportation of Single Cell and Microbubbles by Phase-Shift Introduced to Standing Leaky Surface Acoustic Waves". In : *Biomicrofluidics* 5.4, p. 044104-044104-10. ISSN : 1932-1058. DOI : [10.1063/1.3652872](https://doi.org/10.1063/1.3652872).
- MIAO, Tingkuan *et al.* (2023). "High-Throughput Fabrication of Cell Spheroids with 3D Acoustic Assembly Devices". In : *International Journal of Bioprinting* 0.0. DOI : [10.18063/ijb.733](https://doi.org/10.18063/ijb.733).
- MICHALOPOULOS, George K. (2007). "Liver Regeneration". In : *Journal of Cellular Physiology* 213.2, p. 286-300. ISSN : 1097-4652. DOI : [10.1002/jcp.21172](https://doi.org/10.1002/jcp.21172).
- MIŁOWSKA, Katarzyna et GABRYELAK, Teresa (2007). "Reactive Oxygen Species and DNA Damage after Ultrasound Exposure". In : *Biomolecular Engineering* 24.2, p. 263-267. ISSN : 1389-0344. DOI : [10.1016/j.bioeng.2007.02.001](https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.02.001).
- MOGHE, Prabhas V. *et al.* (1997). "Cell-Cell Interactions Are Essential for Maintenance of Hepatocyte Function in Collagen Gel but Not on Matrigel". In : *Biotechnology and Bioengineering* 56.6, p. 706-711. ISSN : 0006-3592. DOI : [10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19971220\)56:6<706::AID-BIT14>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19971220)56:6<706::AID-BIT14>3.0.CO;2-5).
- MONCKTON, Chase P., BROWN, Grace E. et KHETANI, Salman R. (2021). "Latest Impact of Engineered Human Liver Platforms on Drug Development". In : *APL bioengineering* 5.3, p. 031506. ISSN : 2473-2877. DOI : [10.1063/5.0051765](https://doi.org/10.1063/5.0051765).
- MORALES-NAVARRETE, Hernán *et al.* (2019). "Liquid-Crystal Organization of Liver Tissue". In : *eLife* 8. Sous la dir. de Pierre SENS, Arup K CHAKRABORTY et Benoit LADOUX, e44860. ISSN : 2050-084X. DOI : [10.7554/eLife.44860](https://doi.org/10.7554/eLife.44860).
- MOSCOVITZ, Jamie E. *et al.* (2018). "Establishing Transcriptional Signatures to Differentiate PXR-, CAR-, and AhR-Mediated Regulation of Drug Metabolism and Transport Genes in Cryopreserved Human Hepatocytes". In : *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 365.2, p. 262-271. ISSN : 0022-3565, 1521-0103. DOI : [10.1124/jpet.117.247296](https://doi.org/10.1124/jpet.117.247296).
- MOSHKSAYAN, Khashayar *et al.* (2018). "Spheroids-on-a-Chip: Recent Advances and Design Considerations in Microfluidic Platforms for Spheroid Formation and Culture". In : *Sensors and Actuators B: Chemical* 263, p. 151-176. ISSN : 0925-4005. DOI : [10.1016/j.snb.2018.01.223](https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.01.223).
- MUÑOZ-CHÁPULI, Ramón *et al.* (2005). "The Origin of the Endothelial Cells: An Evo-Devo Approach for the Invertebrate/Vertebrate Transition of the Circulatory System". In : *Evolution & Development* 7.4, p. 351-358. ISSN : 1520-541X. DOI : [10.1111/j.1525-142X.2005.05040.x](https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2005.05040.x).
- MUN, Seon Ju *et al.* (2019). "Generation of Expandable Human Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocyte-like Liver Organoids". In : *Journal of Hepatology* 71.5, p. 970-985. ISSN : 0168-8278. DOI : [10.1016/j.jhep.2019.06.030](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.06.030).

-
- NAGAMOTO, Yasuhito *et al.* (2016). “Transplantation of a Human iPSC-derived Hepatocyte Sheet Increases Survival in Mice with Acute Liver Failure”. In : *Journal of Hepatology* 64.5, p. 1068-1075. ISSN : 1600-0641. DOI : [10.1016/j.jhep.2016.01.004](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.004).
- NAKAMURA, Kouhei *et al.* (2014). “ROCK Inhibitor Y-27632 Maintains the Proliferation of Confluent Human Mesenchymal Stem Cells”. In : *Journal of Periodontal Research* 49.3, p. 363-370. ISSN : 1600-0765. DOI : [10.1111/jre.12114](https://doi.org/10.1111/jre.12114).
- NAKAO, Masamitsu *et al.* (2019). “Deteriorated Outcome of Recent Patients with Acute Liver Failure and Late-Onset Hepatic Failure Caused by Infection with Hepatitis A Virus: A Subanalysis of Patients Seen between 1998 and 2015 and Enrolled in Nationwide Surveys in Japan”. In : *Hepatology Research* 49.8, p. 844-852. ISSN : 1872-034X. DOI : [10.1111/hepr.13345](https://doi.org/10.1111/hepr.13345).
- NIBOURG, Geert A. A. *et al.* (2012). “Liver Progenitor Cell Line HepaRG Differentiated in a Bioartificial Liver Effectively Supplies Liver Support to Rats with Acute Liver Failure”. In : *PLOS ONE* 7.6, e38778. ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0038778](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038778).
- NOVOTNY, Jakub, LENSCHOF, Andreas et LAURELL, Thomas (2021). “Acoustofluidic Platforms for Particle Manipulation”. In : *ELECTROPHORESIS* n/a.n/a. ISSN : 1522-2683. DOI : [10.1002/elps.202100291](https://doi.org/10.1002/elps.202100291).
- OBER, Elke A. et LEMAIGRE, Frédéric P. (2018). “Development of the Liver: Insights into Organ and Tissue Morphogenesis”. In : *Journal of Hepatology* 68.5, p. 1049-1062. ISSN : 01688278. DOI : [10.1016/j.jhep.2018.01.005](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.005).
- OLGASI, Cristina, CUCCI, Alessia et FOLLENZI, Antonia (2020). “iPSC-Derived Liver Organoids: A Journey from Drug Screening, to Disease Modeling, Arriving to Regenerative Medicine”. In : *International Journal of Molecular Sciences* 21.17, p. 6215. ISSN : 1422-0067. DOI : [10.3390/ijms21176215](https://doi.org/10.3390/ijms21176215).
- OLMOS, Carol M. *et al.* (2019). “Epoxy Resin Mold and PDMS Microfluidic Devices through Photopolymer Flexographic Printing Plate”. In : *Sensors and Actuators B: Chemical* 288, p. 742-748. ISSN : 0925-4005. DOI : [10.1016/j.snb.2019.03.062](https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.03.062).
- OLOFSSON, Karl, HAMMARSTRÖM, Björn et WIKLUND, Martin (2018). “Ultrasonic Based Tissue Modelling and Engineering”. In : *Micromachines* 9.11. ISSN : 2072-666X. DOI : [10.3390/mi9110594](https://doi.org/10.3390/mi9110594).
- PARK, Dong Hyeok *et al.* (2018). “Development of a Microfluidic Perfusion 3D Cell Culture System”. In : *Journal of Micromechanics and Microengineering* 28.4, p. 045001. ISSN : 0960-1317. DOI : [10.1088/1361-6439/aaa877](https://doi.org/10.1088/1361-6439/aaa877).
- PARK, Jung Hwan (2023). *Subaqueous 3D Stem Cell Spheroid Levitation Culture Using Anti-Gravity Bioreactor Based on Sound Wave Superposition*. <https://www.researchsquare.com>. DOI : [10.21203/rs.3.rs-2528105/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2528105/v1).
- PARK, Jung Hwan *et al.* (2023). “Subaqueous 3D Stem Cell Spheroid Levitation Culture Using Anti-Gravity Bioreactor Based on Sound Wave Superposition”. In : *Biomaterials Research* 27.1, p. 51. ISSN : 2055-7124. DOI : [10.1186/s40824-023-00383-w](https://doi.org/10.1186/s40824-023-00383-w).

- PARSONS, Thomas J., HORWITZ, Alan Rick et SCHWARTZ, Martin A. (2010). "Cell Adhesion: Integrating Cytoskeletal Dynamics and Cellular Tension". In : *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11.9, p. 633-643. ISSN : 1471-0080. DOI : [10.1038/nrm2957](https://doi.org/10.1038/nrm2957).
- PATRA, Bishnubrata *et al.* (2014). "Migration and Vascular Lumen Formation of Endothelial Cells in Cancer Cell Spheroids of Various Sizes". In : *Biomicrofluidics* 8.5, p. 052109. ISSN : 1932-1058. DOI : [10.1063/1.4895568](https://doi.org/10.1063/1.4895568).
- PEREIRO, Iago *et al.* (2019). "Nip the Bubble in the Bud: A Guide to Avoid Gas Nucleation in Microfluidics". In : *Lab on a Chip* 19.14, p. 2296-2314. ISSN : 1473-0189. DOI : [10.1039/C9LC00211A](https://doi.org/10.1039/C9LC00211A).
- PRIOR, Nicole, INACIO, Patricia et HUCH, Meritxell (2019). "Liver Organoids: From Basic Research to Therapeutic Applications". In : *Gut* 68, gutjnl-2019. DOI : [10.1136/gutjnl-2019-319256](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319256).
- RAMACHANDRAN, Sarada D. *et al.* (2015). "In Vitro Generation of Functional Liver Organoid-Like Structures Using Adult Human Cells". In : *PLOS ONE* 10.10, e0139345. ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0139345](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139345).
- RAMAIAHGARI, Sreenivasa C. *et al.* (2017). "From the Cover: Three-Dimensional (3D) HepaRG Spheroid Model With Physiologically Relevant Xenobiotic Metabolism Competence and Hepatocyte Functionality for Liver Toxicity Screening". In : *Toxicological Sciences* 159.1, p. 124-136. ISSN : 1096-6080. DOI : [10.1093/toxsci/kfx122](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx122).
- RAMBOER, Eva *et al.* (2015a). "Development and Characterization of a New Human Hepatic Cell Line". In : *EXCLI Journal* 14, p. 875-889. ISSN : 1611-2156. DOI : [10.17179/excli2015-424](https://doi.org/10.17179/excli2015-424).
- RAMBOER, Eva *et al.* (2015b). "Immortalized Human Hepatic Cell Lines for In Vitro Testing and Research Purposes". In : *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1250, p. 53-76. ISSN : 1940-6029. DOI : [10.1007/978-1-4939-2074-7_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_4).
- RISBUD, Makarand V. *et al.* (2003). "Hydrogel-Coated Textile Scaffolds as Candidate in Liver Tissue Engineering: II. Evaluation of Spheroid Formation and Viability of Hepatocytes". In : *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 14.7, p. 719-731. ISSN : 0920-5063. DOI : [10.1163/156856203322274969](https://doi.org/10.1163/156856203322274969).
- ROCKEY, Don C., HOUSSET, C. N. et FRIEDMAN, S. L. (1993). "Activation-Dependent Contractility of Rat Hepatic Lipocytes in Culture and in Vivo." In : *The Journal of Clinical Investigation* 92.4, p. 1795-1804. ISSN : 0021-9738. DOI : [10.1172/JCI116769](https://doi.org/10.1172/JCI116769).
- ROSE, Sophie *et al.* (2021). "DMSO-free Highly Differentiated HepaRG Spheroids for Chronic Toxicity, Liver Functions and Genotoxicity Studies". In : *Archives of Toxicology*. ISSN : 0340-5761, 1432-0738. DOI : [10.1007/s00204-021-03178-x](https://doi.org/10.1007/s00204-021-03178-x).
- ROSSI, Giuliana, MANFRIN, Andrea et LUTOLF, Matthias P. (2018). "Progress and Potential in Organoid Research". In : *Nature Reviews Genetics* 19.11, p. 671-687. ISSN : 1471-0064. DOI : [10.1038/s41576-018-0051-9](https://doi.org/10.1038/s41576-018-0051-9).
- ROY-CHOWDHURY, Jayanta, LOCKER, Joseph et ROY-CHOWDHURY, Namita (2003). "Nuclear Receptors Orchestrate Detoxification Pathways". In : *Developmental Cell* 4.5, p. 607-608. ISSN : 1534-5807. DOI : [10.1016/s1534-5807\(03\)00131-x](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00131-x).

-
- SACKMANN, Eric K., FULTON, Anna L. et BEEBE, David J. (2014). “The Present and Future Role of Microfluidics in Biomedical Research”. In : *Nature* 507.7491, p. 181-189. ISSN : 1476-4687. DOI : [10.1038/nature13118](https://doi.org/10.1038/nature13118).
- SAKAI, Yusuke *et al.* (2013). “Rapid Fabricating Technique for Multi-Layered Human Hepatic Cell Sheets by Forceful Contraction of the Fibroblast Monolayer”. In : *PLOS ONE* 8.7, e70970. ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0070970](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070970).
- SALERNO, Simona *et al.* (2018). “Gas Permeable Membrane Bioreactor for the Co-Culture of Human Skin Derived Mesenchymal Stem Cells with Hepatocytes and Endothelial Cells”. In : *Journal of Membrane Science* 563, p. 694-707. ISSN : 0376-7388. DOI : [10.1016/j.memsci.2018.06.029](https://doi.org/10.1016/j.memsci.2018.06.029).
- SAMPAZIOTIS, Fotios, SEGERITZ, Charis-Patricia et VALLIER, Ludovic (2015). “Potential of Human Induced Pluripotent Stem Cells in Studies of Liver Disease”. In : *Hepatology* 62.1, p. 303-311. ISSN : 1527-3350. DOI : [10.1002/hep.27651](https://doi.org/10.1002/hep.27651).
- SASAI, Yoshiki (2013). “Cytosystems Dynamics in Self-Organization of Tissue Architecture”. In : *Nature* 493.7432, p. 318-326. ISSN : 1476-4687. DOI : [10.1038/nature11859](https://doi.org/10.1038/nature11859).
- SASIKUMAR, Shyama *et al.* (2020). “3D Hepatic Mimics – the Need for a Multicentric Approach”. In : *Biomedical Materials* 15.5, p. 052002. ISSN : 1748-605X. DOI : [10.1088/1748-605X/ab971c](https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab971c).
- SCHEPERS, Arnout *et al.* (2016). “Engineering a Perfusable 3D Human Liver Platform from iPS Cells”. In : *Lab on a Chip* 16.14, p. 2644-2653. ISSN : 1473-0189. DOI : [10.1039/C6LC00598E](https://doi.org/10.1039/C6LC00598E).
- SEGLÉN, Per O. (1976). “Preparation of Isolated Rat Liver Cells”. In : *Methods in Cell Biology* 13, p. 29-83. ISSN : 0091-679X. DOI : [10.1016/s0091-679x\(08\)61797-5](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61797-5).
- SHARANEK, Ahmad *et al.* (2016). “Rho-Kinase/Myosin Light Chain Kinase Pathway Plays a Key Role in the Impairment of Bile Canaliculi Dynamics Induced by Cholestatic Drugs”. In : *Scientific Reports* 6.1, p. 24709. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/srep24709](https://doi.org/10.1038/srep24709).
- SHARMA, Ayushman et DIETZ, Allan B. (2020). *Harvest and Culture of Porcine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Autologous Transplantation*. DOI : [10.1101/2020.06.25.169367](https://doi.org/10.1101/2020.06.25.169367).
- SHOURABI, Arash (2021). “A Proof-of-Concept Study Using Numerical Simulations of an Acoustic Spheroid-on-a-Chip Platform for Improving 3D Cell Culture”. In.
- SILVA, Claudia *et al.* (2018). *Bioreactors for Stem Cell Expansion and Differentiation*. Boca Raton : CRC Press. ISBN : 978-0-429-45314-4. DOI : [10.1201/9780429453144](https://doi.org/10.1201/9780429453144).
- SILVA, Glauber T. et BRUUS, Henrik (2014). “Acoustic Interaction Forces between Small Particles in an Ideal Fluid”. In : *Physical Review E* 90.6, p. 063007. DOI : [10.1103/PhysRevE.90.063007](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.90.063007).
- SKELLEY, Alison M. et VOLDMAN, Joel (2008). “An Active Bubble Trap and Debubbler for Microfluidic Systems”. In : *Lab on a Chip* 8.10, p. 1733. ISSN : 1473-0197, 1473-0189. DOI : [10.1039/b807037g](https://doi.org/10.1039/b807037g).
- SOTO, Fernando *et al.* (2021). “Emerging Biofabrication Approaches for Gastrointestinal Organoids towards Patient Specific Cancer Models”. In : *Cancer Letters* 504, p. 116-124. ISSN : 0304-3835. DOI : [10.1016/j.canlet.2021.01.023](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.01.023).

- SOTO-GUTIERREZ, Alejandro *et al.* (2010). "Engineering of an Hepatic Organoid to Develop Liver Assist Devices". In : *Cell Transplantation* 19.6-7, p. 815-822. ISSN : 0963-6897. DOI : [10.3727/096368910X508933](https://doi.org/10.3727/096368910X508933).
- SPENGLER, Johannes F., COAKLEY, William T. et CHRISTENSEN, Kenneth T. (2003). "Microstreaming Effects on Particle Concentration in an Ultrasonic Standing Wave". In : *AIChE Journal* 49.11, p. 2773-2782. ISSN : 1547-5905. DOI : [10.1002/aic.690491110](https://doi.org/10.1002/aic.690491110).
- STAMP, Melanie E. M. *et al.* (2016). "Acoustotaxis – in Vitro Stimulation in a Wound Healing Assay Employing Surface Acoustic Waves". In : *Biomaterials Science* 4.7, p. 1092-1099. ISSN : 2047-4849. DOI : [10.1039/C6BM00125D](https://doi.org/10.1039/C6BM00125D).
- STHIJNS, Mireille M. J. P. E., LAPOINTE, Vanessa L. S. et VAN BLITTERSWIJK, Clemens A. (2019). "Building Complex Life Through Self-Organization". In : *Tissue Engineering. Part A* 25.19-20, p. 1341-1346. ISSN : 1937-335X. DOI : [10.1089/ten.TEA.2019.0208](https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2019.0208).
- STROBEL, Hannah A., MOSS, Sarah M. et HOYING, James B. (2022). "Methods for Vasculari- zation and Perfusion of Tissue Organoids". In : *Mammalian Genome*. ISSN : 1432-1777. DOI : [10.1007/s00335-022-09951-2](https://doi.org/10.1007/s00335-022-09951-2).
- SUGIER, Hugo R. *et al.* (2023). "Feasibility of an Acoustophoresis-Based System for a High- Throughput Cell Washing: Application to Bioproduction". In : *Cytotherapy* 25.8, p. 891- 899. ISSN : 1465-3249. DOI : [10.1016/j.jcyt.2023.05.003](https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2023.05.003).
- SURI, Csaba *et al.* (2002). "Chaotic Mixing Generated by Acoustic Streaming". In : *Ultrasonics* 40.1, p. 393-396. ISSN : 0041-624X. DOI : [10.1016/S0041-624X\(02\)00150-6](https://doi.org/10.1016/S0041-624X(02)00150-6).
- SWIFT, Brandon, PFEIFER, Nathan D. et BROUWER, Kim L. R. (2010). "Sandwich-Cultured Hepatocytes: An in Vitro Model to Evaluate Hepatobiliary Transporter-Based Drug Interactions and Hepatotoxicity". In : *Drug Metabolism Reviews* 42.3, p. 446-471. ISSN : 1097-9883. DOI : [10.3109/03602530903491881](https://doi.org/10.3109/03602530903491881).
- TAIT, Angela *et al.* (2019). "Engineering Multi-Layered Tissue Constructs Using Acoustic Levitation". In : *Scientific Reports* 9.1, p. 9789. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/s41598-019-46201-z](https://doi.org/10.1038/s41598-019-46201-z).
- TAKAHASHI, Kazutoshi et YAMANAKA, Shinya (2006). "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors". In : *Cell* 126.4, p. 663-676. ISSN : 0092-8674, 1097-4172. DOI : [10.1016/j.cell.2006.07.024](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024).
- TAKAHASHI, Yu *et al.* (2015). "3D Spheroid Cultures Improve the Metabolic Gene Expression Profiles of HepaRG Cells". In : *Bioscience Reports* 35.3, e00208. ISSN : 1573-4935. DOI : [10.1042/BSR20150034](https://doi.org/10.1042/BSR20150034).
- TAKEBE, Takanori, ZHANG, Boyang et RADISIC, Milica (2017). "Synergistic Engineering: Or- ganoids Meet Organs-on-a-Chip". In : *Cell Stem Cell* 21.3, p. 297-300. ISSN : 19345909. DOI : [10.1016/j.stem.2017.08.016](https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.08.016).
- TAKEBE, Takanori *et al.* (2012). "Self-Organization of Human Hepatic Organoid by Recapi- tulating Organogenesis In Vitro". In : *Transplantation Proceedings* 44.4, p. 1018-1020. ISSN : 0041-1345. DOI : [10.1016/j.transproceed.2012.02.007](https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.02.007).

-
- TAKEBE, Takanori *et al.* (2013). “Vascularized and Functional Human Liver from an iPSC-derived Organ Bud Transplant”. In : *Nature* 499.7459, p. 481-484. ISSN : 1476-4687. DOI : [10.1038/nature12271](https://doi.org/10.1038/nature12271).
- TAKEBE, Takanori *et al.* (2017). “Massive and Reproducible Production of Liver Buds Entirely from Human Pluripotent Stem Cells”. In : *Cell Reports* 21.10, p. 2661-2670. ISSN : 2211-1247. DOI : [10.1016/j.celrep.2017.11.005](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.005).
- TAKEISHI, Kazuki *et al.* (2020). “Assembly and Function of a Bioengineered Human Liver for Transplantation Generated Solely from Induced Pluripotent Stem Cells”. In : *Cell Reports* 31.9, p. 107711. ISSN : 2211-1247. DOI : [10.1016/j.celrep.2020.107711](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107711).
- TASCHER, Georg *et al.* (2019). “In-Depth Proteome Analysis Highlights HepaRG Cells as a Versatile Cell System Surrogate for Primary Human Hepatocytes”. In : *Cells* 8.2, p. 192. ISSN : 2073-4409. DOI : [10.3390/cells8020192](https://doi.org/10.3390/cells8020192).
- TATSUMI, Kohei et OKANO, Teruo (2017). “Hepatocyte Transplantation: Cell Sheet Technology for Liver Cell Transplantation”. In : *Current Transplantation Reports* 4.3, p. 184-192. ISSN : 2196-3029. DOI : [10.1007/s40472-017-0156-7](https://doi.org/10.1007/s40472-017-0156-7).
- TEN DAM, Marjolein J. M. *et al.* (2023). “Toward Transplantation of Liver Organoids: From Biology and Ethics to Cost-effective Therapy”. In : *Transplantation*. ISSN : 1534-6080. DOI : [10.1097/TP.0000000000004520](https://doi.org/10.1097/TP.0000000000004520).
- TENG, Yao *et al.* (2021). “A Scalable and Sensitive Steatosis Chip with Long-Term Perfusion of in Situ Differentiated HepaRG Organoids”. In : *Biomaterials* 275, p. 120904. ISSN : 0142-9612. DOI : [10.1016/j.biomaterials.2021.120904](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120904).
- TEVLEK, Atakan *et al.* (2023). “Spheroid Engineering in Microfluidic Devices”. In : *ACS Omega*. DOI : [10.1021/acsomega.2c06052](https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06052).
- THIRISANGU, Jeyapradhap, HEMACHANDRAN, E. et SUBRAMANI, Karthick (2023). *Suspending Droplets beyond the Rayleigh Limit: The Interplay of Acoustic and Gravity Forces*. DOI : [10.48550/arXiv.2308.04088](https://doi.org/10.48550/arXiv.2308.04088). arXiv : [2308.04088 \[physics\]](https://arxiv.org/abs/2308.04088).
- TILLES, Arno W. *et al.* (2001). “Effects of Oxygenation and Flow on the Viability and Function of Rat Hepatocytes Cocultured in a Microchannel Flat-Plate Bioreactor”. In : *Biotechnology and Bioengineering* 73.5, p. 379-389. ISSN : 0006-3592. DOI : [10.1002/bit.1071](https://doi.org/10.1002/bit.1071).
- TREFTS, Elijah, GANNON, Maureen et WASSERMAN, David H. (2017). “The Liver”. In : *Current Biology* 27.21, R1147-R1151. ISSN : 0960-9822. DOI : [10.1016/j.cub.2017.09.019](https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019).
- TSAI, Ang-Chen *et al.* (2015). “Compaction, Fusion, and Functional Activation of Three-Dimensional Human Mesenchymal Stem Cell Aggregate”. In : *Tissue Engineering Part A* 21.9-10, p. 1705-1719. ISSN : 1937-3341. DOI : [10.1089/ten.tea.2014.0314](https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0314).
- TZANAKAKIS, Emmanouhl S., HANSEN, Linda K. et HU, Wei-Shou (2001). “The Role of Actin Filaments and Microtubules in Hepatocyte Spheroid Self-Assembly”. In : *Cell Motility* 48.3, p. 175-189. ISSN : 1097-0169. DOI : [10.1002/1097-0169\(200103\)48:3<175::AID-CM1007>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0169(200103)48:3<175::AID-CM1007>3.0.CO;2-2).

- UCCELLI, Antonio, MORETTA, Lorenzo et PISTOIA, Vito (2008). "Mesenchymal Stem Cells in Health and Disease". In : *Nature Reviews Immunology* 8.9, p. 726-736. ISSN : 1474-1741. DOI : [10.1038/nri2395](https://doi.org/10.1038/nri2395).
- ULVESTAD, Maria *et al.* (2012). "Evaluation of Organic Anion-Transporting Polypeptide 1B1 and CYP3A4 Activities in Primary Human Hepatocytes and HepaRG Cells Cultured in a Dynamic Three-Dimensional Bioreactor System". In : *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 343.1, p. 145-156. ISSN : 1521-0103. DOI : [10.1124/jpet.112.195750](https://doi.org/10.1124/jpet.112.195750).
- UN, Keita *et al.* (2011). "Involvement of Activated Transcriptional Process in Efficient Gene Transfection Using Unmodified and Mannose-Modified Bubble Lipoplexes with Ultrasound Exposure". In : *Journal of Controlled Release* 156.3, p. 355-363. ISSN : 0168-3659. DOI : [10.1016/j.jconrel.2011.06.040](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.040).
- VAN DER HOVEN, Ben, GOMMERS, Diederik et BAKKER, Jan (2007). "Critical Illness and the Hepatic Microcirculation: A Review". In : *Intensive Care Medicine: Annual Update 2007*, p. 643-650. DOI : [10.1007/978-3-540-49433-1_57](https://doi.org/10.1007/978-3-540-49433-1_57).
- VANHERBERGHE, Bruno *et al.* (2010). "Ultrasound-Controlled Cell Aggregation in a Multi-Well Chip". In : *Lab on a Chip* 10.20, p. 2727-2732. DOI : [10.1039/C004707D](https://doi.org/10.1039/C004707D).
- VARGAS-VALDERRAMA, Alejandra *et al.* (2020). "The Endothelium, a Key Actor in Organ Development and hPSC-derived Organoid Vascularization". In : *Journal of Biomedical Science* 27.1, p. 67. ISSN : 1423-0127. DOI : [10.1186/s12929-020-00661-y](https://doi.org/10.1186/s12929-020-00661-y).
- VAROL, Rahmetullah *et al.* (2022). "Acousto-Holographic Reconstruction of Whole-Cell Stiffness Maps". In : *Nature Communications* 13.1, p. 7351. ISSN : 2041-1723. DOI : [10.1038/s41467-022-35075-x](https://doi.org/10.1038/s41467-022-35075-x).
- VIANELLO, Stefano et LUTOLF, Matthias P. (2019). "Understanding the Mechanobiology of Early Mammalian Development through Bioengineered Models". In : *Developmental Cell* 48.6, p. 751-763. ISSN : 1534-5807. DOI : [10.1016/j.devcel.2019.02.024](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.02.024).
- VOLK, Andreas *et al.* (2015). "Growth Control of Sessile Microbubbles in PDMS Devices". In : *Lab on a Chip* 15.24, p. 4607-4613. ISSN : 1473-0189. DOI : [10.1039/C5LC00982K](https://doi.org/10.1039/C5LC00982K).
- VORRINK, Sabine U. *et al.* (2017). "Endogenous and Xenobiotic Metabolic Stability of Primary Human Hepatocytes in Long-Term 3D Spheroid Cultures Revealed by a Combination of Targeted and Untargeted Metabolomics". In : *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 31.6, p. 2696-2708. ISSN : 1530-6860. DOI : [10.1096/fj.201601375R](https://doi.org/10.1096/fj.201601375R).
- VYAS, Dipen *et al.* (2018). "Self-Assembled Liver Organoids Recapitulate Hepatobiliary Organogenesis in Vitro". In : *Hepatology (Baltimore, Md.)* 67.2, p. 750-761. ISSN : 1527-3350. DOI : [10.1002/hep.29483](https://doi.org/10.1002/hep.29483).
- WANG, Shasha, HUANG, Xiaoyang et YANG, Chun (2011). "Mixing Enhancement for High Viscous Fluids in a Microfluidic Chamber". In : *Lab on a Chip* 11.12, p. 2081-2087. ISSN : 1473-0189. DOI : [10.1039/C0LC00695E](https://doi.org/10.1039/C0LC00695E).
- WEAVER, Richard J. *et al.* (2020). "Managing the Challenge of Drug-Induced Liver Injury: A Roadmap for the Development and Deployment of Preclinical Predictive Models". In :

-
- Nature Reviews Drug Discovery* 19.2, p. 131-148. ISSN : 1474-1784. DOI : [10.1038/s41573-019-0048-x](https://doi.org/10.1038/s41573-019-0048-x).
- WESTERINK, Walter M. A. et SCHOONEN, Willem G. E. J. (2007). "Phase II Enzyme Levels in HepG2 Cells and Cryopreserved Primary Human Hepatocytes and Their Induction in HepG2 Cells". In : *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 21.8, p. 1592-1602. ISSN : 0887-2333. DOI : [10.1016/j.tiv.2007.06.017](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.06.017).
- WIKLUND, Martin (2012). "Acoustofluidics 12: Biocompatibility and Cell Viability in Microfluidic Acoustic Resonators". In : *Lab on a Chip* 12.11, p. 2018-2028. DOI : [10.1039/C2LC40201G](https://doi.org/10.1039/C2LC40201G).
- WIKLUND, Martin, GREEN, Roy et OHLIN, Mathias (2012). "Acoustofluidics 14: Applications of Acoustic Streaming in Microfluidic Devices". In : *Lab on a Chip* 12.14, p. 2438-2451. ISSN : 1473-0189. DOI : [10.1039/C2LC40203C](https://doi.org/10.1039/C2LC40203C).
- WIKLUND, Martin *et al.* (2004). "Ultrasonic Enrichment of Microspheres for Ultrasensitive Biomedical Analysis in Confocal Laser-Scanning Fluorescence Detection". In : *Journal of Applied Physics* 96.2, p. 1242-1248. ISSN : 0021-8979. DOI : [10.1063/1.1763226](https://doi.org/10.1063/1.1763226).
- WILKENING, Stefan, STAHL, Frank et BADER, Augustinus (2003). "Comparison of Primary Human Hepatocytes and Hepatoma Cell Line Hepg2 with Regard to Their Biotransformation Properties". In : *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 31.8, p. 1035-1042. ISSN : 0090-9556. DOI : [10.1124/dmd.31.8.1035](https://doi.org/10.1124/dmd.31.8.1035).
- WOODFORD, Curtis et ZANDSTRA, Peter W. (2012). "Tissue Engineering 2.0: Guiding Self-Organization during Pluripotent Stem Cell Differentiation". In : *Current Opinion in Biotechnology* 23.5, p. 810-819. ISSN : 1879-0429. DOI : [10.1016/j.copbio.2012.03.003](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.03.003).
- WOODSIDE, Steven M. (1998). "Spatial Distribution of Acoustic Forces on Particles : Implications for Particle Separation and Resonator Design". Thèse de doct. University of British Columbia. DOI : [10.14288/1.0058627](https://doi.org/10.14288/1.0058627).
- WOODSIDE, Steven M., BOWEN, Bruce D. et PIRET, James M. (1997). "Measurement of Ultrasonic Forces for Particle-Liquid Separations". In : *AIChE Journal* 43.7, p. 1727-1736. ISSN : 1547-5905. DOI : [10.1002/aic.690430710](https://doi.org/10.1002/aic.690430710).
- WU, Fenfang *et al.* (2019). "Generation of Hepatobiliary Organoids from Human Induced Pluripotent Stem Cells". In : *Journal of Hepatology* 70.6, p. 1145-1158. ISSN : 0168-8278. DOI : [10.1016/j.jhep.2018.12.028](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.12.028).
- WU, Min-Hsien, HUANG, Song-Bin et LEE, Gwo-Bin (2010). "Microfluidic Cell Culture Systems for Drug Research". In : *Lab on a Chip* 10.8, p. 939-956. ISSN : 1473-0197. DOI : [10.1039/b921695b](https://doi.org/10.1039/b921695b).
- WU, Yue *et al.* (2018). "Acoustic Assembly of Cell Spheroids in Disposable Capillaries". In : *Nanotechnology* 29.50, p. 504006. ISSN : 0957-4484. DOI : [10.1088/1361-6528/aae4f1](https://doi.org/10.1088/1361-6528/aae4f1).
- WU, Zhuhao *et al.* (2022). "Acoustofluidics for Cell Patterning and Tissue Engineering". In : *Engineered Regeneration* 3.4, p. 397-406. ISSN : 2666-1381. DOI : [10.1016/j.engreg.2022.08.005](https://doi.org/10.1016/j.engreg.2022.08.005).

- XIE, Wen-Jun *et al.* (2006). "Acoustic Method for Levitation of Small Living Animals". In : *Applied Physics Letters* 89.21, p. 214102. ISSN : 0003-6951, 1077-3118. DOI : [10.1063/1.2396893](https://doi.org/10.1063/1.2396893).
- XUE, Yuntian *et al.* (2021). "Retinal Organoids On-a-Chip: A Micro-Millifluidic Bioreactor for Long-Term Organoid Maintenance". In : *Lab on a Chip* 21.17, p. 3361-3377. ISSN : 1473-0189. DOI : [10.1039/D1LC00011J](https://doi.org/10.1039/D1LC00011J).
- YAMANAKA, Shinya (2007). "Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells". In : *Cell Stem Cell* 1.1, p. 39-49. ISSN : 1875-9777. DOI : [10.1016/j.stem.2007.05.012](https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.012).
- YAMASHITA, Fumiyo *et al.* (2013). "Modeling of Rifampicin-Induced CYP3A4 Activation Dynamics for the Prediction of Clinical Drug-Drug Interactions from In Vitro Data". In : *PLOS ONE* 8.9, e70330. ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0070330](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070330).
- YAMASHITA, Tomoki *et al.* (2018). "Billion-Scale Production of Hepatocyte-like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells". In : *Biochemical and Biophysical Research Communications* 496.4, p. 1269-1275. ISSN : 0006-291X. DOI : [10.1016/j.bbrc.2018.01.186](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.186).
- YANG, Kyu-Hyun *et al.* (1996). "Exposure to Low-Intensity Ultrasound Increases Aggrecan Gene Expression in a Rat Femur Fracture Model". In : *Journal of Orthopaedic Research* 14.5, p. 802-809. ISSN : 1554-527X. DOI : [10.1002/jor.1100140518](https://doi.org/10.1002/jor.1100140518).
- YANG, Shujie *et al.* (2022). "Harmonic Acoustics for Dynamic and Selective Particle Manipulation". In : *Nature Materials*, p. 1-7. ISSN : 1476-4660. DOI : [10.1038/s41563-022-01210-8](https://doi.org/10.1038/s41563-022-01210-8).
- YOSHIMITSU, Ryosuke *et al.* (2014). "Microfluidic Perfusion Culture of Human Induced Pluripotent Stem Cells under Fully Defined Culture Conditions". In : *Biotechnology and Bioengineering* 111.5, p. 937-947. ISSN : 1097-0290. DOI : [10.1002/bit.25150](https://doi.org/10.1002/bit.25150).
- YOSIOKA, Kawashima et KAWASIMA, Yukihiko (1955). "Acoustic Radiation Pressure on a Compressible Sphere". In : *Acta Acustica united with Acustica* 5.3, p. 167-173.
- YU, Fang *et al.* (2017). "A Perfusion Incubator Liver Chip for 3D Cell Culture with Application on Chronic Hepatotoxicity Testing". In : *Scientific Reports* 7.1, p. 14528. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/s41598-017-13848-5](https://doi.org/10.1038/s41598-017-13848-5).
- YU, Miao *et al.* (2018). "Coherent Timescales and Mechanical Structure of Multicellular Aggregates". In : *Biophysical Journal* 114.11, p. 2703-2716. ISSN : 0006-3495. DOI : [10.1016/j.bpj.2018.04.025](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.04.025).
- ZHANG, Jie *et al.* (2017). "Stem Cell Culture and Differentiation in Microfluidic Devices toward Organ-on-a-Chip". In : *Future science OA* 3.2, FSO187. ISSN : 2056-5623. DOI : [10.4155/fsoa-2016-0091](https://doi.org/10.4155/fsoa-2016-0091).
- ZHANG, Shun, WAN, Zhengpeng et D. KAMM, Roger (2021). "Vascularized Organoids on a Chip: Strategies for Engineering Organoids with Functional Vasculature". In : *Lab on a Chip* 21.3, p. 473-488. DOI : [10.1039/D0LC01186J](https://doi.org/10.1039/D0LC01186J).

ZHAO, Hui *et al.* (2015). “Bi-Content Micro-Collagen Chip Provides Contractility-Based Biomechanical Readout for Phenotypic Drug Screening with Expanded and Profiled Targets”. In : *Lab on a Chip* 15.17, p. 3481-3494. DOI : [10.1039/C5LC00589B](https://doi.org/10.1039/C5LC00589B).